



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Papel da enzima oxido nítrico sintase induzível na infecção por *Neospora caninum*

Patrício da Silva Cardoso Barros

Uberlândia-MG

Junho-2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Papel da enzima oxido nítrico sintase induzível na infecção por *Neospora caninum*

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Patrício da Silva Cardoso Barros

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Uberlândia-MG

Junho-2014

"O ser humano é parte de um todo que chamamos de universo, uma parte limitada no tempo e no espaço. A pessoa experimenta a si mesma, seus pensamentos e sensações como algo separado do restante - trata-se de uma espécie de ilusão de ótica de sua consciência. Essa ilusão nos aprisiona, limitando-nos a nossos desejos individuais e a sentirmos afeto apenas pelas pessoas mais próximas. Nossa tarefa deve ser libertar a nós mesmos dessa prisão, alargando nosso círculo de compaixão para podermos abarcar todos os seres vivos e a natureza inteira. "

Albert Einstein - citado por Brian Weiss

"Nós somos aquilo que fazemos repetidamente.

A excelência, portanto, não é um ato, mas um hábito. "

Aristóteles

Agradecimentos especiais

À minha mãe Maria Socorro, à minha mãe biológica Maria Micaela e à minha noiva Marina Medalha, por serem o meu conforto, minha fonte inesgotável de inspiração e o meu tesouro maior. Por me tornarem consciente de que tenho absolutamente tudo de essencial e necessário para uma vida digna e respeitável e que qualquer outra conquista será uma mera adição e jamais pode substituir o amor.

A minha irmã Patrícia, por todo o amor, carinho, compreensão e momentos inesquecíveis.

Aos meus queridos sogros Veralucia e Kleber e ao meu cunhado Gilberto, por me permitirem fazer parte daquilo que é um exemplo de família, onde se prega o amor, o respeito e a amizade.

Agradecimentos

Ao Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por ter me recebido em seu laboratório e ter me oferecido as oportunidades necessárias para a realização desse trabalho, por todo o ensinamento, motivação e orientação.

Ao Dr. José Roberto Mineo, por compartilhar da sua vasta experiência e pela orientação.

Aos amigos: Fabrício, Célio, Frederico, Cascão, João, Luísa, Silas, Diogão, Garcinha pela amizade sincera e pelo companheirismo.

Aos amigos e companheiros do laboratório de imunoparasitologia pelo compartilhamento de conhecimento, pela amizade e momentos de alegria.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

Resumo:

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa, estreitamente relacionado ao *Toxoplasma gondii*. Após a sua descrição, a infecção por *N. caninum* é hoje sabidamente responsável por grandes perdas econômicas na bovinocultura. A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) constitui o principal mecanismo indutor da produção de óxido nítrico, que atua como um mecanismo efetor importantíssimo contra microrganismos. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a importância da enzima óxido nítrico sintase induzível durante a infecção por *N. caninum*. Os resultados obtidos demonstram que na ausência da iNOS detectou-se uma diminuição na produção de citocinas inflamatórias (IL-12p40, TNF- α e IL-1 β) e um aumento na produção de IL-10 em macrófagos infectados com *N. caninum*, sugerindo o envolvimento da iNOS na modulação do perfil de citocinas produzida por macrófagos. Infecção experimental de camundongos indicaram que camundongos C57BL/6 selvagens (WT) apresentaram menor taxa de mortalidade, parasitismo e inflamação se comparados com camundongos iNOS^{-/-}, além de apresentarem menores níveis de citocinas do perfil Th1 no início da infecção e de citocinas Th2 e Th17 em uma fase intermediária da infecção. Esses resultados demonstram que iNOS constitui um importante mecanismo de resistência a infecção por *N. caninum*, induzindo o controle do parasitismo agudo e crônico, da produção de citocinas e, conseqüentemente, da exacerbação da resposta inflamatória.

Embasado nesses resultados, podemos concluir que iNOS é importante na modulação da resposta imune durante a infecção por *N. caninum*, por controlar o parasitismo, inibindo assim a produção exacerbada de citocinas e, conseqüentemente, os fatores deletérios de um processo imunopatológico.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; Citocinas, iNOS, inflamação, carga parasitária

Abstract:

Neospora caninum is an Apicomplexan parasite, closely related to *Toxoplasma gondii*. Since its first description, *N. caninum* infection has emerged as an important cause of economic loss in the cattle industry. Inducible nitric oxide synthases (iNOS) is the most important enzyme responsible for the generation of Nitric Oxide (NO), which is classically described as an important effector mechanism in the killing of intracellular pathogens. For that purpose, we aimed to evaluate the role of inducible nitric oxide synthases during *N. caninum* infection. The results obtained here suggest the involvement of iNOS in modulation of the cytokine profile produced by macrophages, once targeted genetic disruption of this enzyme led to a decrease in the inflammatory cytokines production (IL-12p40, TNF- α and IL-1 β) and an increase in IL-10 levels in macrophages infected with *N. caninum*. Our results obtained from experimentally infected mice indicate that iNOS is an important resistance mechanism in the *N. caninum* infection, by inducing the control of acute and chronic parasitism, cytokine production and consequently the exacerbation of the inflammatory responses. After infecting with *N. caninum*, wild type C57BL/6 mice (WT) had a lower mortality rate, parasitism and inflammation if compared to iNOS^{-/-} mice, besides having lower early Th1 cytokine profile levels and Th2/Th17 in an intermediate stages of infection. Based on these results, we conclude that iNOS is important in modulating immune responses during *N. caninum* infection, by controlling parasitism, thereby inhibiting cytokine overproduction and consequently the deleterious effects of immunopathological processes.

Keywords: *Neospora caninum*; Cytokines; iNOS; Inflammation; Parasite load

Sumário:

INTRODUÇÃO.....	1
Descoberta de <i>Neospora caninum</i>	1
Hospedeiros.....	1
Ciclo biológico e via de transmissão	2
Patogênese e sinais clínicos.....	7
Epidemiologia e prevalência	8
Resposta Imune	9
Óxido nítrico sintase (NOS) e produção de óxido nítrico	12
Justificativa.....	18
Objetivos	20
Objetivo geral.....	20
Objetivos específicos.....	20
Materiais e métodos.....	21
Obtenção de camundongos.....	21
Cultura de células	21
Cultura de parasitos	21
Preparação do antígeno solúvel de <i>Neospora caninum</i>	22
Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	22
Estimulação dos BMDMs com taquizoítos viáveis de <i>N. caninum</i> e com NLA.....	23
Dosagem de Nitrito/Nitrato por método colorimétrico	23
Quantificação de citocinas.....	23
Ensaio de sobrevivência.....	24
Infecções subletais.....	24
Homogenato de órgãos	25
Determinação da inflamação tecidual	25
PCR em tempo real.....	25

Análise estatística	26
Normas de biossegurança	26
Resultados <i>in vitro</i>	27
iNOS modula citocinas em macrófagos	27
Resultados <i>in vivo</i>	30
<i>N. caninum</i> induz a produção de NO em camundongos WT	30
Ausência de iNOS induz um aumento da susceptibilidade de camundongos a infecção parental por <i>N. caninum</i>	31
Camundongos iNOS ^{-/-} apresentam um aumento na produção local e sistêmica de citocinas em resposta a infecção	35
Discussão	43
Conclusão	49
Referências	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Descoberta de *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia e família Sarcocystidae (ELLIS et al., 1994; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2012; MONNEY; HEMPHILL, 2014). Esse protozoário se assemelha, em termos estruturais e biológicos, ao protozoário *Toxoplasma gondii*, apesar das infecções apresentarem diferenças marcantes (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011; JIMENEZ-RUIZ et al., 2012; HEMPHILL et al., 2013; LANGONI et al., 2013). Especula-se que até 1988, a infecção causada por esse protozoário tenha sido diagnosticada erroneamente como toxoplasmose (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

N. caninum possui uma distribuição mundial (ANTONELLO et al., 2012) e o primeiro relato acerca desse protozoário ocorreu em 1984 na Noruega e foi associado a distúrbios neurológicos (encefalomielite) e musculares (miosite) em filhotes de cães, causados por um coccídeo formador de cistos não identificado, morfológicamente semelhante ao *Toxoplasma*, porém os animais apresentavam sorologia negativa para este protozoário (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). A descrição do gênero e espécie, *Neospora caninum*, foi feita por Dubey e seus colaboradores (1988a) em cães com encefalomielite e miosite. Ainda nesse mesmo ano, Dubey e seus colaboradores (1988b) isolaram esse protozoário em cultivo celular, a partir de cistos teciduais de cães que apresentavam alterações neurológicas e, posteriormente foi identificado em várias espécies de animais, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, equinos e cervídeos (THILSTED; DUBEY, 1989; DUBEY; LINDSAY, 1996; HEMPHILL; GOTTSTEIN, 2000; HEMPHILL et al., 2013).

1.1 Hospedeiros

N. caninum tem por hospedeiros definitivos os canídeos, tais como, cães (*Canis lupus familiaris*), coiotes (*Canis latrans*), dingos australianos (*Canis lupus dingo*) e Lobos

(*Canis lupus*) e por hospedeiros intermediários os gatos (*Felis silvestris catus*), porcos (*Sus domesticus*), carneiros (*Ovis aries*), camelos (*Camelus bactrianus*), bovinos (*Bos taurus*) cavalos (*Equus caballus*), raposas (*Vulpes vulpes*), pardais (*Passer domesticus*), galinhas (*Gallus domesticus*) e veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; KING et al., 2010; MINEO et al., 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; DUBEY et al., 2014). Apesar da ampla distribuição entre diferentes espécies, *N. caninum* causa doença de importância clínica conhecida apenas em bovinos e canídeos (DUBEY, 2003).

Em relação ao aspecto zoonótico da infecção, não há comprovação direta de que *N. caninum* possa causar infecções em humanos, uma vez que não houve demonstração da presença do parasito em tecidos humanos e nenhum relato de infecção acidental envolvendo *N. caninum*, em pessoas que manipulam parasitos viáveis (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Contudo, alguns grupos de pesquisa demonstraram a presença de anticorpos específicos contra o parasito em populações de diferentes países, o que mantém as suspeitas sobre a possível infecção de seres humanos por este protozoário (TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006; ROBERT-GANGNEUX; KLEIN, 2009). Na tentativa de se buscar tais informações, duas *Macaca mulatta* prenhes foram experimentalmente infectados com taquizoítos de *N. caninum*, causando infecção fetal, com lesões semelhantes àquelas causadas pela toxoplasmose congênita (BARR et al., 1994). Assim os humanos poderiam ser hospedeiros acidentais desse protozoário, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico.

1.2 Ciclo biológico e via de transmissão

N. caninum apresenta um ciclo de vida heterógeno, alternado entre hospedeiros definitivos, nos quais ocorrem a reprodução sexuada e a eliminação de oocistos, e hospedeiros intermediários nos quais ocorrem a reprodução assexuada e formação de cistos teciduais (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; MINEO et al., 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

N. caninum possui três formas infectantes, (1) taquizoítos, que se encontram livres ou no vacúolo parasitóforo, durante a fase aguda da infecção e apresentam rápida

multiplicação; (2) bradizoítos, que se encontram em cistos teciduais, durante a fase crônica da infecção; e (3) oocistos, que são produzidos no intestino de canídeos não imunes e eliminados com as fezes (Figura 1) (DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; EASTICK; ELSHEIKHA, 2010). A robusta parede dos Oocistos não-esporulados (imaturos ou não infecciosos) liberados nas fezes de canídeos infectados confere resistência às condições adversas do ambiente externo ao hospedeiro (como condições extremas de temperatura e umidade) por longos períodos de tempo. Após 42 a 72 horas, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados, contendo dois esporocistos, e cada esporocisto contendo quatro esporozoítos. Os hospedeiros intermediários podem se infectar pela ingestão de oocistos esporulados, presentes em alimentos ou água contaminada, ocorrendo a liberação dos esporozoítos, que invadem as células do epitélio intestinal, transformando-se em taquizoítos que atingem a corrente sanguínea e os vasos linfáticos invadindo diferentes tipos celulares, incluindo os macrófagos e os linfócitos, disseminando a infecção por todo o organismo (DUBEY, 2003; DUBEY, 2005). Essa rápida propagação dos taquizoítos, desencadeia uma forte resposta inflamatória, que culmina na destruição tecidual e é responsável pelas manifestações clínicas da doença. A pressão exercida pela resposta imune do hospedeiro contra os taquizoítos faz com que os mesmos se transformem em bradizoítos, que são formas de latência do parasito, de multiplicação lenta (por endodiogia) e que secretam proteínas responsáveis pela impermeabilização das membranas dos vacúolos parasitóforos, culminando na formação de cistos teciduais que impedem a ativação do sistema imunológico do hospedeiro nestes microambientes (DUBEY, 2003; ELLIS et al., 2010; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Esse ciclo se completa, com a ingestão de cistos teciduais pelos canídeos (MCALLISTER et al., 1998; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). A resistência do cisto permite-lhe sobreviver à passagem pelo estômago e a parede do mesmo é digerida por ações de enzimas proteolíticas, liberando bradizoítos que invadem o epitélio do intestino delgado, iniciando assim a fase sexuada (esquizogonia), com formação de esquizontes e liberação de merozoítos, os quais iniciam a gamogonia, com produção final de oocistos não esporulados que são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo. No entanto, as fases esquizogonia e gamogonia, ainda não foram observadas no ciclo de *N. caninum*, mas presume-se que essas fases precedem a formação de oocistos no intestino dos canídeos (Figura 2) (DUBEY et al., 2004; HEMPHILL et al., 2013).

A transmissão vertical constitui a principal rota de transmissão bovina, podendo permanecer em determinados rebanhos por diversas gerações (ROSYPAL; LINDSAY, 2005). A transmissão do parasito da mãe para o feto via placenta contribui para a persistência da infecção no rebanho sem a participação de um hospedeiro definitivo (BJORKMAN et al., 2003), estabelecendo a infecção endêmica, que pode ocorrer sem nenhuma manifestação clínica (ZINTL; PENNINGTON; MULCAHY, 2006). A transmissão horizontal de *N. caninum* 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 (UGGLA et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2003; MOSKWA et al., 2007). Uma vez que foi detectado o DNA do parasito no colostro e leite de vacas soropositivas (MOSKWA et al., 2007). A presença de DNA do parasito foi demonstrada no sêmen de touros naturalmente infectados, cogitando a possibilidade da transmissão venérea (ORTEGA-MORA et al., 2003). A inoculação intra-uterina de sêmen contaminado com taquizoítos resultou em infecção materna, sem a detecção do DNA do parasito no embrião (SERRANO et al., 2006). A transferência de embrião de doador soropositivo para receptor soronegativo resultou em fetos negativos para *N. caninum*, enquanto o processo inverso resultou em infecção fetal (BAILLARGEON et al., 2001).

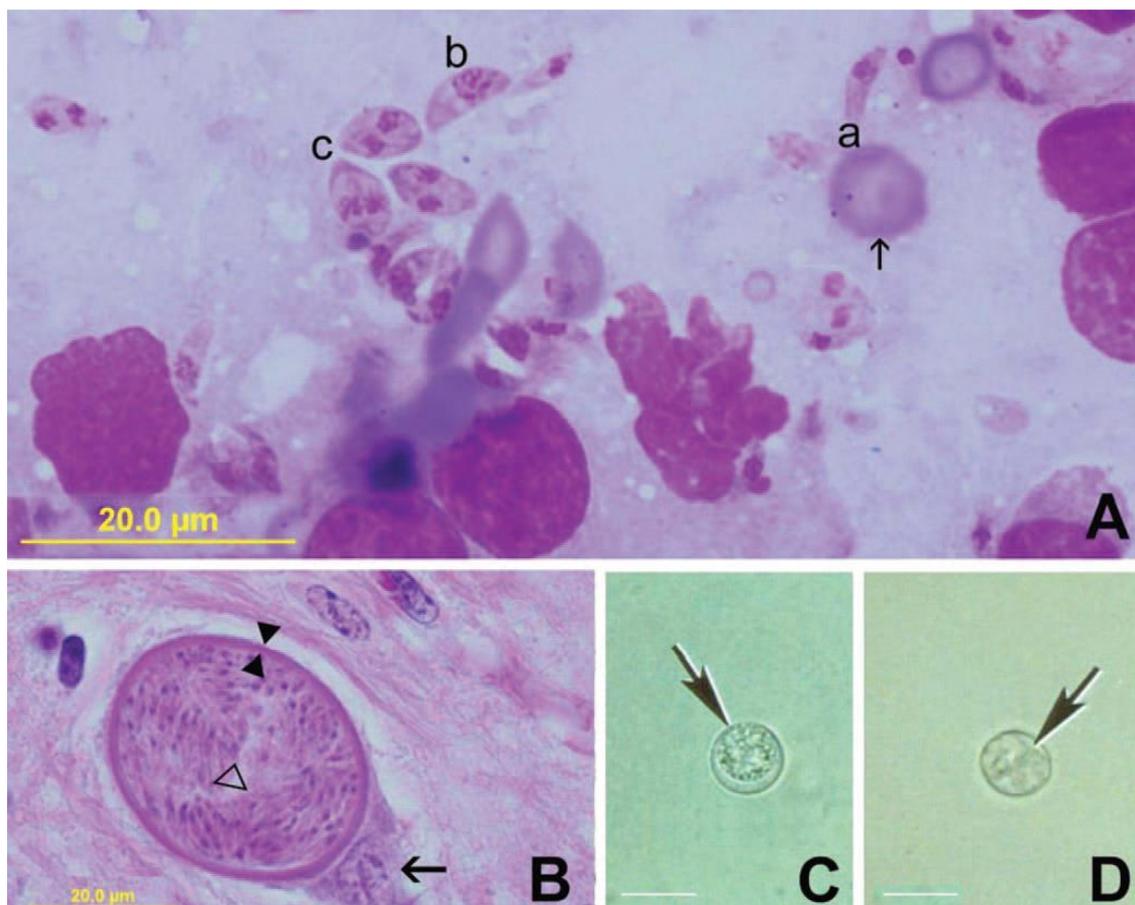


Figura 1. Diferentes estágios de vida de *Neospora caninum*

- A. (a) Taquizoíto delgado; (b) taquizoíto antes da divisão; (c) três taquizoítos se dividindo comparado com um glóbulo vermelho do sangue (seta).
- B. Cisto tecidual dentro de um neurônio na medula espinhal de um bezerro infectado congenitamente. Espessura da parede do cisto (setas opostas); bradizoíto (interior do triângulo aberto).
- C. Oocisto não esporulado (seta). Barra 10 μm .
- D. Oocisto esporulado (seta) contendo dois esporocistos. Barra 10 μm .

Fonte: (Dubey et al., 2007)

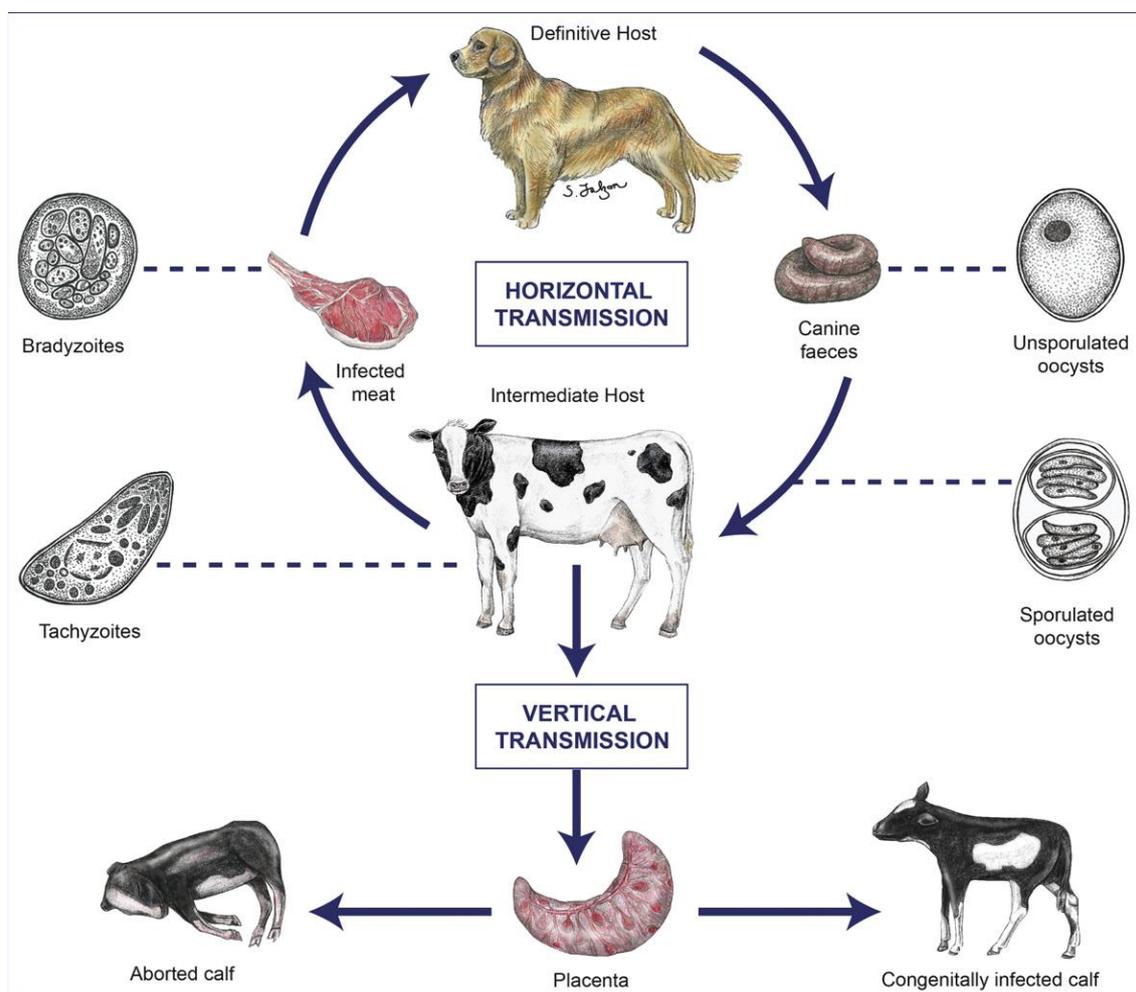


Figura 2. Ciclo biológico de *Neospora caninum*

Fonte: (Goodswen et al., 2013)

1.3 Patogênese e sinais clínicos

Proteínas de superfície de taquizoítos do filo Apicomplexa desempenham um importante papel no reconhecimento, na adesão e na invasão de células hospedeiras que constituem etapas cruciais na sobrevivência e proliferação do parasito e subsequente estabelecimento da infecção (BOOTHROYD et al., 1998; LEI; DAVEY; ELLIS, 2005; HEMPHILL et al., 2013).

A invasão celular constitui o elemento chave na patogênese da infecção por *N. caninum*, e envolve processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa, por apresentarem um complexo apical composto por roptrias, micronemas e grânulos densos, que são usados pelos parasitos durante a adesão e invasão de células hospedeiras (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002). A invasão celular é um mecanismo ativo que requer gastos energéticos e pode ser resumido em três principais etapas:

A primeira etapa é caracterizada pela adesão aleatória do parasito à célula hospedeira, com o envolvimento de antígenos de superfícies imunodominantes (NcSAG1 e NcSRS2). Após a adesão inicial, os parasitos reorientam-se posicionando a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (MIC1, 2, 3 e 4, dentre outras) são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão e junção de forma irreversível. Após a formação desta junção, inicia-se o movimento da junção ao redor do taquizoíto, que juntamente com o citoesqueleto (sistema de actina-miosina) do parasito, força-o para dentro do VP, culminando com a invasão. A membrana plasmática do hospedeiro é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos.

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

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

Os taquizoítos dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novos parasitos em poucos dias após a infecção e, subsequentemente, há lise da célula hospedeira e liberação dos taquizoítos que ficam livres para infectar uma variedade de tecidos e tipos celulares (HEMPHILL et al., 1999; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; HEMPHILL et al., 2013). Como consequência dessa rápida multiplicação de taquizoítos surgem lesões necróticas em poucos dias, acarretando desordens neuromusculares, como encefalomielite em filhotes de cães e deformidades congênitas em membros de bovinos e outros hospedeiros intermediários (DUBEY; LINDSAY, 1996).

A neosporose canina ocorre geralmente como infecções subclínicas persistentes que podem sofrer reativação durante a gestação, resultando em transmissão tranplacentária para o feto. Cães de todas as idades são afetados, mas os sinais clínicos são mais frequentes em filhotes infectados congenitamente e animais jovens, que podem desenvolver ataxia nos membros anteriores e paralisia, seguida de paralisia e hiperextensão dos membros posteriores (hiperextensão rígida), reflexos patelares diminuídos e perda de consciência (DUBEY; LINDSAY, 1996; BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; DUBEY, 2003).

Em bovinos adultos infectados, o aborto constitui a principal evidência clínica associada à infecção, podendo acontecer do terceiro mês até o final da gestação, sendo mais comum entre 5º e 6º mês de gestação. Os embriões e fetos que morrem no útero podem ser reabsorvidos, mumificados ou autolisados ou pode ocorrer a natimortalidade. Os bezerros podem nascer infectados mas clinicamente normais, podem apresentar sinais clínicos ou podem manter-se livres da infecção. Bezerros que sobrevivem à infecção congênita podem apresentar sinais clínicos decorrentes como baixo peso, baixo desenvolvimento, alteração da propriocepção, ataxia, flexão ou hiperextensão dos membros, assimetria ocular, diminuição do reflexo patelar (DUBEY, 1999; DUBEY, 2003).

1.4 Epidemiologia e prevalência

A neosporose tem emergido como uma das mais importantes causas de abortamento bovino no mundo, afetando o gado de leite e de corte e gerando um grande impacto econômico (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; REICHEL et al., 2013). Na América do Sul, aborto e mortalidade neonatal associados a neosporose foram

descritos na Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai, mostrando que entre 12 a 42% dos fetos de bovinos de leite abortados estavam infectados com *N. caninum*. A prevalência da neosporose varia dependendo do país, da região, do rebanho, chegando a afetar 87% das vacas em algumas fazendas (MOORE, 2005; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Na região do Triângulo Mineiro, a soroprevalência de neosporose em rebanhos bovinos com problemas reprodutivos foi estimada em 17% (MINEO et al., 2006).

Infecções subclínicas em cães possuem uma grande importância epidemiológica, por serem os hospedeiros definitivos e eliminarem oocistos nas fezes, contribuindo para a contaminação ambiental. Há uma maior soroprevalência em cães de área rural (20% a 97%) do que em cães de área urbana (7% a 26%), sugerindo que os cães que povoam áreas rurais estão mais expostos ao parasito do que os cães de ambientes urbanos, ressaltando assim a importante associação epidemiológica entre bovinos e cães, uma vez que os cães podem ter acesso as placentas e fetos abortados pelos bovinos (ANTONY; WILLIAMSON, 2003; SANCHEZ et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; LASRI et al., 2004).

1.5 Resposta Imune

Em comparação com a grande quantidade de estudos existentes na literatura sobre o perfil de resposta imune desencadeada por *T. gondii*, muito pouco se conhece acerca dos fenômenos imunológicos induzidos por *N. caninum*. Então, para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos do hospedeiro envolvidos no combate à infecção por *N. caninum*, extrapola-se mecanismos desencadeados durante a infecção por outros protozoários, principalmente seu congênere *T. gondii*.

Os protozoários classicamente tendem a desencadear a cronificação da infecção, com o intuito de maximizar o sucesso em sua transmissão para outro hospedeiro. Para isso, evolutivamente, esses parasitos desenvolveram mecanismos de evasão à destruição mediada pela resposta imune do hospedeiro (SACKS; SHER, 2002).

Após a infecção, a primeira barreira física é representada pelos enterócitos e as junções intercelulares da mucosa intestinal que tentam deter a invasão do parasito pela via oral. Quando enterócitos são infectados com *T. gondii* eles podem secretar moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO), citocinas que ativam as células natural killer (NK)

produzindo IFN- γ e quimiocinas que recrutam leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas (BUZONI-GATEL et al., 2006; MARCAIS et al., 2013). Os macrófagos e as células dendríticas funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através dos seus receptores de reconhecimento padrão, entre os quais se destaca os receptores do tipo Toll (TLRs) (YAROVINSKY, 2014), que pertencem a uma família de receptores transmembrânicos que estimulam as funções das APCs em resposta à lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos presentes em patógenos bacterianos, em fungos e vírus (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013). O reconhecimento de protozoários, constitui uma tarefa complicada para o sistema imune dos mamíferos. Isso se deve, em parte, ao fato de que a maioria das moléculas microbianas classicamente reconhecidas pelos receptores inatos não se encontrarem presentes nos patógenos eucariotos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Neste sentido, a imunidade inata tem evoluído para reconhecer um conjunto distinto de moléculas exclusivamente presentes em protozoários (YAROVINSKY et al., 2005; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007).

Ao se ligarem aos PAMPs os TLRs sofrem dimerização, permitindo a ligação de proteínas adaptadoras, facilitando o recrutamento e a ativação de proteínas quinases e fatores de transcrição, que levam a expressão de genes que codificam diferentes mediadores inflamatórios (AKIRA; TAKEDA, 2004).

Durante a fase aguda da infecção, macrófagos e células dendríticas secretam altos níveis de interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF- α) em resposta a antígenos e proteínas liberados por taquizoítos (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005). A citocina IL-12 estimula a diferenciação de células T naive em subpopulações Th1 produtoras de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, estimula a ativação de células NK que secretam altos níveis de IFN- γ , ativando por sua vez macrófagos que eliminam as células infectadas, através de mecanismos mediados por intermediários reativos de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio, que bloqueiam o metabolismo do parasito, impedindo a sua sobrevivência. Células T CD8⁺ participam diretamente na eliminação das células infectadas, liberando taquizoítos que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos, como anticorpos, complemento, macrófagos ativados e células NK (TANAKA et al., 2000; STASKA et

al., 2003; BOYSEN et al., 2006; WILLIAMS; TREES, 2006; MINEO et al., 2010; MURRAY; WYNN, 2011).

IL-12 e IFN- γ são citocinas-chave envolvidas na resistência aos protozoários intracelulares, como *N. caninum* (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006). Células esplênicas e macrófagos peritoneais desafiados com taquizoítos vivos ou estimulados com antígeno solúvel de *T. gondii* apresentam um aumento da expressão de mRNA de IL-12p40 dois dias após a infecção. Tratamento de camundongos C57BL/6 e BALBC/c, com anticorpos monoclonais contra IL-12, resultou em 100% de mortalidade, nos primeiros 15 dias de infecção (GAZZINELLI et al., 1994). Camundongos BALB/c infectados com taquizoítos de *N. caninum* e tratados com a citocina IL-12 recombinante apresentaram uma diminuição da carga parasitária e de lesões cerebrais, 3 semanas após a infecção em comparação com camundongos controles. Ao passo que, camundongos tratados com anticorpos contra IFN- γ apresentam maior morbidade/mortalidade após a infecção com taquizoítos de *N. caninum* (BASZLER et al., 1999).

Camundongos geneticamente deficientes para a proteína adaptadora MyD88, que é uma proteína de grande importância na imunidade inata, por atuar como um transdutor de sinal nas vias de sinalização dos TLRs e receptor da interleucina-1, apresentam deficiência na produção de IL-12 e IFN- γ após a infecção por *T. gondii* e uma alta susceptibilidade a infecção por este protozoário. Esses resultados levaram a ideia de que a ativação de TLRs na dependência de MyD88 é essencial para a resistência do hospedeiro ao *T. gondii* (SCANGA et al., 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos deficientes para MyD88 infectados por *N. caninum* (MINEO et al., 2009; MINEO et al., 2010).

Postula-se, que a ativação de TLRs na dependência de MyD88 nas células dendríticas leva a ativação de células Th1, que são necessárias para a sobrevivência do hospedeiro durante infecções parasitárias (JANKOVIC et al., 2002; YAROVINSKY et al., 2006).

A importância das células T na resistência à infecção por *N. caninum* foi demonstrado quando camundongos atímicos infectados com taquizoítos da cepa japonesa (JPA-1) apresentaram anorexia, respiração ofegante, ataxia, tetraplegia nos dias 18-20 após a infecção e morreram 2-5 dias após a manifestação dos sinais clínicos, enquanto os animais do tipo selvagem (WT) não apresentaram nenhum sinal clínico quando infectados com o mesmo inóculo.

A resposta pro-inflamatória gerada pelo hospedeiro na tentativa de eliminar o parasito pode causar lesões locais e sistêmicas, como controle destas atividades microbicidas a interleucina-10 (IL-10) produzida por macrófagos e células T do tipo 2 (Th2), em locais com alta carga parasitária, é importante na regulação da resposta imune celular, apresentando efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida dos macrófagos ativados por IFN- γ , na diferenciação de clones Th1 de células T, na produção de IFN- γ por células NK, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e, na produção de IL-12 por células acessórias (MINEO et al., 2010; MURRAY; WYNN, 2011).

O fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β), produzido pelos linfócitos intra-epiteliais também atua no controle da resposta pró-inflamatória, limitando a produção de IFN- γ , inibindo a diferenciação e proliferação de células Th1 (TAKEUCHI; ALARD; STREILEIN, 1998; JONULEIT et al., 2002; MILLS; MCGUIRK, 2004).

Este balanço na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é de extrema importância durante a gestação, uma vez que a exacerbação de uma resposta imune do tipo Th1 é incompatível com a gestação (RAGHUPATHY, 1997). Os altos níveis de progesterona produzidos durante a gestação atuam na imunomodulação da resposta imune materna, levando à conversão das citocinas para um padrão Th2, para que o feto possa ser reconhecido como “próprio” durante o período gestacional (INNES et al., 2002).

1.5.1 Óxido nítrico sintase (NOS) e produção de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, composto por sete elétrons do nitrogênio e oito elétrons do oxigênio, possuindo um elétron desemparelhado na sua estrutura, portanto, é um radical livre altamente reativo (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; CAU; CARNEIRO; TOSTES, 2012; ROCHETTE et al., 2013). Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais (JAMES, 1995). O interesse pelas funções biológicas do NO originou-se, primeiramente, pela conclusão de que a ação de alguns vasodilatadores era dependente da liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, denominado fator vasodilatador associado ao endotélio vascular (EDRF) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Dez anos antes, na tentativa de entender os mecanismos envolvidos no tratamento da *angina pectoris*, insuficiência cardíaca congênita e outras complicações vasculares,

com nitroglicerina e nitratos orgânicos introduzida pela medicina chinesa empiricamente a mais de século, dois grupos de pesquisadores demonstraram que o uso de nitratos orgânicos aumentava os níveis de GMP cíclico de forma dose dependente e que estes compostos, a princípio inativos, após serem metabolizados resultavam na produção de NO (KATSUKI et al., 1977; SCHULTZ; SCHULTZ; SCHULTZ, 1977). Posteriormente, se chegou à conclusão de que o NO era a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, aumentando a dilatação das artérias coronárias, através do estímulo da síntese de GMPc, melhorando o suprimento sanguíneo e aliviando os sintomas (KATSUKI et al., 1977).

Além da regulação do tônus vascular, o NO está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos incluindo, contratilidade da musculatura lisa, reatividade plaquetária, neurotransmissão central e periférica, e as ações citotóxicas de células do sistema imunológico (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999; MORI, 2007; CAU; CARNEIRO; TOSTES, 2012; FENG et al., 2014).

O NO é o produto da oxidação da L-arginina, que é catalisada pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). As NOS hidrolisam a L-arginina a um intermediário, N-Ómega-hidroxi-L-arginina (NOHA), que é oxidado para a produção de L-citrulina e liberação de NO, utilizando nicotinamida-adeninad nucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e oxigênio (O₂) como co-substratos. Desta forma, a disponibilidade da arginina intracelular é um fator limitante na produção de NO (STUEHR, 2004; STEVANOVIC et al., 2013). A arginina é sintetizada a partir da citrulina por ações sucessivas de argininosuccinato sintetase (AS) e argininosuccinato liase (AL), a terceira e a quarta enzima do ciclo da ureia (ciclo da ornitina). Em animais adultos, a citrulina é produzida principalmente no intestino delgado a partir de NH₃, CO₂, e ornitina pela ação de carbamílfostato sintetase I e ornitina transcarbamilase, as 2 primeiras enzimas do ciclo da uréia, e é transportado para os rins e, provavelmente, para outros tecidos para a síntese da arginina (Figura 3). A citrulina é também formada a partir da arginina como um coproduto da reação da NOS, e essa citrulina pode ser reciclada originando a arginina se AS e AL estiverem presentes na mesma célula, gerando assim, o ciclo da citrulina-NO. O fígado é o principal local do metabolismo da arginina, onde a arginina gerada no ciclo da ureia é rapidamente hidrolisado à ureia e ornitina pela ação da arginase sem a geração de arginina. Desta forma, a arginase e a NOS competem pelo mesmo substrato (MORI, 2007).

Existem três isoformas da NOS, nomeadas de acordo com o local onde foram identificadas. A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS I), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS II) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS III) (BLOODSWORTH; O'DONNELL; FREEMAN, 2000; BIAN et al., 2012), que apesar das semelhanças estruturais, são reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (NOS I), 17 (NOS II) e 12 NOS III (WANG; MARSDEN, 1995; QIDWAI; JAMAL, 2010).

Estruturalmente, as NOS são constituídas por um domínio C-terminal transportador de elétrons, denominado domínio redutor, onde o co-substrato NADPH e cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) se ligam. Um domínio oxidante que forma o sítio catalítico da molécula, onde se encontram os sítios de ligação para os cofatores ferroprotoporfirina IV (Heme), tetraidrobiopterina (H4B), co-substrato O₂ e para o substrato L-arginina. Entre os domínios redutor e oxidante encontra-se o domínio ligante de calmodulina. Existe uma sequência alça (de auto-inibição), próximo a porção de ligação FMN que controla a ligação da calmodulina. As flavinas adquirem elétrons do NADPH e os transfere para o ferro do grupo heme, permitindo a ligação do oxigênio catalisando assim a produção de NO a partir da L-arginina. Na eNOS e na nNOS, esta transferência de elétrons é induzida pela ligação da calmodulina, diferente da iNOS, onde a ligação se dá de forma quase irreversível, além da iNOS não apresentar o segmento de auto inibição do sítio de ligação de calmodulina (STUEHR, 1997; STUEHR, 2004; ROMAN; MASTERS, 2006; DAFF, 2010; GIELIS et al., 2011; ZHANG; CASADEI, 2012; ROCHETTE et al., 2013).

Desta forma, sob o ponto de vista prático, as isoformas I e III são caracterizadas como sendo de baixo débito, levando a produção de baixas quantidades de NO, estando envolvidas em processos homeostáticos como neurotransmissão, peristaltismo, controle imediato da pressão arterial ao passo que, a isoforma II é de alto débito, produzindo altas concentrações de NO por tempo indefinido até que a L-arginina ou outros cofatores necessários para a sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte da célula, desempenhando assim um importante papel na geração e manutenção dos processos inflamatórios (GELLER et al., 1993; ZHANG et al., 1994; SALERNO et al., 1997; ZHANG; CASADEI, 2012; ROCHETTE et al., 2013).

As NOS estão presentes em células endoteliais vasculares, células neuronais, plaquetas, células musculares lisas, células cardíacas, macrófagos, células NK, fibroblastos e neutrófilos (MONCADA; HIGGS, 1991; LINDE et al., 2007). A presença

das diferentes espécies reativas de nitrogênio (RNS), na composição do ambiente, incluindo cátion nitril, ânion nitroxil, cátion nitrosil, óxido nitroso, dióxido de nitrogênio, ácido nitroso, dinitrogênio tetraóxido, e peroxidonitrito influenciam na manifestação dos efeitos biológicos das NOS (DENICOLA; SOUZA; RADI, 1998; KOSKENKORVA-FRANK et al., 2013).

Por serem expressas em condições fisiológicas basais, as isoformas endotelial e neuronal são consideradas constitutivas, enquanto, a isoforma II não é expressa constitutivamente, sendo induzida em condições específicas (NATHAN; XIE, 1994; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; PAUTZ et al., 2010). A atividade enzimática das isoformas I e III é cálcio/camodulina dependente, por ser necessária, determinada concentração de Ca^{2+} intracelular para atividade enzimática, ocorrendo inativação das mesmas com queda do Ca^{2+} citoplasmático abaixo de determinado nível. Para a iNOS, o mecanismo de ação depende da concentração intracelular de Ca^{2+} somente para ativação, sendo que a queda do Ca^{2+} intracelular não inibe a sua atividade (MONCADA; HIGGS, 1991; NATHAN; XIE, 1994; BIAN et al., 2012; FENG et al., 2014).

A expressão do mRNA da iNOS é regulada positivamente ou negativamente pelo contato célula-célula (através de moléculas de adesão e de co-estimulação), por citocinas, imunocomplexos, produtos microbianos e virais (proteínas, lipídeos, polissacarídeos), poliaminas, tensão de oxigênio, pH ambiental e vários antibióticos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; FRITSCHÉ et al., 2001; BIAN et al., 2012; FENG et al., 2014).

Embora IFN- γ e LPS sejam os reguladores mais estudados, novos reguladores continuam a ser descobertos. A IL-12 (Juntamente com a IL-18) induzem a expressão da iNOS em várias populações de macrófagos, através de um mecanismo de produção autócrina de IFN- γ (FRUCHT et al., 2001). Entre os produtos virais e microbianos, o transativador tax do HTLV-I, a lipoproteína de 19kD da *Mycobacterium tuberculosis* (atuando via TLR-2), a flagelina de bactérias Gram-negativas (atuando via TLR-5), a proteína efetora sopE2 de *Salmonella typhimurium*, DNA bacterianos, oligodesoxinucleótidos contendo CpG (atuando via TLR-9) e DNA proveniente de vários protozoários têm sido demonstrados, como estimuladores da produção de NO pela iNOS em macrófagos (GAO et al., 1999; MORI et al., 1999; CHERAYIL; MCCORMICK; BOSLEY, 2000; OHASHI et al., 2000; SHODA et al., 2001; THOMA-USZYNSKI et al., 2001; BIAN et al., 2012).

A regulação da expressão da iNOS mediada pelo contato célula-célula foi demonstrada em linfócitos apoptóticos (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000). A fagocitose de linfócitos apoptóticos pelo macrófago, envolvendo o receptor de vitronectina e CD36, regula negativamente a expressão da iNOS e, ao mesmo tempo, desloca o metabolismo da arginina para a via da arginase permitindo assim a replicação de *Trypanosoma cruzi*. Estes efeitos resultam da indução da produção endógena de TGF- β (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Diferentes fatores de transcrição estão envolvidos na expressão da iNOS, incluindo NF- κ B, AP-1, transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT)-1 α , fator regulador 1 de interferon (IRF-1) e fator nuclear para IL-6 (NF-IL-6) (MACMICKING et al., 1997; KLEINERT et al., 1998; DLASKA; WEISS, 1999; GANSTER et al., 2001; PELLACANI et al., 2001; PAUTZ et al., 2010; GUTIERREZ-VENEGAS et al., 2014). Dependendo do tipo de estímulo (citocinas, produtos microbianos) e do tipo celular, diferentes vias de sinalização são ativadas, promovendo a ativação da expressão da iNOS (como: Janus quinase Jak1, Jak2 e tyk2; proteína quinase Raf-1; proteína quinase ativada por mitógeno p38, Erk1/2, e JNK; proteína quinase C; proteína fosfatase 1 e 2A) ou a inibição da mesma (fosfatidilinositol 3-quinases e proteínas tirosina fosfatases) (BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; KARAGHIOSOFF et al., 2000; CHAKRAVORTTY et al., 2001; CHAN et al., 2001; KRISTOF; MARKS-KONCZALIK; MOSS, 2001; GUTIERREZ-VENEGAS et al., 2014).

O NO exerce um efeito bifásico sobre a transcrição da iNOS. Baixas concentrações de NO (tais como, os que ocorrem no início da estimulação dos macrófagos pelas citocinas) ativam o NF- κ B e aumentam a expressão da iNOS (feedback positivo). Altas concentrações de NO possuem o efeito oposto, ajudando a controlar a superprodução de NO (UMANSKY et al., 1998; CONNELLY et al., 2001). Um dos vários mecanismos pelo qual a TGF- β suprime a produção de NO nos macrófagos é pela degradação da própria iNOS (via proteassoma) e foi o primeiro exemplo conhecido da regulação pós-transducional de iNOS (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Em macrófagos, quando se adiciona inibidores de proteassoma, após a indução da expressão da iNOS por lipopolissacarídeo (LPS), há um aumento drástico na quantidade de proteínas da iNOS “num estado estacionário” (MUSIAL; EISSA, 2001).

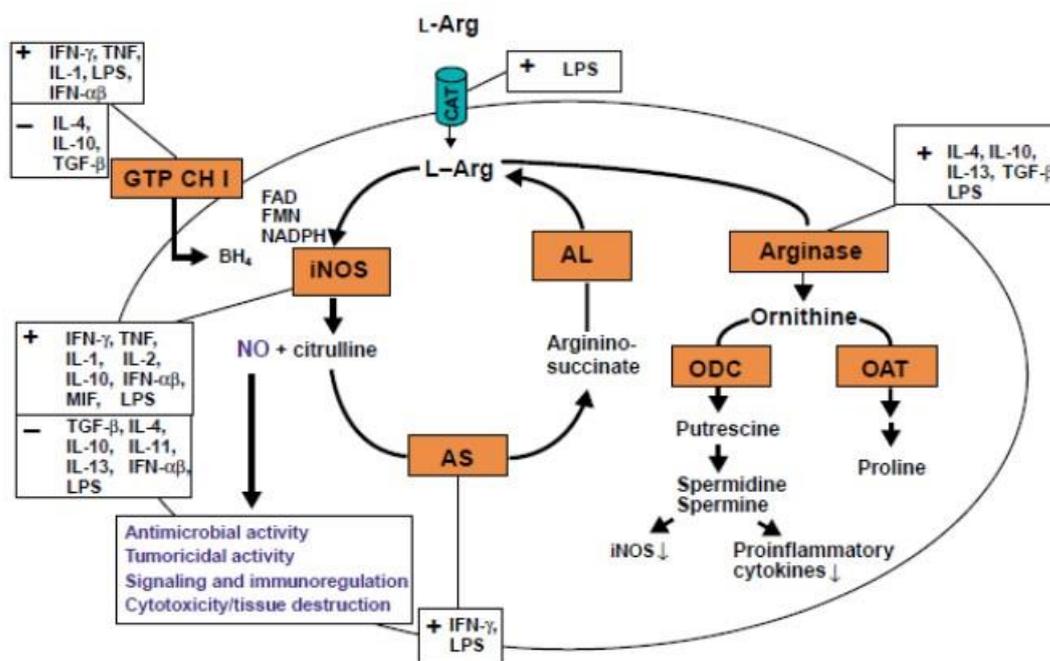


Figura 3. Regulação e função da enzima iNOS em macrófagos de camundongos.

Fonte: (Bogdan, 2001)

2. Justificativa

A neosporose causa grande impacto econômico na indústria agropecuária devido a custos diretos gerados com as perdas de fetos e custos indiretos que incluem, ajuda profissional, diminuição da produção de leite, custos associados com o estabelecimento do diagnóstico, além de causar várias doenças clínicas em cães (HERNANDEZ; RISCO; DONOVAN, 2001; DE CRAEYE et al., 2011; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2012)

Estima-se que anualmente os custos com infecções/abortos causados por *N. caninum* chegam a 1,1 milhões de dólares na Nova Zelândia, 546,3 milhões nos Estados Unidos, 9,7 milhões de euros na Suíça. O valor total estimado com tais perdas excede os 1.298 bilhões de dólares, podendo chegar a 2.380 bilhões de dólares por ano (HEMPHILL et al., 2013; REICHEL et al., 2013).

Devido à grande importância econômica da neosporose, especialmente na indústria agropecuária, têm sido realizadas pesquisas no sentido de desenvolver estratégias para a prevenção e para o tratamento de infecções caudas por este protozoário. A vacina e intervenções quimioterápicas têm sido relatadas como uma opção economicamente promissoras (HASLER et al., 2006; HASLER et al., 2008).

No entanto, após a retirada da única vacina comercial (Neoguard®) do mercado, devido a sua baixa eficácia, existem poucas opções disponíveis no tratamento da neosporose (WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012).

N. caninum passa a maioria das fases do seu ciclo como um parasito intracelular e só consegue sobreviver e proliferar no interior das células hospedeiras. A compreensão dos processos que levam à invasão e o desenvolvimento intracelular são cruciais para o desenvolvimento de vacinas e intervenções quimioterápicas (HASLER et al., 2006).

Com o intuito de se desenvolver métodos preventivos e terapêuticos eficazes (capazes de quebrarem o ciclo de transmissão e protegerem da infecção) se torna indispensável o entendimento dos mecanismos imunológicos, inatos e adaptativos, envolvidos na resposta imune contra este patógeno.

iNOS desempenha um papel importante no controle de uma variedade de doenças causadas por diferentes microrganismos. No entanto, o envolvimento desta enzima nos processos infecciosos desencadeados por *N. caninum* até o presente momento são desconhecidos.

Portanto, este trabalho é proposto com a finalidade de se buscar informações relevantes dos mecanismos imunológicos desencadeados por *N. caninum* que estão envolvidos na resistência deste protozoário à resposta do hospedeiro durante a infecção, com a intenção de se desenvolver produtos que auxiliem no controle da infecção e de seus efeitos deletérios a bovinocultura.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível durante a infecção experimental de camundongos pelo protozoário *Neospora caninum*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, *in vitro*, o perfil de produção de citocinas de macrófagos derivados da medula óssea, provenientes de camundongos selvagens (WT) e geneticamente deficientes para iNOS (iNOS^{-/-}), após a infecção com taquizoítos de *N. caninum*.
- Avaliar, *in vivo*, a produção local e sistêmica de citocinas após a infecção de camundongos WT e iNOS^{-/-} com taquizoítos de *N. caninum*.
- Avaliar a susceptibilidade de camundongos WT e iNOS^{-/-} a infecções parenterais com taquizoítos de *N. caninum*, por meio de curvas de sobrevida.
- Avaliar o parasitismo nas fases aguda e crônica da infecção por *N. caninum* em camundongos WT e iNOS^{-/-}.
- Avaliar a inflamação tecidual de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*.

4. Materiais e métodos

4.1 Obtenção de camundongos

Camundongos C57BL/6 selvagens e geneticamente deficientes para iNOS, com seis a dez semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com água e ração *ad libitum*, em condições padronizadas de criação. 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 aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de animais da UFU (CEUA / UFU, protocolo número 052/12 – Anexo I).

4.2 Cultura de células

Células de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em garrafas de cultura de tecidos de 25 cm² até atingirem a confluência. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com HEPES (25 mM), L-glutamina (2 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), bicarbonato de sódio (3 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad-CA, EUA). As garrafas de culturas foram mantidas em estufa apropriada, a 37°C e 5% CO₂.

4.3 Cultura de parasitos

Os parasitos do isolado Nc-1 (DUBEY, et al., 1988b) de *N. caninum* foram mantidos em cultura celular, utilizando células HeLa como linhagem hospedeira.

As células foram infectadas com taquizoítas de *N. caninum* e o repique realizado a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugados rapidamente (45 x g por 1 minuto a 4°C) para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado (700 x g por 10 minutos a 4°C) e o sedimento final da suspensão parasitária

foi ressuspensionado em solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2). Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital Azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e imediatamente utilizados para experimentos *in vitro* ou para a realização dos experimentos com camundongos.

4.4 Preparação do antígeno solúvel de *Neospora caninum*

Suspensões parasitárias (1×10^8 taquizoítas/mL) foram tratadas com inibidores de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF] a 1,6 mM, leupeptina a 50 mg/mL e aprotinina a 10 mg/mL) e submetidas a 10 ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após centrifugação ($10.000 \times g$, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de 0,22 μm (filtros Millex, Millipore, EUA), a concentração proteica foi determinada pelo método Bradford (1976) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA). Alíquotas de antígeno solúvel de *Neospora* (NLA) foram utilizadas para estimulação *in vitro* de células.

4.5 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Após a eutanásia, os camundongos foram pulverizados com álcool 70% e os fêmures foram obtidos e dissecados. Foi realizado um corte na articulação fêmoro-tibial, e na articulação coxo-femoral, sem danificar as epífises dos fêmures e foram transferidos para tubos de 15 ml com meio RPMI 1640 incompleto. Em uma câmara de fluxo laminar, os ossos foram colocados em álcool 70% por 1 minuto e as epífises foram cortadas com o auxílio de tesoura e pinça estéreis. Os ossos foram lavados com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto e uma agulha de 26G de diâmetro. A suspensão celular obtida foi centrifugada e ressuspensionada em 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, foram adicionados 4 mL do mesmo meio condicionado por placa e as placas foram mantidas na estufa a 37° e 5% CO₂ por mais 3 dias. No oitavo dia, o sobrenadante das placas de Petri foram descartados e 5 mL

de PBS gelado estéril foram adicionados em cada placa e foram incubados a 4°C por 10 minutos. Os macrófagos foram então removidos.

4.6 Estimulação dos BMDMs com taquizoítos viáveis de *N. caninum* e com NLA

Após a remoção, os macrófagos foram centrifugados a 500 x g por 10 minutos e o pellet obtido foi ressuspensionado em RPMI 1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino e contadas em câmara de Neubauer e a quantidade de 2×10^5 BMDMs/poço foram adicionadas em placas de culturas de 96 poços, em 200 µl de meio RPMI 1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino. Após 24 horas de incubação as células foram infectadas com 2×10^5 taquizoítos de *N. caninum* ou estimuladas com NLA [$10 \mu\text{g ml}^{-1}$]. Seguidos 24 horas de incubação o sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

4.7 Dosagem de Nitrito/Nitrato por método colorimétrico

A dosagem de nitrito/nitrato foi realizada utilizando o kit “*NITRITE/NITRATE, colorimetric method*” (Roche, Suíça), seguindo todas as instruções do fabricante.

4.8 Quantificação de citocinas

As citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12) foram dosadas em amostras de sobrenadante de cultura de macrófagos, soro, exsudato peritoneal e homogenato de tecidos pelos métodos de ELISA e CBA, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, EUA; BD Biosciences, San Diego, EUA). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem das placas com PBS-Twen e bloqueio com soluções bloqueadoras específicas para cada análise, as amostras (sobrenadante de cultura, soro, homogenato) foram adicionadas. 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 biotinizados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H_2O_2 a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA).

Para quantificação de citocinas a partir do *multiplex Cytometric Bead Array* - CBA (BD Biosciences, San Diego, EUA), 1 μ L/teste de cada bead de captura foi misturada e diluída (dilúente de captura) num volume final de 25 μ L. As citocinas murinas recombinantes foram diluídas (dilúente de ensaio) e foram realizadas diluições duplas seriadas para a geração de curvas padrão apropriadas (50 – 0,5 ng/mL), e as amostras foram diluídas no mesmo dilúente. Os anticorpos de detecção foram preparados e diluídos em dilúente de reagente de detecção. O ensaio foi realizado em tubo FACS (BD Biosciences), onde foi acrescentado 25 μ L de beads de captura; 25 μ L curva padrão ou amostras e 25 μ L anticorpo de detecção. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente foi adicionado 500 μ L do tampão de lavagem e centrifugado (200 x g / 5 minutos). Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 300 μ L do tampão e foi realizada a leitura no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences, EUA). Os dados foram processados e analisados utilizando *software* apropriado (FlowJo, TreeStar, EUA).

4.9 Ensaio de sobrevida

Camundongos WT e iNOS^{-/-} foram inoculados com uma dose de taquizoítos letal para 50% dos animais (DL₅₀, 2x10⁷ taquizoítos de *N. caninum*), em um volume de 100 μ L, pela via intraperitoneal. Os animais foram observados diariamente quanto à morbidade, mortalidade e alterações de peso durante 30 dias após o desafio.

4.10 Infecções subletais

Camundongos WT e iNOS^{-/-} foram inoculados com uma dose subletal de taquizoítos de *N. caninum* (1x10⁶) em um volume de 100 µL, pela via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados nos dias 0, 2, 7, 15 e 30 após a infecção (d.p.i) para a coleta de órgãos (fígado, pulmão, baço e SNC), soro e exsudato peritoneal, para posterior dosagem de citocinas.

4.11 Homogenato de órgãos

A cada 500 mg de cada tecido (pulmão, fígado e baço) foram adicionados 500 µl de solução contendo um coquetel de inibidores de proteases (cOmplete; Roche, Suíça). Com o auxílio de um homogeneizador os tecidos foram homogeneizados e logo em seguida foram centrifugados (10000 x g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para posterior dosagem de citocinas.

4.12 Determinação da inflamação tecidual

Amostras do sistema nervoso central de camundongos WT e iNOS^{-/-} foram coletadas em formol 10% tamponado com fosfato e submetidos a procedimentos padrão de inclusão em parafina, corte e coloração com hematoxilina e eosina para avaliação do infiltrado inflamatório (MINEO et al., 2009). Os cortes foram fotografados utilizando o microscópio invertido automatizado (FSX100, Olympus, Japan).

4.13 PCR em tempo real

DNA de *N. caninum* foi quantificado, nas células do lavado peritoneal e no cérebro de camundongos desafiados com taquizoítos de *N. caninum*, por PCR em tempo real, através do sistema de detecção SYBR green, como anteriormente descrito (RIBEIRO et al., 2009). Foram utilizados os seguintes pares de primers: Forward: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; Reverse: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3' (Prodimol Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, MG), para detecção da região Nc5 de *N. caninum*. A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido

cerebral e de uma quantidade de 2×10^6 células utilizando o kit de purificação de DNA genômico (Wizard®, Promega Co., Madison, EUA), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e ajustada para 200 ng/ μ L com água estéril e livre de DNase.

Os ensaios para quantificar a carga parasitária foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a contagem de parasitas foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de taquizoítos do isolado Nc-1 que foi incluída em cada análise. Os resultados foram expressos em picogramas de DNA/200 ng de DNA de tecido cerebral ou 100 ng de DNA de células.

4.14 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) *software FlowJo* (TreeStar, EUA). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto após o desafio e as curvas de sobrevida foram comparadas usando os testes *log rank* e χ^2 . Diferenças entre os grupos na análise de dosagem de citocinas, e carga parasitária foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn, respectivamente, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram considerados significativos 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).

I parte:

5. Resultados *in vitro*

5.1 iNOS modula citocinas em macrófagos

Com o objetivo de avaliarmos o envolvimento da iNOS no perfil de resposta desencadeada em BMDMs. Quantificamos, *in vitro*, a produção das citocinas IL-10, IL-12p40, TNF- α e IL-1 β . Tais citocinas foram quantificadas por ELISA em sobrenadantes de cultura celular provenientes de BMDMs oriundos de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com *N. caninum*. Após 24 horas de infecção com o protozoário, detectou-se uma elevada concentração das citocinas IL-12p40 (Figura 4A), TNF- α (Figura 4B) e IL-1 β (Figura 4C) em sobrenadante de cultura provenientes de BMDMs WT, em comparação a quantidade produzida por macrófagos derivados de camundongos iNOS^{-/-}. De forma contrária, foram detectadas baixas quantidades de IL-10 no sobrenadante de cultura de BMDMs WT (Figura 4D), em relação a quantidade produzida por macrófagos iNOS^{-/-}.

De modo similar, quando estimulados com NLA, macrófagos WT apresentaram altos níveis de IL-12p40 (Figura 5A) e baixos níveis de IL-10 (Figura 5B), se comparados com BMDMs iNOS^{-/-}.

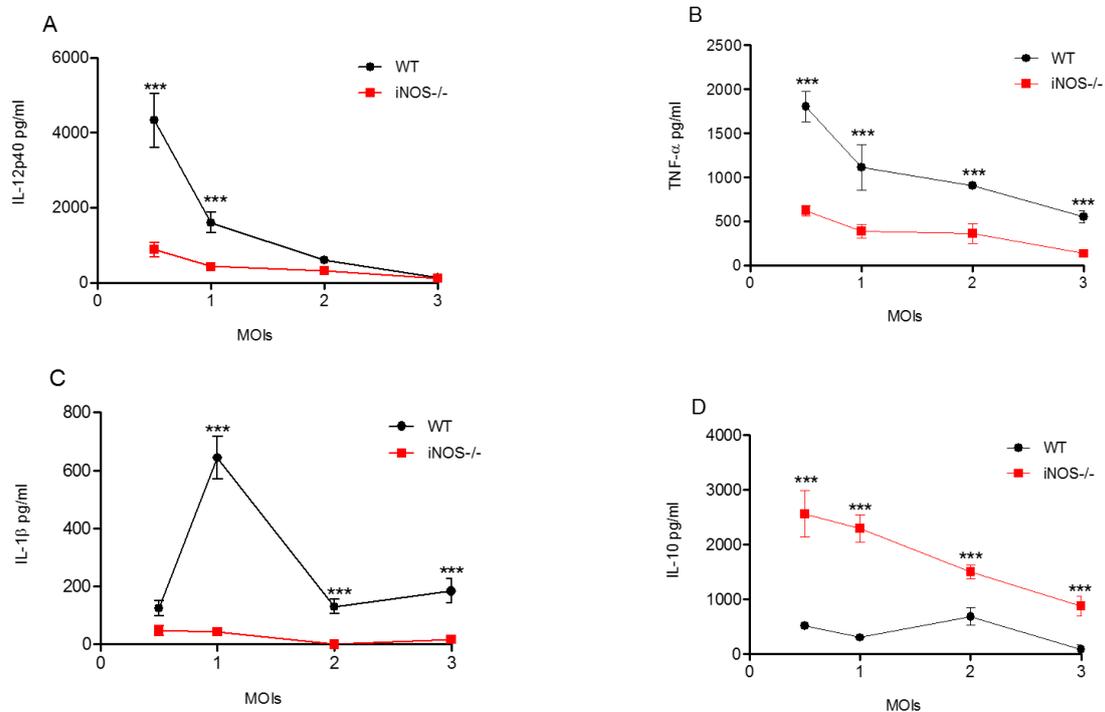


Figura 4. Quantificação da produção de citocinas por ELISA em sobrenadantes de cultura de macrófagos derivados da medula óssea extraídos de camundongos selvagens (WT) e geneticamente deficientes para iNOS (iNOS^{-/-}). Os níveis de (A) IL-12p40, (B) TNF- α , (C) IL-1 β , (D) IL-10 foram determinados em sobrenadante de cultura celular (2×10^5 células/poço), 24 horas após a infecção com *N. caninum* em diferentes proporções (parasito/célula; MOI). Os resultados demonstrados são representativos de três experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

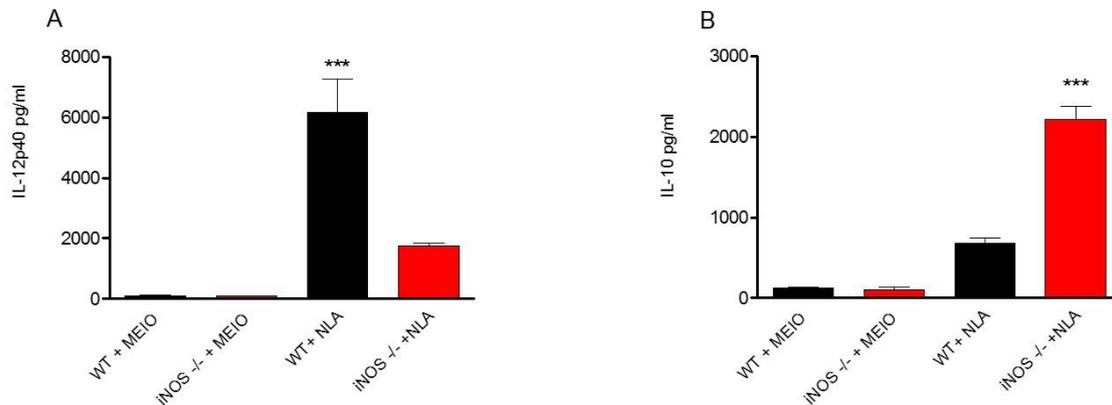


Figura 5. Quantificação da produção de citocinas por ELISA em sobrenadante de cultura de macrófagos derivados da medula óssea extraídos de camundongos selvagens (WT) e geneticamente deficientes para iNOS (iNOS^{-/-}) e estimulados com antígenos solúveis de *Neospora caninum* (NLA). Os níveis de (A) IL-12p40 e (B) IL-10 foram quantificados em sobrenadante de cultura celular (2×10^5 células/poço) por ELISA, 24 horas após estimulação com NLA [$10 \mu\text{g ml}^{-1}$]. Os resultados demonstrados são representativos de três experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

II parte:

6. Resultados *in vivo*

6.1 *N. caninum* induz a produção de NO em camundongos WT

Com o objetivo de avaliarmos se *N. caninum* induz a produção de NO durante a infecção, quantificamos a produção de nitrito e nitrato no exsudato peritoneal (Figura 6A) e homogenato de pulmão (Figura 6B) provenientes de camundongos WT infectados experimentalmente com *N. caninum*. Tais resultados demonstram que *N. caninum* induz a produção robusta de NO nos primeiros 7 dias de infecção no lavado peritoneal de camundongos C57BL/6, enquanto que alterações nos níveis pulmonares, tecido primordialmente afetado durante a infecção aguda, foram imperceptíveis no decorrer da infecção.

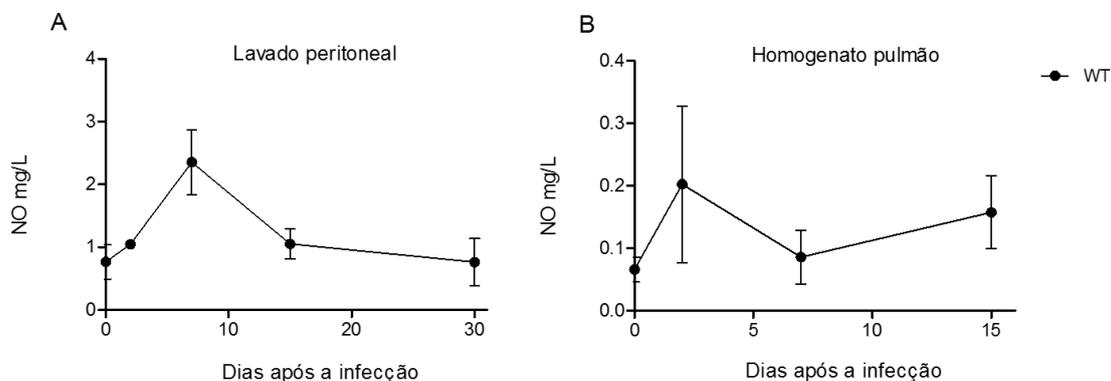


Figura 6. Quantificação de NO em exsudato peritoneal e homogenato de pulmão de camundongos Selvagens (WT) infectados com uma dose subletal de taquizoítos de *N. caninum*. Quantificação da produção de NO em (A) exsudato peritoneal e (B) homogenato de pulmão utilizando métodos colorimétricos. Os resultados demonstrados são representativos de dois experimentos independentes.

6.2 Ausência de iNOS induz um aumento da susceptibilidade de camundongos a infecção parenteral por *N. caninum*

Para se avaliar a importância da iNOS na resistência a infecção por *N. caninum*, camundongos WT e iNOS^{-/-} foram infectados com 2×10^7 taquizoítos de *N. caninum*. Como esperado e pôde ser observado na Figura 7A, quatro de um total de oito camundongos WT infectados sobreviveram durante 30 dias de infecção, enquanto todos os camundongos iNOS^{-/-} submetidos ao mesmo inóculo sobreviveram somente até os 12 dias de infecção.

Objetivando determinar as causas envolvidas nessa maior susceptibilidade dos camundongos iNOS^{-/-}, determinamos a carga parasitaria dos animais WT e iNOS^{-/-} infectados. Para determinação do parasitismo de fase aguda (2 d.p.i), foram coletadas células do lavado peritoneal de animais WT e iNOS^{-/-} infectados com uma dose subletal de taquizoítos (1×10^6 taquizoítos) para a quantificação do DNA genômico por qPCR. Amostras provenientes de camundongos WT apresentaram uma menor quantidade de DNA de *N. caninum* em relação as células de camundongos iNOS^{-/-} (Figura 8A). Para avaliarmos o parasitismo na fase crônica da infecção, foi feita uma cinética, na qual foi coletado amostras do tecido cerebral de animais WT e iNOS^{-/-} (7, 15 e 30 d.p.i) infectados com uma dose subletal de taquizoítos de *N. caninum* e foi quantificada o DNA do parasito. Animais WT apresentaram menos parasitismo no SNC nos dias 7, 15 e 30 após a infecção quando comparados com animais iNOS^{-/-} (Figura 8B).

Geralmente, o aumento da carga parasitaria está relacionada a uma exacerbação da resposta inflamatória, com o recrutamento de células para o sítio de localização do parasito. Em um modelo de infecção subletal (1×10^6 taquizoítos), foi observado que camundongos iNOS^{-/-} (Figura 9 B e D) apresentaram uma elevada quantidade de infiltrados inflamatórios no sistema nervoso central após 30 dias de infecção, principalmente localizado nas meninges, se comparados aos camundongos WT (Figura 9 A e C).

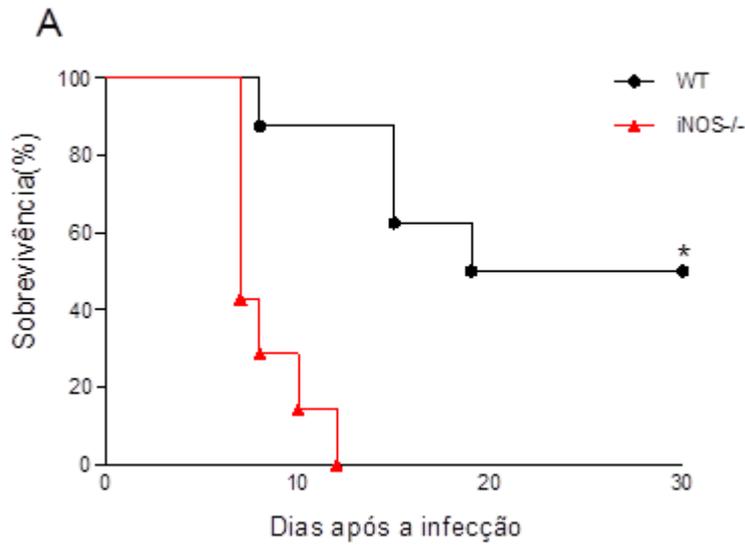


Figura 7. Curva de sobrevivência dos camundongos WT e iNOS^{-/-} após a infecção com uma dose de taquizoítos de *N. caninum* capaz de matar 50% dos animais (DL₅₀). Camundongos WT e iNOS^{-/-} foram infectados com 2×10^7 taquizoítos de *N. caninum* e a curva de sobrevivência foi determinada por 30 dias após a infecção.

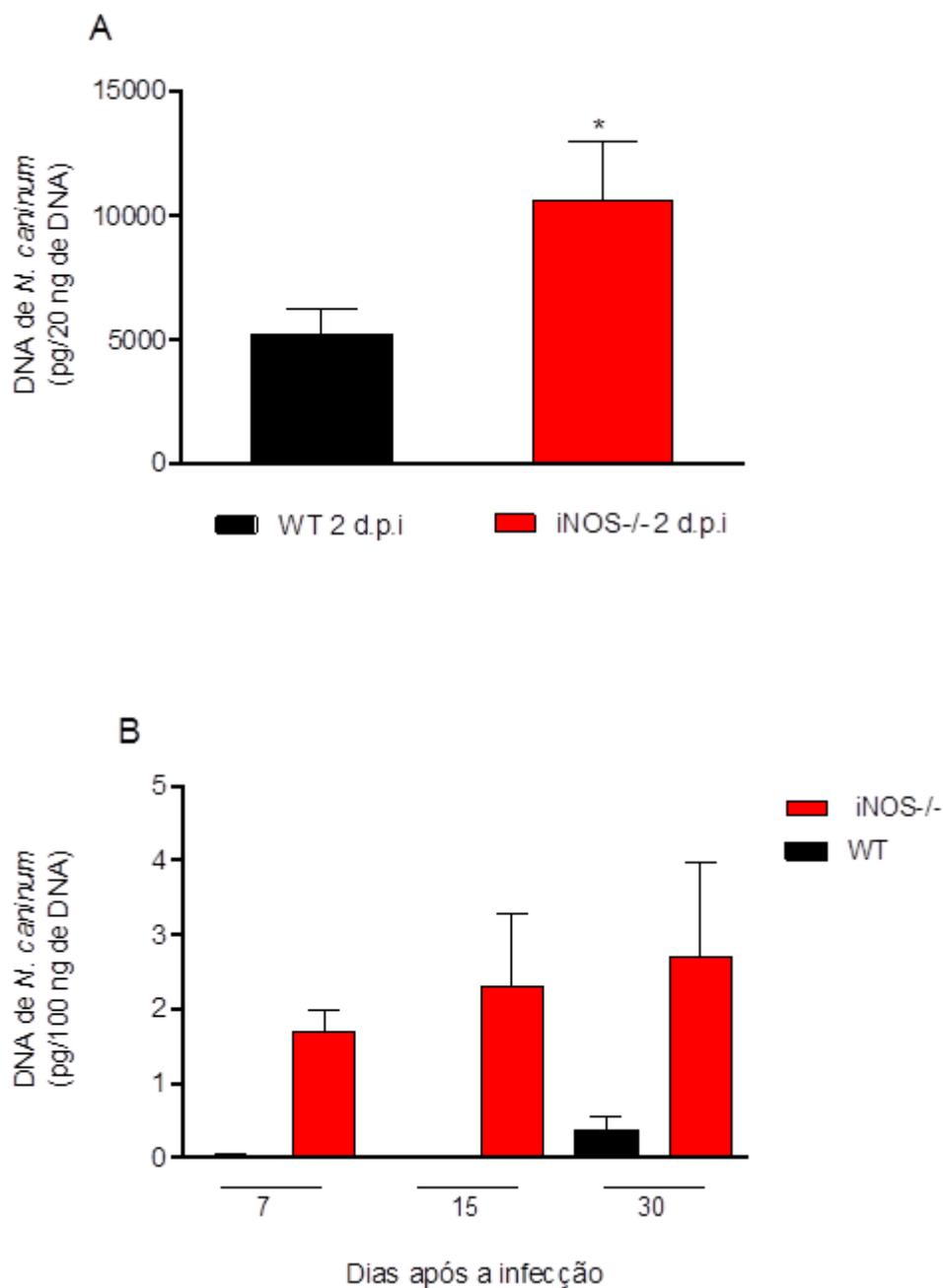


Figura 8. Carga parasitária das células do lavado peritoneal e do SNC de camundongos experimentalmente infectados com *N. caninum*. A concentração de DNA parasitária foi determinada pela amplificação da sequência Nc5 (qPCR) em (A) células do lavado peritoneal (2 d.p.i) e (B) SNC (7, 15 e 30 d.p.i) de animais WT e iNOS^{-/-} infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados demonstrados são representativos de dois experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

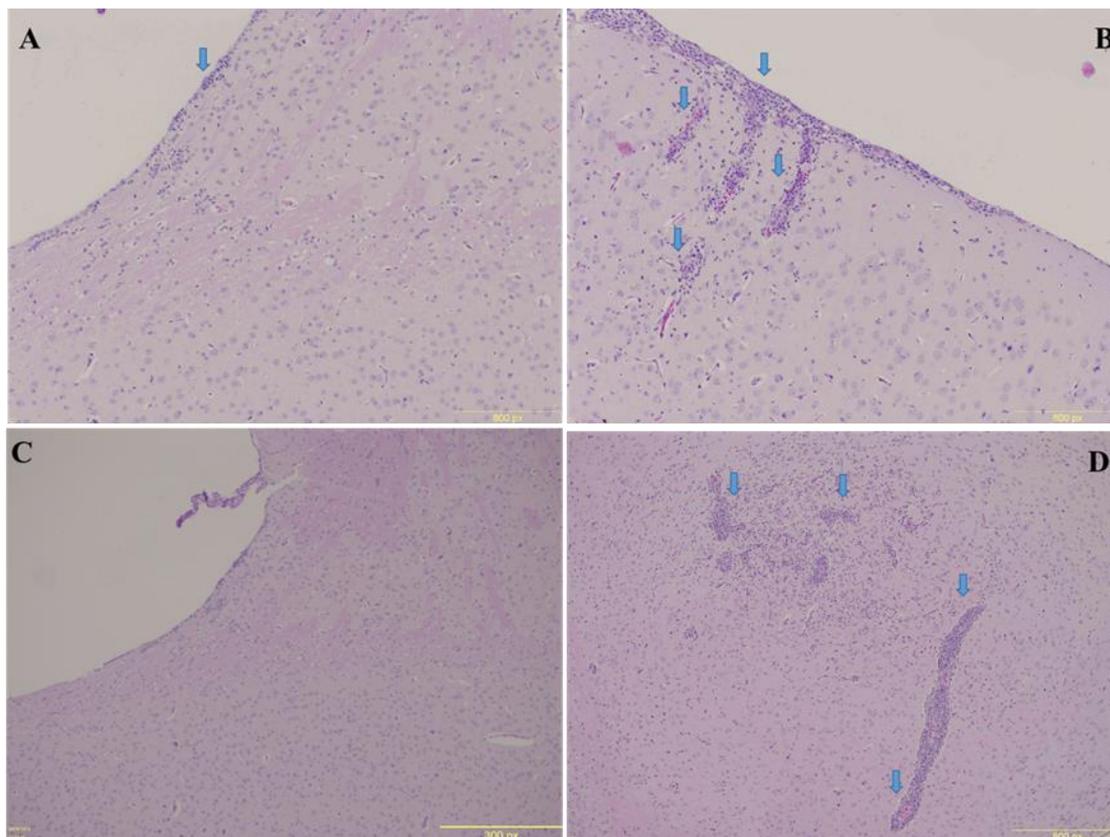


Figura 9. Representação de infiltrados inflamatórios no SNC de camundongos WT e iNOS^{-/-} cronicamente infectados com *N. caninum*. Após 30 dias de infecção, alterações histológicas foram analisadas no SNC de amostras provenientes de camundongos (A e C) WT e (B e D) iNOS^{-/-} infectados com uma dose subletal de taquizoítos. As lamínas foram coradas com hematoxilina-eosina. Setas azuis, indicam áreas de infiltração celular. [A (800 px) e C (300 px)] WT e [B (800 px) e D (800 px)]

6.3 Camundongos iNOS^{-/-} apresentam um aumento na produção local e sistêmica de citocinas em resposta a infecção

Com o intuito de avaliarmos o papel da iNOS na modulação da produção de citocinas no sítio de infecção, foi comparada a cinética de produção de IL-12p40, IL-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ . Tais citocinas foram quantificadas em exsudato peritoneal provenientes de camundongos WT e iNOS^{-/-} após a inoculação de uma dose subletal de taquizoítos de *N. caninum*. Detectou-se uma baixa produção das citocinas IL-12p40 (Figura 10A), IL-6 (Figura 10B), e IFN- γ (Figura 10C) em exsudato peritoneal de camundongos WT, em comparação a quantidade produzida em exsudato peritoneal de camundongos iNOS^{-/-}. Apesar dos camundongos WT apresentarem um nível basal de IL-10 menor em relação aos camundongos iNOS^{-/-}, esse perfil mudou com o decorrer da infecção e no dia 15 após a infecção, pode-se observar que os camundongos WT apresentaram uma maior produção de IL-10, em comparação aos camundongos iNOS^{-/-} (Figura 10D). Apesar dos camundongos WT apresentarem níveis de IL-1 α ligeiramente inferiores aos iNOS^{-/-}, não houve diferença significativa na produção desta citocina entre os dois grupos de animais (Figura 10E). IL-1 β não foi detectada em amostras provenientes de camundongos WT e animais iNOS^{-/-}.

O gráfico em radar resume a cinética das citocinas dosadas em exsudato peritoneal provenientes de camundongos WT e iNOS^{-/-} após a inoculação de uma dose subletal de taquizoítos de *N. caninum*. As Figuras 11 A, B, C, D demonstram uma menor produção de citocinas inflamatórias nos primeiros dias de infecção em camundongos WT se comparados com camundongos iNOS^{-/-}.

Após observarmos a produção de elevadas quantidades de citocinas pró-inflamatórias no sítio de infecção de camundongos iNOS^{-/-} em relação aos animais controles. Foi quantificada a produção sistêmica das citocinas IFN- γ , e IL-12p40 por ELISA (Figura 12A e 12B) e de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-2, IL-4 e IL-10 por CBA (Figura 13 A-D) em soros provenientes de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com doses subletais de taquizoítos viáveis.

Nas Figuras 12A e 12B, pode-se observar uma menor quantidade nos níveis de IL-12p40 e IFN- γ em soros provenientes de camundongos WT, em relação aos soros provenientes de camundongos iNOS^{-/-}.

Nas Figuras 13A, B, C e D nota-se que durante os estágios iniciais de infecção, os camundongos WT produziram baixas quantidades de INF- γ , TNF- α e IL-6, quando comparados aos animais iNOS^{-/-}. Numa fase mais tardia da infecção, detectou-se baixas quantidades de IL-4, IL-10 e IL-17 A em soros provenientes de camundongos WT, quando comparada a quantidade produzida em soros de camundongos iNOS^{-/-}.

Pulmão, fígado e baço são órgãos alvos e geralmente acometidos pela infecção por *N. caninum*. Assim sendo, avaliou-se a produção de IL-12p40 e IFN- γ em homogenato proveniente destes órgãos, por ELISA. De modo geral, camundongos WT infectados apresentaram menores quantidades de IL-12p40 (Figura 14 A, B e C) e IFN- γ (Figura 15 A, B e C), em homogenato de tais órgãos, em relação aos camundongos iNOS^{-/-} infectados.

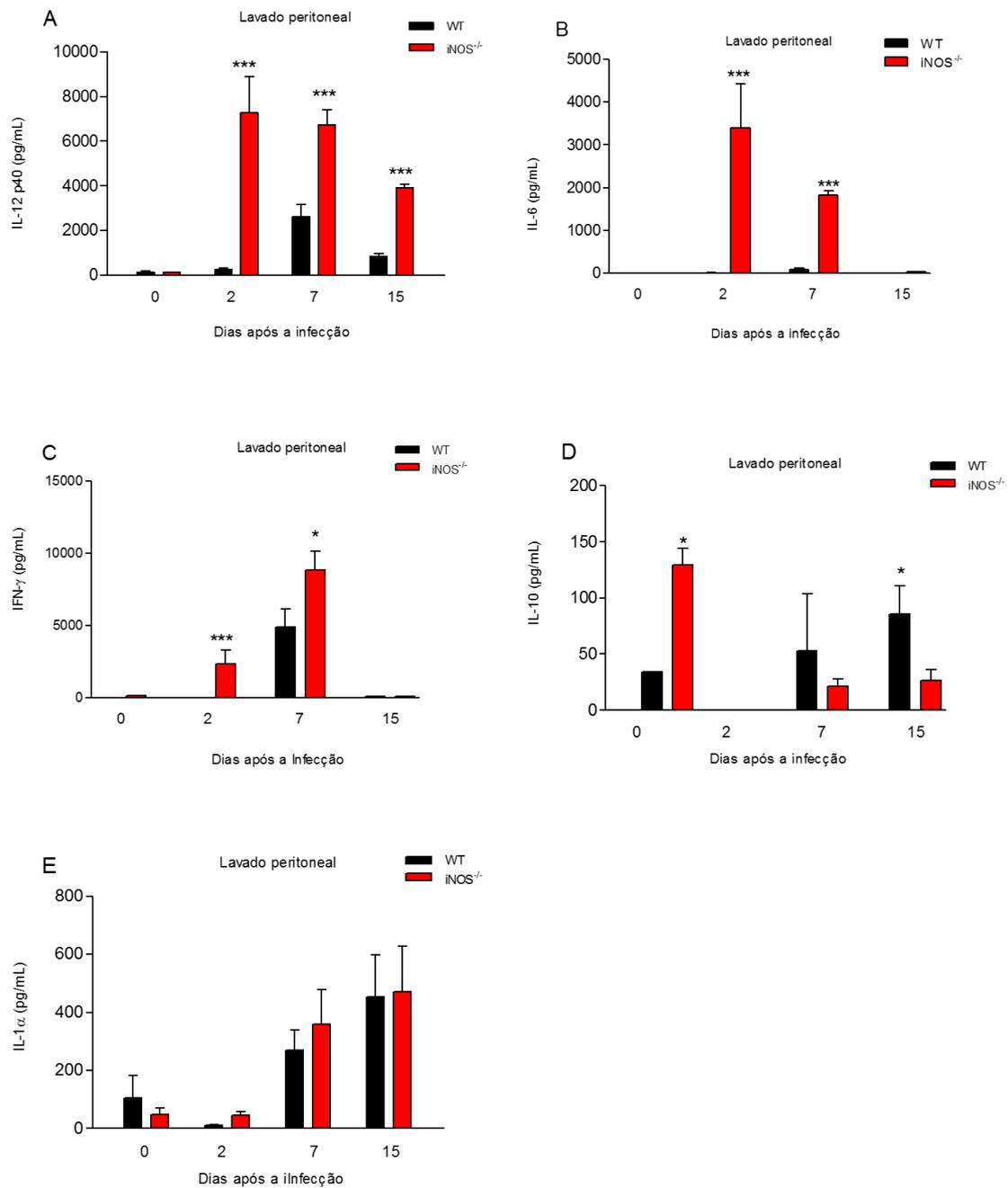


Figura 10. Quantificação de citoninas por ELISA em lavado peritoneal proveniente de camundongos WT e iNOS^{-/-} experimentalmente infectados com *N. caninum*. Os níveis de (A) IL-12p40, (B) IL-6, (C) IFN γ , (D) IL-10, (E) IL-1 α foram quantificados em exsudato peritoneal provenientes de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados demonstrados são representativos de dois experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

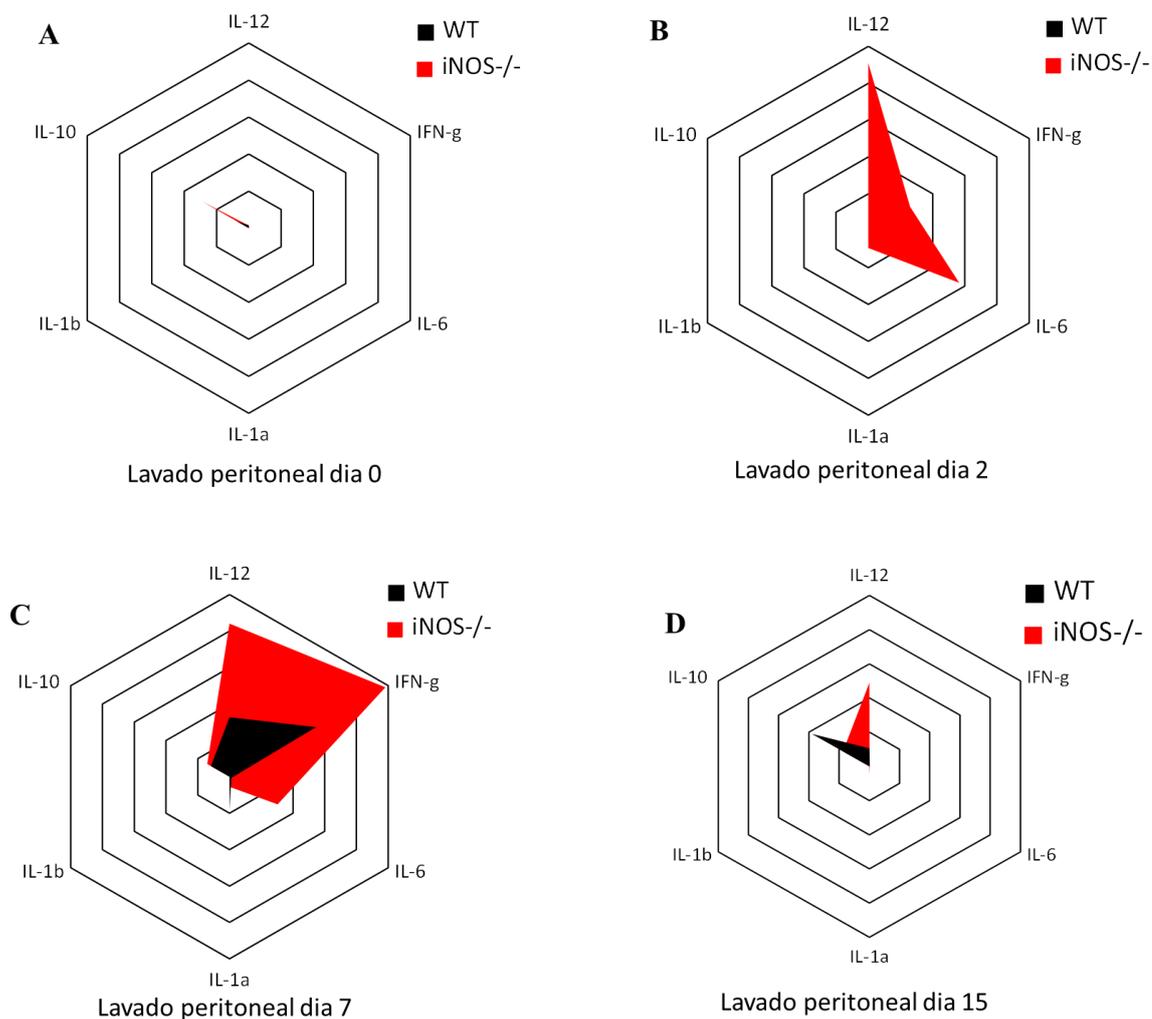


Figura 11. Quantificação da produção de citoninas por ELISA em exsudato peritoneal proveniente de camundongos WT e iNOS^{-/-} experimentalmente infectados com *N. caninum*. As figuras A, B, C e D resumem o perfil de citocinas produzidas em exsudato peritoneal de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*.

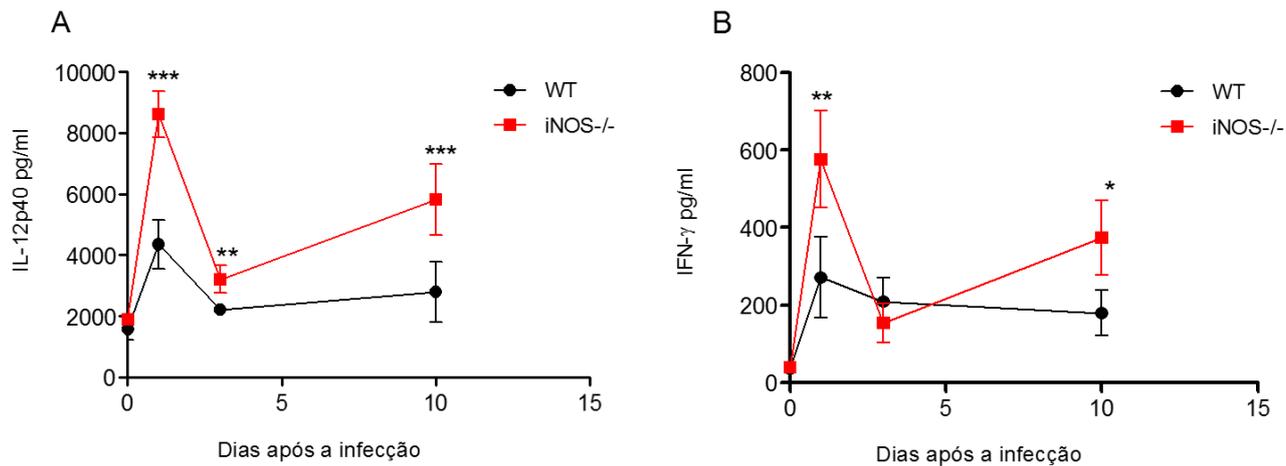


Figura 12. Quantificação de citoninas por ELISA em soros provenientes de camundongos WT e iNOS^{-/-} experimentalmente infectados com *N. caninum*. Os níveis de (A) IL-12p40 e (B) IFN- γ foram quantificados em soros provenientes de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados demonstrados são representativos de três experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

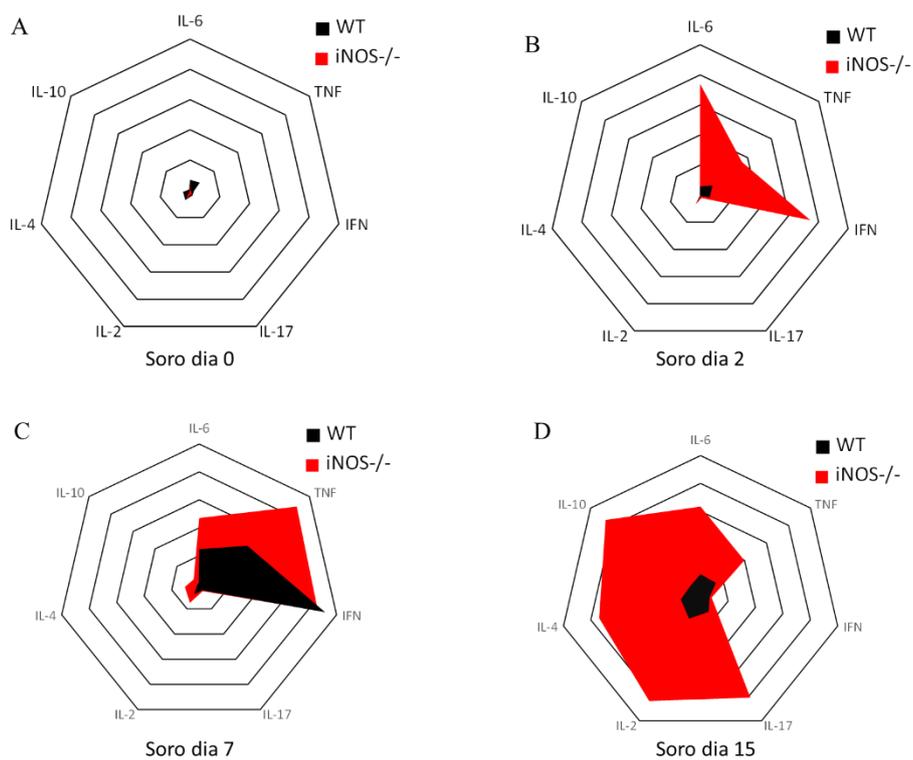


Figura 13. Quantificação de citoninas, por CBA, em soro proveniente de camundongos WT e iNOS^{-/-} experimentalmente infectados com *N. caninum*. Os gráficos em radar representam os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-2, IL-4 e IL-10 quantificados em soro proveniente de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados demonstrados são representativos de dois experimentos independentes.

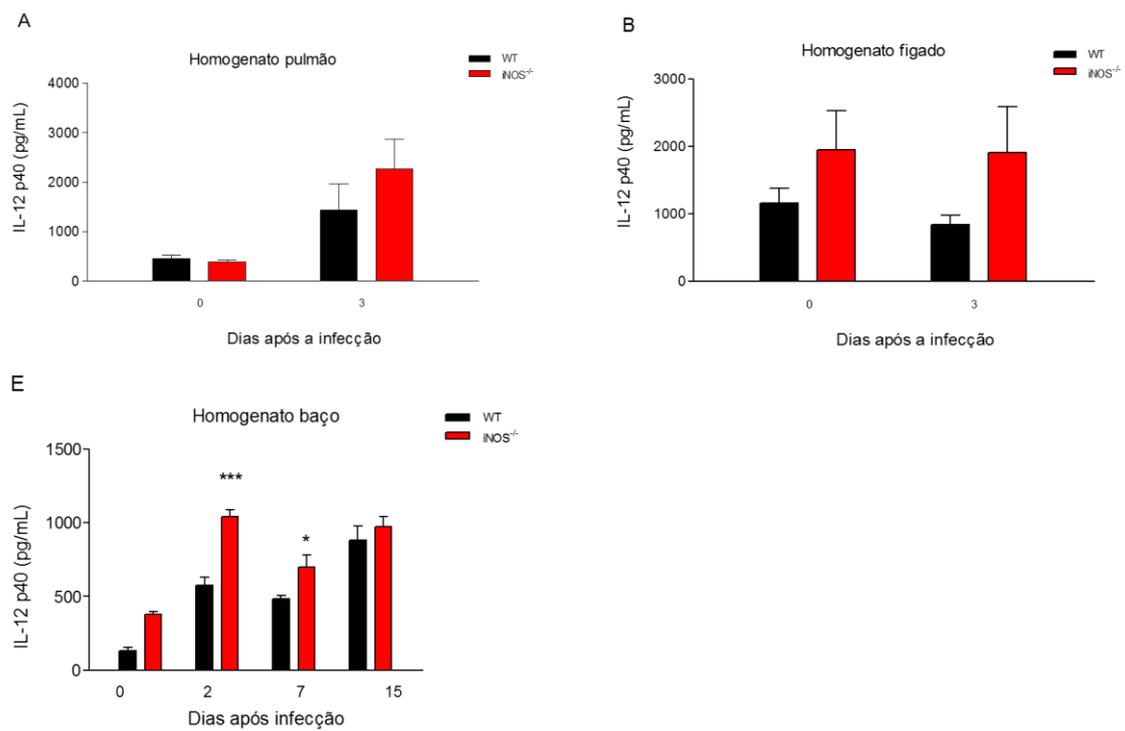


Figura 14. Quantificação de citoninas em homogenato de órgãos. Foram quantificados os níveis de IL-12p40 em homogenato de (A) pulmão, (B) fígado e baço (C) de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados demonstrados são representativos de três experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

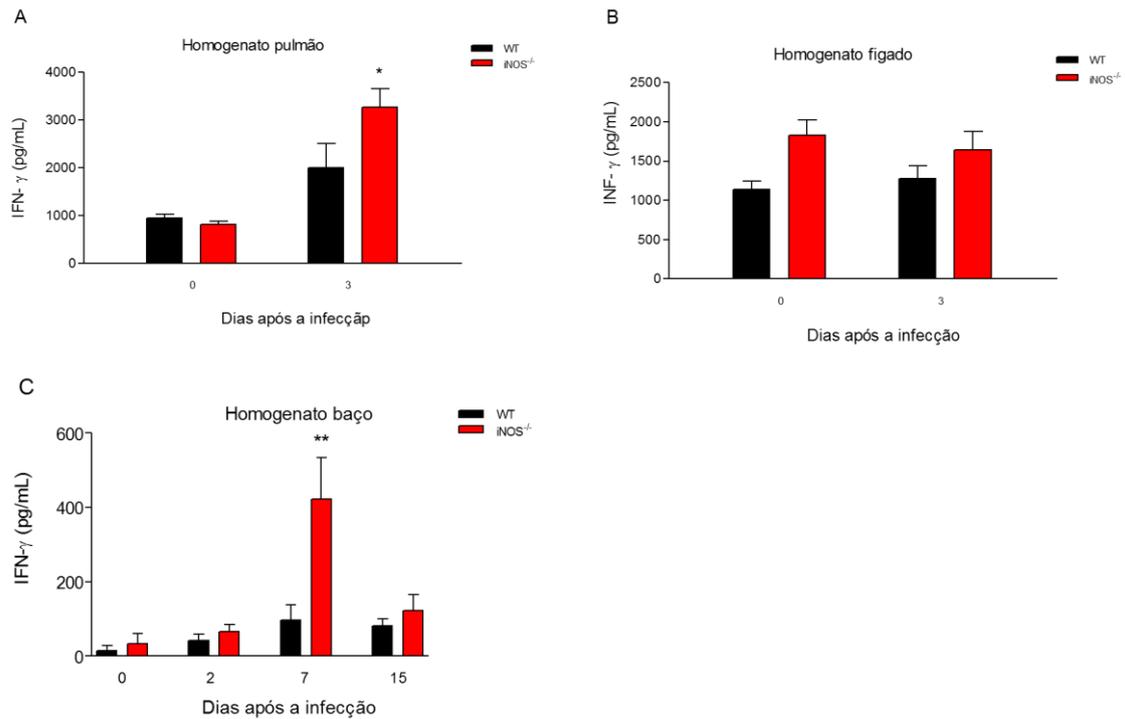


Figura 15. Quantificação de citoninas em homogenato de órgãos. Foram quantificados os níveis de IFN- γ em homogenato de (A) pulmão, (B) fígado e (C) baço de camundongos WT e iNOS^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados demonstrados são representativos de três experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. * indica diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

7 Discussão

Devido ao impacto bilionário da neosporose na bovinocultura, pesquisas para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção e para o tratamento de infecções causada por *N. caninum* se tornam necessárias (HEMPHILL; GOTTSSTEIN, 2000; REICHEL et al., 2013). Propostas de preparado vacinais e intervenções quimioterápicas têm sido relatadas como opções economicamente promissoras, contudo ainda indisponível comercialmente (MILLER et al., 2005; HASLER et al., 2008; MONNEY; HEMPHILL, 2014). Para isso, se torna necessário o entendimento dos mecanismos imunológicos desencadeadas após a interação parasito-hospedeiro, com o intuito de se desenvolver métodos preventivos e terapêuticos eficazes, capazes de quebrarem o ciclo de transmissão, que levam à invasão e ao desenvolvimento intracelular do parasito, protegendo assim da infecção causada por este patógeno (HASLER et al., 2006).

Com tal intenção, nós utilizamos modelos experimentais em camundongos na tentativa de avaliarmos a importância da iNOS durante a infecção por *N. caninum*. Muitos estudos já demonstraram a importância da iNOS no controle de doenças causadas por uma variedade de microrganismos, como *T. gondii* (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997), *Leishmania major* (LIEW et al., 1990), *Salmonella typhimurium* (MASTROENI et al., 2000), *Paracoccidioides brasiliensis* (LIVONESI et al., 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (MISHRA et al., 2013), dentre outros.

A indução da expressão da iNOS em macrófagos leva a produção de grandes quantidades de NO, que funcionam como um dos principais mecanismos efetores destas células contra microrganismos e algumas células tumorais (FORSTERMANN; SESSA, 2012).

Os altos níveis de NO produzidos por macrófagos ativados, neutrófilos e outras células, via iNOS, não são tóxicos apenas para os micróbios e células tumorais, mas podem prejudicar as células saudáveis. *In vivo*, danos teciduais podem ser relacionados a própria liberação do NO, ou a interação do NO com O_2^- levando a formação de peroxinitrito (ONOO⁻). A grande maioria das doenças inflamatórias ou autoimunes são caracterizadas pela ativação exagerada dos macrófagos e neutrófilos, levando a produção de altas concentrações de NO produzidos via iNOS que causam danos teciduais (FEHSEL et al., 1993; KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1998; FORSTERMANN; SESSA, 2012).

Os macrófagos estão presentes em quase todos os tecidos e desempenham um importante papel na manutenção da homeostase tecidual (HAO et al., 2012). Eles são componentes essenciais da imunidade inata e desempenham um papel central na inflamação e consequente proteção do hospedeiro (GORDON; MARTINEZ, 2010). Em resposta a diferentes estímulos e condições ambientais, tais como, presença de citocinas, sinais provenientes de patógenos, danos teciduais e ativação de linfócitos (SICA; MANTOVANI, 2012; MANTOVANI et al., 2013), monócitos/macrófagos “são reprogramados” levando ao aparecimento de uma gama de fenótipos funcionais distintos. Espelhado na nomenclatura Th1/Th2, os macrófagos podem ser ativadas pela via clássica M1 ou pela via alternativa M2 (MANTOVANI et al., 2002; GORDON; TAYLOR, 2005). Macrófagos M1 desempenham funções pro-inflamatórias e podem ser estimulados pela citocina IFN- γ sozinha ou em associação com LPS, por TNF e pelo fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. A IL-4 e a IL-13, induzem a via alternativa de ativação de macrófagos (M2), que contribuem para a resolução da inflamação (GORDON, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado uma interação entre células-tronco mesenquimais (MSCs) e macrófagos (FRANCOIS et al., 2012; NAKAJIMA et al., 2012; FREYTES et al., 2013). Co-cultivo de MSCs com macrófagos, induzem um perfil regulatório nos macrófagos, via aumento da expressão de IL-10 e redução dos níveis de TNF- α , IL-12 e diminuição da expressão da molécula co-estimulatória CD-86 (MAGGINI et al., 2010). Foram feitos experimentos, onde BMDMs foram estimulados com IFN- γ , LPS ou IL-4 em conjunto ou na ausência de MSCs e foram analisados a presença dos marcadores do perfil M1 (IL-6, IL-1 β e MCP-1) e M2 (IL-10, IL-4R e CD206). Os marcadores M1 foram altamente expressos quando BMDMs foram estimulados com IFN- γ /LPS, no entanto, houve uma diminuição significativa na expressão dos seus níveis de mRNA quando foram co-cultivados com MSCs. Quando os BMDMs foram estimulados com IL-4 e co-cultivados com MSCs houve um grande aumento na expressão dos marcadores M2. Estes resultados demonstraram que o co-cultivo dos BMDMs com MSCs, leva a inibição dos marcadores M1 e estimulam os marcadores M2 (CHO et al., 2014).

Tanto iNOS quanto Arginase 1 (Arg1) utilizam L-arginina como substrato. No entanto, o comprometimento com os fenótipos M1 e M2 determina a expressão diferencial de ambas as enzimas. Através da análise da expressão de iNOS e de Arg1 em

BMDMs ativadas, cultivadas na presença ou na ausência de MSCs, foi observado uma diminuição da expressão de mRNA de iNOS, induzida por IFN- γ /LPS, após o co-cultivo com MSCs. Em contraste, houve um aumento na expressão de mRNA de Arg1, após BMDMs estimuladas com IFN- γ /LPS serem co-cultivadas com MSCs (CHO et al., 2014).

O uso sulfassalazina (agente anti-inflamatório) em Macrófagos J774 estimulados com IFN- γ /LPS suprime a expressão da iNOS e consequentemente a produção de NO, diminui os níveis de IL-12 e a expressão de MHC-II induzida por IFN- γ (HASKO et al., 2001). A ativação de MAPKs p38, p42/44 e a fosforilação de JNK são importantes durante a ativação do macrófago (LEE; YOUNG, 1996; FIRESTEIN; MANNING, 1999; KOTLYAROV et al., 1999). Estimulação de macrófagos peritoneais com IFN- γ /LPS e o subsequente tratamento das mesmas com sulfassalazina, 30 minutos após a estimulação leva a uma falha da ativação dessas vias de sinalização intracelular. Possivelmente os efeitos da sulfassalazina na diminuição da produção de NO e nos níveis de IL-12 estão relacionados com a falha na ativação de MAPKs p38, p42/44 e a fosforilação de JNK (HASKO et al., 2001).

Células supressoras derivadas da linhagem mieloide (monócitos Gr-1⁺CD115⁺) apresentam um perfil M2 em camundongos portadores de tumor, com baixa expressão de iNOS e alta expressão da arginase 1. Tratamento dos monócitos Gr-1⁺CD115⁺ com LPS levou ao aumento da expressão da iNOS, IL-6, TNF, IL-12 via a MAPK p38, em comparação com as células não tratadas. Os resultados demonstraram que o tratamento dos monócitos Gr-1⁺CD115⁺ com LPS levou a alteração do perfil M2 para o perfil M1 via MAPK p38 (YANG et al., 2013).

Os resultados dos BMDMs estimulados com taquizoitos de *N. caninum* obtidos aqui, demonstram o envolvimento da iNOS, na polarização do perfil de ativação dos macrófagos e, consequentemente, no perfil de citocinas produzidas pelas mesmas. Nota-se, que na ausência da iNOS, tanto os BMDMs estimados com taquizoitos de *N. caninum*, como os estimulados com NLA produziram uma menor quantidade de citocinas inflamatórias (IL-12, TNF- α , IL-1 β) e produziram uma maior quantidade de IL-10, em comparação com BMDMs provenientes de animais do tipo selvagem. Vinculando os nossos resultados, *in vitro*, aos resultados relatados nos trabalhos mencionados, nós hipotetizamos, que a iNOS está envolvida na polarização de BMDMs para um perfil M1, uma vez que BMDMs provenientes de animais deficientes para o gene da iNOS

apresentaram uma diminuição na produção de citocinas inflamatórias e um aumento da expressão de IL-10 em relação aos BMDMs provenientes de animais selvagens.

Além dos já citados, outros trabalhos existentes na literatura (MASON et al., 2004; ZHU et al., 2006; KIM et al., 2013; GUTIERREZ-VENEGAS et al., 2014) têm demonstrado o envolvimento de MAPK p38 no perfil de ativação de macrófagos e na determinação do perfil de citocinas gerado pelas mesmas. Na falta de dados comprovatórios, aqui, podemos apenas supor que talvez essa seja a via de sinalização determinante do perfil de polarização (M2) dos BMDMs provenientes de animais *iNOS*^{-/-} e, conseqüentemente das citocinas geradas pelas mesmas quando infectados com taquizoítos de *N. caninum*.

Nossos resultados demonstram que camundongos WT e *iNOS*^{-/-} apresentaram maior taxa de infiltração celular no cérebro, caracterizando um quadro de inflamação com conseqüentes lesões cerebrais. Quando estimulados com uma dose letal para 50% dos animais, todos os camundongos *iNOS*^{-/-} foram a óbito ainda nos primeiros 12 dias de infecção. Acreditamos que esse fato se deve a dois principais fatores:

Primeiro, a demonstração da existência de uma maior carga parasitária nos animais deficientes para o gene da *iNOS* sugerem uma falha no controle da multiplicação do parasito na ausência da *iNOS*, o que provavelmente levou a invasão de diferentes órgãos e tecidos resultando em lesões oriundas da multiplicação e propagação do parasito.

Em segundo lugar, como conseqüência dessa maior carga parasitária existente nesses animais, houve uma produção exagerada de citocinas inflamatórias, no início da infecção, na tentativa de controlar a proliferação do parasito o que pode ter causado lesões por todo o organismo.

Essa exagerada produção de citocinas com um perfil inflamatório vinculada a uma maior carga parasitaria e infiltração celular, nos animais *iNOS*^{-/-} nos leva a crer que esses animais foram a óbito em função de lesões originárias da multiplicação parasitária e dos efeitos deletérios da resposta inflamatória.

Tem sido reportado que o NO gerado pela *iNOS* durante a infecção determina o perfil de resposta imune. Em altas concentrações, NO produzido por macrófagos murinos ativados podem restringir a expansão de células T e inibir a síntese de IL-12. Ao passo que, em baixas concentrações, NO aumenta a resposta do tipo Th1 e a produção das citocinas IL-12 e IFN- γ (MILLS, 1991; HUANG et al., 1998; NIEDBALA et al., 1999; NIEDBALA et al., 2002).

Células do baço apresentam uma maior proliferação em resposta à mitógenos, antígenos de histocompatibilidade, ou produtos bacterianos, quando são tratados com L-NMMA, ou quando iNOS é inativado geneticamente (HOFFMAN et al., 1990; ALBINA; ABATE; HENRY, 1991; MILLS, 1991; GREGORY et al., 1993; WEI et al., 1995). O mesmo se aplica aos superantígenos: a inibição da iNOS aumenta drasticamente a liberação de IFN- γ , TNF- α e aumenta a mortalidade durante a síndrome do choque tóxico (FLORQUIN et al., 1994).

Citocinas pró-inflamatórias desempenham um importante papel no recrutamento e na ativação de leucócitos no sítio da infecção (ECHTENACHER et al., 1990; ESKANDARI et al., 1992; LEE; HONG; SEO, 2000). TNF- α e IFN- γ atuam na expressão de quimiocinas, que desempenham um papel crucial na quimioatração de leucócitos durante a resposta inflamatória (SALLUSTO et al., 1999; LEE; HONG; SEO, 2000).

IL-12 desempenha um papel chave na imunomodulação, a sua principal função consiste na indução da produção de IFN- γ , pelas células NK e, na conversão de células T naive em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de INF- γ (GATELY et al., 1998; MARCAIS et al., 2013). IFN- γ tem sido apontada como a principal citocina envolvida na resistência a infecção por *T. gondii* (SUZUKI et al., 1988; GE et al., 2014).

Juntos, IL-12 e IFN- γ constituem os principais mediadores envolvidos na proteção do hospedeiro contra infecções causadas por protozoários (BIRON; GAZZINELLI, 1995; HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006; MINEO et al., 2010). O estabelecimento precoce da imunidade constitui uma etapa crucial no estabelecimento de um balço parasito/hospedeiro. Na ausência da imunidade inata, semelhante ao caso da depleção de células NK, o controle inicial da replicação de *T. gondii* via IFN- γ é comprometida, resultando no óbito do hospedeiro (SHER et al., 1993; HUNTER et al., 1994; ALIBERTI, 2005). A IL-12 é produzida *in vivo* e *in vitro* por uma variedade de tipos celulares, incluindo células B, macrófagos, neutrófilos e principalmente células dendríticas e, animais que apresentam deficiência genética para esta citocina são extremamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1994).

Foi demonstrado que animais WT e iNOS^{-/-} infectados com *T. gondii* produzem níveis semelhantes de IL-12 e IFN- γ no soro ou em cultura celular. No entanto, o tratamento com anticorpos contra IL-12 e IFN- γ aumentou a mortalidade dos animais iNOS^{-/-}, que apresentaram uma cinética semelhante aos animais WT tratados com os mesmos anticorpos, concluindo desta forma, que os animais iNOS^{-/-} e WT controlam a

replicação do parasito na fase aguda da infecção por um mecanismo dependente de IL-12 e IFN- γ (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997).

Os resultados aqui obtidos, demonstram que na ausência da iNOS, camundongos apresentaram uma elevada produção de citocinas pro-inflamatórias no sitio da infecção, no soro e no homogenato de diferentes órgãos, nas fases iniciais da infecção.

Vinculados as publicações existentes na literatura, mencionadas acima, os nossos resultados sugerem que a iNOS possui um efeito imunomodulatório na produção de citocinas durante a infecção por *N. caninum*. Tal fato provavelmente se deve a ausência de controle da carga parasitária em camundongos iNOS^{-/-}, em comparação com os animais do tipo selvagem, confirmando que iNOS e seus produtos desempenham um papel importante no controle da multiplicação e propagação do parasito. Nós acreditamos que a elevada carga parasitária presente nos animais iNOS^{-/-} contribuiu com a estimulação da produção de elevadas taxas de citocinas inflamatórias. Tal fato se deve provavelmente a um mecanismo compensatório do hospedeiro, na tentativa de controlar a proliferação parasitaria e garantir a sobrevivência do mesmo.

Numa fase intermediária da infecção (15 dias), podemos observar em amostras de soro de camundongos iNOS^{-/-} uma sobreposição da produção de citocinas com o perfil Th1 associada ao aumento da produção de citocinas com perfil Th2 e Th17.

Acreditamos que esse fato se deve a um maior recrutamento de células adaptativas na tentativa de restabelecer a homeostase, após as possíveis lesões causadas pela produção de grande quantidade de citocinas inflamatórias, e pela multiplicação e propagação do parasito.

8 Conclusão

Embasado nos resultados aqui obtidos, podemos concluir que:

- iNOS é importante na modulação do perfil de citocinas produzida por macrófagos;
- A presença de iNOS induz controle do parasitismo agudo e crônico frente a infecção por *N. caninum*;
- iNOS é importante na modulação da resposta imune durante a infecção por *N. caninum*, por regular negativamente a produção de citocinas *in vivo* e, consequentemente, os fatores deletérios de uma resposta inflamatória exacerbada;

9 Referências

- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 675-680, 2001.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 499-511, 2004.
- ALBINA, J. E.; ABATE, J. A.; HENRY, W. L., JR. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 144-148, 1991.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 162-170, 2005.
- ANTONELLO, A. M.; PIVOTO, F. L.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; POMPERMAYER, E.; VOGEL, F. S. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 367-370, 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.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARE, J.; LAMOTHE, P.; SAUVE, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 1803-1806, 2001.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 71, p. 236-242, 1994.
- BASZLER, T. V.; LONG, M. T.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1635-1646, 1999.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **The American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1424-1437, 1996.

BIAN, K.; GHASSEMI, F.; SOTOLONGO, A.; SIU, A.; SHAUGER, L.; KOTS, A.; MURAD, F. NOS-2 signaling and cancer therapy. **IUBMB life**, v. 64, p. 676-683, 2012.

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

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.

BJORKMAN, C.; MCALLISTER, M. M.; FROSSLING, J.; NASLUND, K.; LEUNG, F.; UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 15, p. 3-7, 2003.

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p. 1707-1715, 2000.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 64-76, 2000.

BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 3-9, 1998.

BOYSEN, P.; KLEVAR, S.; OLSEN, I.; STORSET, A. K. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 953-960, 2006.

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.

CAU, S. B.; CARNEIRO, F. S.; TOSTES, R. C. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 218, 2012.

CHAKRAVORTTY, D.; KATO, Y.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; MU, M. M.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. The inhibitory action of sodium arsenite on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 267.4 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 2011-2017, 2001.

CHAN, E. D.; MORRIS, K. R.; BELISLE, J. T.; HILL, P.; REMIGIO, L. K.; BRENNAN, P. J.; RICHES, D. W. Induction of inducible nitric oxide synthase-NO* by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF-kappaB signaling pathways. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2001-2010, 2001.

CHERAYIL, B. J.; MCCORMICK, B. A.; BOSLEY, J. *Salmonella* enterica serovar typhimurium-dependent regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages by invasins SipB, SipC, and SipD and effector SopE2. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5567-5574, 2000.

CHO, D. I.; KIM, M. R.; JEONG, H. Y.; JEONG, H. C.; JEONG, M. H.; YOON, S. H.; KIM, Y. S.; AHN, Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 46, p. e70, 2014.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ARRIGHI, R. B.; ALVAREZ-GARCIA, G.; WEIDNER, J. M.; REGIDOR-CERRILLO, J.; BOOTHROYD, J. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BARRAGAN, A. Infected dendritic cells facilitate systemic dissemination and transplacental passage of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* in mice. **PloS One**, v. 7, p. e32123, 2012.

CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 3873-3881, 2001.

DAFF, S. NO synthase: structures and mechanisms. **Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society**, v. 23, p. 1-11, 2010.

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

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; CAMPOS, M. A.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; BIEKER, U.; RESENDE, M. G.; MANSUR, D. S.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1129-1137, 2007.

DENICOLA, A.; SOUZA, J. M.; RADU, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3566-3571, 1998.

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.

DLASKA, M.; WEISS, G. Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 6171-6177, 1999.

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 experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988b.

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

DUBEY, J. P. Neosporosis--the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1485-1488, 1999.

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

DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C.; KWOK, O. C.; HILL, D. E.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S.; GREENE, C. E. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1157-1167, 2004.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 21, p. 473-483, 2005.

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.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; VERMA, S. K.; KWOK, O. C.; FETTERER, R.; BUTLER, E.; CARSTENSEN, M. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 150-153, 2014.

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

ECHTENACHER, B.; FALK, W.; MANNEL, D. N.; KRAMMER, P. H. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 3762-3766, 1990.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, p. 303-311, 1994.

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. 117-127, 2010.

ESKANDARI, M. K.; BOLGOS, G.; MILLER, C.; NGUYEN, D. T.; DEFORGE, L. E.; REMICK, D. G. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 2724-2730, 1992.

FEHSEL, K.; JALOWY, A.; QI, S.; BURKART, V.; HARTMANN, B.; KOLB, H. Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. **Diabetes**, v. 42, p. 496-500, 1993.

FENG, C.; CHEN, L.; LI, W.; ELMORE, B. O.; FAN, W.; SUN, X. Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 130, p. 130-140, 2014.

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 Uberlandia, Minas Gerais--Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.

FIRESTEIN, G. S.; MANNING, A. M. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, p. 609-621, 1999.

FLORQUIN, S.; AMRAOUI, Z.; DUBOIS, C.; DECUYPER, J.; GOLDMAN, M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1153-1158, 1994.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, p. 829-837, 837a-837d, 2012.

FRANCOIS, M.; ROMIEU-MOUREZ, R.; LI, M.; GALIPEAU, J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. **Molecular therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 20, p. 187-195, 2012.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, p. 199-203, 2000.

FREYTES, D. O.; KANG, J. W.; MARCOS-CAMPOS, I.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, p. 220-229, 2013.

FRITSCH, G.; LARCHER, C.; SCHENNACH, H.; WEISS, G. Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1388-1394, 2001.

FRUCHT, D. M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J. J.; KOYASU, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends in Immunology**, v. 22, p. 556-560, 2001.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GANSTER, R. W.; TAYLOR, B. S.; SHAO, L.; GELLER, D. A. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 8638-8643, 2001.

GAO, J. J.; ZUVANICH, E. G.; XUE, Q.; HORN, D. L.; SILVERSTEIN, R.; MORRISON, D. C. Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 4095-4099, 1999.

GATELY, M. K.; RENZETTI, L. M.; MAGRAM, J.; STERN, A. S.; ADORINI, L.; GUBLER, U.; PRESKY, D. H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 495-521, 1998.

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

GE, Y.; CHEN, J.; QIU, X.; ZHANG, J.; CUI, L.; QI, Y.; LIU, X.; QIU, J.; SHI, Z.; LUN, Z.; SHEN, J.; WANG, Y. Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN-gamma production by mice during infection with *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. p. 2014.

GELLER, D. A.; LOWENSTEIN, C. J.; SHAPIRO, R. A.; NUSSLER, A. K.; DI SILVIO, M.; WANG, S. C.; NAKAYAMA, D. K.; SIMMONS, R. L.; SNYDER, S. H.; BILLIAR, T. R. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 3491-3495, 1993.

GIELIS, J. F.; LIN, J. Y.; WINGLER, K.; VAN SCHIL, P. E.; SCHMIDT, H. H.; MOENS, A. L. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, p. 765-776, 2011.

- GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, 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 : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 13, p. 133-150, 2013.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, p. 593-604, 2010.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 953-964, 2005.
- GREGORY, S. H.; WING, E. J.; HOFFMAN, R. A.; SIMMONS, R. L. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 2901-2909, 1993.
- GUTIERREZ-VENEGAS, G.; VENTURA-ARROYO, J. A.; ARREGUIN-CANO, J. A.; OSTOA-PEREZ, M. F. Flavonoids inhibit iNOS production via mitogen activated proteins in lipoteichoic acid stimulated cardiomyoblasts. **International Immunopharmacology**, v. p. 2014.
- HAO, N. B.; LU, M. H.; FAN, Y. H.; CAO, Y. L.; ZHANG, Z. R.; YANG, S. M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 948098, 2012.
- HASKO, G.; SZABO, C.; NEMETH, Z. H.; DEITCH, E. A. Sulphasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase expression, interleukin-12 production and major histocompatibility complex II expression. **Immunology**, v. 103, p. 473-478, 2001.
- HASLER, B.; STARK, K.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. [Epidemiological and financial considerations for the control of *Neospora caninum* on Swiss dairy farms]. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 150, p. 273-280, 2008.
- HASLER, B.; STARK, K. D.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 254-283, 2006.
- HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, p. 84-105, 2003.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1175-1188, 1999.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 877-924, 2000.

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.

HEMPHILL, A.; DEBACHE, K.; MONNEY, T.; SCHORER, M.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; MUELLER, N.; MUELLER, J. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 23-36, 2013.

HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 632-635, 2001.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 191-220, 1999.

HOFFMAN, R. A.; LANGREHR, J. M.; BILLIAR, T. R.; CURRAN, R. D.; SIMMONS, R. L. Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 2220-2226, 1990.

HUANG, F. P.; NIEBALA, W.; WEI, X. Q.; XU, D.; FENG, G. J.; ROBINSON, J. H.; LAM, C.; LIEW, F. Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 4062-4070, 1998.

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2818-2824, 1994.

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

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 533-547, 1995.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; HIENY, S.; CASPAR, P.; COLLAZO, C. M.; SHER, A. In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting. **Immunity**, v. 16, p. 429-439, 2002.

JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G.; AGUADO-MARTINEZ, A.; SALMAN, H.; IRACHE, J. M.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-epsilon-caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccine**, v. 30, p. 4983-4992, 2012.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; KAKIRMAN, H.; STASSEN, M.; KNOP, J.; ENK, A. H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 255-260, 2002.

KARAGHIOSOFF, M.; NEUBAUER, H.; LASSNIG, C.; KOVARIK, P.; SCHINDLER, H.; PIRCHER, H.; MCCOY, B.; BOGDAN, C.; DECKER, T.; BREM, G.; PFEFFER, K.; MULLER, M. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. **Immunity**, v. 13, p. 549-560, 2000.

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 3, p. 23-35, 1977.

KIM, S. U.; PARK, Y. H.; MIN, J. S.; SUN, H. N.; HAN, Y. H.; HUA, J. M.; LEE, T. H.; LEE, S. R.; CHANG, K. T.; KANG, S. W.; KIM, J. M.; YU, D. Y.; LEE, S. H.; LEE, D. S. Peroxiredoxin I is a ROS/p38 MAPK-dependent inducible antioxidant that regulates NF-kappaB-mediated iNOS induction and microglial activation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 259, p. 26-36, 2013.

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.

KLEINERT, H.; WALLERATH, T.; FRITZ, G.; IHRIG-BIEDERT, I.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F.; GELLER, D. A.; FORSTERMANN, U. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 193-201, 1998.

KOSKENKORVA-FRANK, T. S.; WEISS, G.; KOPPENOL, W. H.; BURCKHARDT, S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1174-1194, 2013.

KOTLYAROV, A.; NEININGER, A.; SCHUBERT, C.; ECKERT, R.; BIRCHMEIER, C.; VOLK, H. D.; GAESTEL, M. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 94-97, 1999.

KRISTOF, A. S.; MARKS-KONCZALIK, J.; MOSS, J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 8445-8452, 2001.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, p. 147-156, 1998.

LANGONI, H.; FORNAZARI, F.; DA SILVA, R. C.; MONTI, E. T.; VILLA, F. B. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology** : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 44, p. 1327-1330, 2013.

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

LEE, A. H.; HONG, J. H.; SEO, Y. S. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma synergistically activate the RANTES promoter through nuclear factor kappaB and interferon regulatory factor 1 (IRF-1) transcription factors. **The Biochemical journal**, v. 350 Pt 1, p. 131-138, 2000.

LEE, J. C.; YOUNG, P. R. Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 152-157, 1996.

LEI, Y.; DAVEY, M.; ELLIS, J. T. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. **Parasitology**, v. 131, p. 583-590, 2005.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 4794-4797, 1990.

LINDE, A.; MOSIER, D.; BLECHA, F.; MELGAREJO, T. Innate immunity and inflammation--New frontiers in comparative cardiovascular pathology. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 26-36, 2007.

LIVONESI, M. C.; ROSSI, M. A.; DE SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; DE SOUSA, R. L.; MAFFEI, C. M.; FERREIRA, B. R.; MARTINEZ, R.; DA SILVA, J. S. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidiodomycosis. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 11, p. 123-132, 2009.

LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W.; AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 13, p. 84-89, 2006.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MACMICKING, J. D.; NORTH, R. J.; LACOURSE, R.; MUDGETT, J. S.; SHAH, S. K.; NATHAN, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, p. 5243-5248, 1997.

MAGGINI, J.; MIRKIN, G.; BOGNANNI, I.; HOLMBERG, J.; PIAZZON, I. M.; NEPOMNASCHY, I.; COSTA, H.; CANONES, C.; RAIDEN, S.; VERMEULEN, M.; GEFFNER, J. R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **PloS One**, v. 5, p. e9252, 2010.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of pathology**, v. 229, p. 176-185, 2013.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, p. 549-555, 2002.

MARCAIS, A.; VIEL, S.; GRAU, M.; HENRY, T.; MARVEL, J.; WALZER, T. Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 450, 2013.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S., JR.; 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.

MASON, N. J.; FIORE, J.; KOBAYASHI, T.; MASEK, K. S.; CHOI, Y.; HUNTER, C. A. TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5662-5667, 2004.

MASTROENI, P.; VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F. C.; XU, Y.; KHAN, S.; HORMAECHE, C. E.; DOUGAN, G. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 237-248, 2000.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.

MILLER, C.; QUINN, H.; RYCE, C.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 821-828, 2005.

MILLS, C. D. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 2719-2723, 1991.

MILLS, K. H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 107-117, 2004.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª edição, ed. EDUFU, 2005. p. 183-201.

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 = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, 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, 2009.

MINEO, T. W.; OLIVEIRA, C. J.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 825-833, 2010.

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.

MISHRA, B. B.; RATHINAM, V. A.; MARTENS, G. W.; MARTINOT, A. J.; KORNFELD, H.; FITZGERALD, K. A.; SASSETTI, C. M. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. **Nature Immunology**, v. 14, p. 52-60, 2013.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, p. 361-374, 1991.

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140C, p. 52-70, 2014.

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

MORI, M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. **The Journal of nutrition**, v. 137, p. 1616S-1620S, 2007.

MORI, N.; NUNOKAWA, Y.; YAMADA, Y.; IKEDA, S.; TOMONAGA, M.; YAMAMOTO, N. Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type-I and primary adult T-cell leukemia cells. **Blood**, v. 94, p. 2862-2870, 1999.

- 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.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, p. 557-563, 2011.
- MUSIAL, A.; EISSA, N. T. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 24268-24273, 2001.
- NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; GUERRERO, A. R.; WATANABE, S.; SUGITA, D.; TAKEURA, N.; YOSHIDA, A.; LONG, G.; WRIGHT, K. T.; JOHNSON, W. E.; BABA, H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, p. 1614-1625, 2012.
- NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13725-13728, 1994.
- NIEDBALA, W.; WEI, X. Q.; CAMPBELL, C.; THOMSON, D.; KOMAI-KOMA, M.; LIEW, F. Y. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 16186-16191, 2002.
- NIEDBALA, W.; WEI, X. Q.; PIEDRAFITA, D.; XU, D.; LIEW, F. Y. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 2498-2505, 1999.
- O'NEILL, L. A.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, p. 453-460, 2013.
- OHASHI, K.; BURKART, V.; FLOHE, S.; KOLB, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 558-561, 2000.
- ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.
- PAUTZ, A.; ART, J.; HAHN, S.; NOWAG, S.; VOSS, C.; KLEINERT, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society**, v. 23, p. 75-93, 2010.
- PELLACANI, A.; WIESEL, P.; RAZAVI, S.; VASILJ, V.; FEINBERG, M. W.; CHIN, M. T.; REEVES, R.; PERRELLA, M. A. Down-regulation of high mobility group-I(Y) protein contributes to the inhibition of nitric-oxide synthase 2 by transforming growth factor-beta1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1653-1659, 2001.

QIDWAI, T.; JAMAL, F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, p. 375-387, 2010.

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

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, 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.

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

ROBERT-GANGNEUX, F.; KLEIN, F. Serologic screening for *Neospora caninum*, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 987-989, 2009.

ROCHETTE, L.; LORIN, J.; ZELLER, M.; GUILLAND, J. C.; LORGIS, L.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 140, p. 239-257, 2013.

ROMAN, L. J.; MASTERS, B. S. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 23111-23118, 2006.

ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 439-440, 2005.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SALERNO, J. C.; HARRIS, D. E.; IRIZARRY, K.; PATEL, B.; MORALES, A. J.; SMITH, S. M.; MARTASEK, P.; ROMAN, L. J.; MASTERS, B. S.; JONES, C. L.; WEISSMAN, B. A.; LANE, P.; LIU, Q.; GROSS, S. S. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 29769-29777, 1997.

SALLUSTO, F.; PALERMO, B.; HOY, A.; LANZAVECCHIA, A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 246, p. 123-128; discussion 129, 1999.

SANCHEZ, G. F.; MORALES, S. E.; MARTINEZ, M. J.; TRIGO, J. F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire**, v. 67, p. 142-145, 2003.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 5997-6001, 2002.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **The Journal of experimental Medicine**, v. 185, p. 1261-1273, 1997.

SCHULTZ, K.; SCHULTZ, K.; SCHULTZ, G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. **Nature**, v. 265, p. 750-751, 1977.

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

SHER, A.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 3982-3989, 1993.

SHODA, L. K.; KEGERREIS, K. A.; SUAREZ, C. E.; RODITI, I.; CORRAL, R. S.; BERTOT, G. M.; NORIMINE, J.; BROWN, W. C. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2162-2171, 2001.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 787-795, 2012.

STASKA, L. M.; MCGUIRE, T. C.; DAVIES, C. J.; LEWIN, H. A.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3272-3279, 2003.

STEVANOVIC, I.; NINKOVIC, M.; STOJANOVIC, I.; LJUBISAVLJEVIC, S.; STOJNEV, S.; BOKONJIC, D. Beneficial effect of agmatine in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in iNOS^{-/-} knockout mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 309-318, 2013.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, p. 339-359, 1997.

STUEHR, D. J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S, 2004.

- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516-518, 1988.
- TAKEUCHI, M.; ALARD, P.; STREILEIN, J. W. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 1589-1597, 1998.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.
- 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.
- THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 1, p. 205-209, 1989.
- THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M. T.; ENGELE, M.; SIELING, P. A.; BARNES, P. F.; ROLLINGHOFF, M.; BOLCSKEI, P. L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGDARD, M. V.; BELISLE, J. T.; GODOWSKI, P. J.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 291, p. 1544-1547, 2001.
- TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; MCALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 765-767, 1999.
- UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1467-1472, 1998.
- UMANSKY, V.; HEHNER, S. P.; DUMONT, A.; HOFMANN, T. G.; SCHIRRMACHER, V.; DROGE, W.; SCHMITZ, M. L. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 2276-2282, 1998.
- WANG, Y.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 4, p. 12-22, 1995.
- WEI, X. Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G. J.; HUANG, F. P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, p. 408-411, 1995.
- 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, p. 136-144, 2012.

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

YANG, Y.; ZHANG, R.; XIA, F.; ZOU, T.; HUANG, A.; XIONG, S.; ZHANG, J. LPS converts Gr-1(+)CD115(+) myeloid-derived suppressor cells from M2 to M1 via P38 MAPK. **Experimental Cell Research**, v. 319, p. 1774-1783, 2013.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, p. 109-121, 2014.

YAROVINSKY, F.; KANZLER, H.; HIENY, S.; COFFMAN, R. L.; SHER, A. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response. **Immunity**, v. 25, p. 655-664, 2006.

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. 308, p. 1626-1629, 2005.

ZHANG, J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. **Science**, v. 263, p. 687-689, 1994.

ZHANG, Y. H.; CASADEI, B. Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, p. 341-350, 2012.

ZHU, Y. N.; YANG, Y. F.; ONO, S.; ZHONG, X. G.; FENG, Y. H.; REN, Y. X.; NI, J.; FU, Y. F.; TANG, W.; ZUO, J. P. Differential expression of inducible nitric oxide synthase and IL-12 between peritoneal and splenic macrophages stimulated with LPS plus IFN-gamma is associated with the activation of extracellular signal-related kinase. **International Immunology**, v. 18, p. 981-990, 2006.

ZINTL, A.; PENNINGTON, S. R.; MULCAHY, G. Comparison of different methods for the solubilisation of *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa) antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 205-213, 2006.

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 087/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 052/12

Projeto Pesquisa: "Padronização de modelo de infecção por *Neospora caninum* pela via oral utilizando mecanismos de indução de interconversão de estágio *in vitro*"

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

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