



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”

Avaliação da resposta imunológica desencadeada em camundongos por
diferentes isolados de *Neospora caninum*

LYDIANE PARREIRA MAIA

Uberlândia

Agosto 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Avaliação da resposta imunológica desencadeada em camundongos por
diferentes isolados de *Neospora caninum*

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

Lydiane Parreira Maia

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

Uberlândia

Agosto/2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de
Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.**

M217a Maia, Lydiane Parreira, 1988
2015 Avaliação da resposta imunológica desencadeada em camundongos
por diferentes isolados de *Neospora caninum* [recurso eletrônico] /
Lydiane Parreira Maia. - 2015.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5011>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU:612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa da Dissertação de Mestrado número 206 do PPIPA.

Data: 25 de agosto de 2015

Discente: LYDIANE PARREIRA MAIA

Matrícula: 11322IPA007

Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DESENCADEADA EM CAMUNDONGOS POR DIFERENTES ISOLADOS DE *Neospora caninum*"

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Às 9 horas do dia 25 de agosto do ano de 2015 no Bloco 6T sala 210 - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Prof. Dr. Arlindo Gomes de Macedo Júnior – UNIPAC, Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU e Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo – ICBIM/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

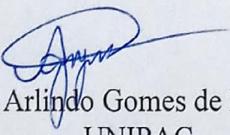
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da banca Dr. Tiago Wilson P. Mineo apresentou a comissão examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público e concedeu ao(à) discente a palavra para exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

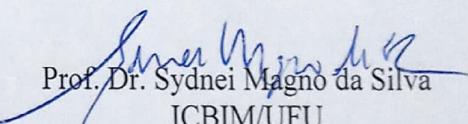
A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a banca examinadora considerou o(a) candidato(a) aprovado(a).

Esta defesa de dissertação é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação interna da UFU, e do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa desta Universidade.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 40 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela banca examinadora.


Prof. Dr. Arlindo Gomes de Macedo Júnior
UNIPAC


Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva
ICBIM/UFU


Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo – orientador
ICBIM/UFU

“Agradeço todas as dificuldades que encontrei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

“Obstáculos não tem necessariamente que te parar. Se você se deparar com um muro, não dê as costas e desista. Descubra um jeito de escalá-lo, atravessá-lo, ou passar ao redor dele.”

(Michael Johnson)

À minha família por acreditar na minha capacidade, e nunca deixarem eu desistir dos meus sonhos! Deus me presenteou com vocês em minha vida para eu seguir evoluindo e melhorando cada dia mais.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora que me guiam a cada dia, iluminam minhas escolhas, colocam no meu caminho anjos que me ajudam a superar os problemas neste caminho.

À minha mãe Niny Rosy que num certo dia me tirou da zona de conforto em que eu vivia e que não me fazia bem para eu correr atrás de um futuro melhor! Obrigada mãe por todas suas palavras, seus conselhos, broncas e palavras de conforto... Amo muito a senhora.

Ao meu pai Ailton, pelo amor incondicional, por sempre se preocupar com os meus sonhos e ver em mim um grande potencial. Obrigada pai por entender a distância e a ausência. Te amo!

Ao meu marido Luiz Fernando que desde o primeiro momento me apoiou, e em todas as horas que estive perto de desistir pegou na minha mão e subiu mais um degrau comigo. Obrigada amor por confiar em mim sempre quando nem eu mesma confiei! Te amo.

Ao meu irmão José Leonardo que sempre se orgulhou tanto de mim. Você sabe, que só de você acreditar em mim isso já basta!. À sua esposa, Liza, que me acolhe como irmã, sempre tendo uma palavra de incentivo para me dar. Obrigada pelo seu otimismo de sempre! Amo vocês!

À minha irmãzinha Maria Clara que é o anjo da minha vida. Ela que teve que aprender a conviver com a minha ausência! Te amo muito minha pequena.

À minha sogra Beatriz por me acolher como sua filha desde o primeiro dia que precisei! Ela e sua família foram essenciais para essa etapa ser concluída. Obrigada pelo carinho, o colo e o amor incondicional de sempre.

Aos meus amigos, e em especial a Mayara e a Ana Carolina, obrigada por todas as vezes que precisei, vocês duas estarem presentes me apoiando e falando o que eu precisava escutar! Vocês me dão força a buscar os meus sonhos.

À minha madrinha e primeira orientadora, Gabriela Lícia Santos Ferreira, onde manterei sempre meu carinho, gratidão pelos momentos em que me ensinou e me incentivou na carreira acadêmica. Obrigada por tudo que você fez por mim, até mesmo nestes dois anos longe, onde com mensagens de conforto você me impulsionou ir em frente!

Aos companheiros de trabalho, que muitos hoje, são amigos que quero levar para a vida toda. Tudo que aprendi nestes dois anos de experimentos, vida vou levar para a eternidade comigo. Um agradecimento especial aos que se tornaram amigos: Vanessa R., Eliézer, Mylla, Flávia, Patrick, Tamires, Murilo, Vanessa M. e Cristina quero que saibam que o dia a dia com vocês fez esse período se tornar agradável, pois o ambiente para trabalhar é descontraído e coletivo. Muito obrigada pela presença de vocês!

A todo pessoal do laboratório de Imunoparasitologia, graduandos, mestrando, doutorando e pós-doutorando. Obrigada sempre pelas conversas, os toques, as ajudas com protocolos, informática...

Ao meu orientador Dr Tiago Mineo, que abriu as portas do laboratório para que eu pudesse trabalhar e me da à oportunidade de participar do seu conhecimento transmitido a todos seus alunos, pois é importante uma pessoa nunca parar de buscar conhecimento.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Zilda, Marley, Ana Cláudia e Max pelo auxílio na rotina do laboratório e pelos momentos de conversas.

Aos Professores José Roberto Mineo e Fernanda Maria Santiago pelos ensinamentos, dicas experimentais diárias e pelo crescimento intelectual que passam aos alunos a cada dia.

Às agências CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste e de outros trabalhos.

Resumo

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa que acomete diversos animais domésticos e silvestres. O parasito causa patologia aparente em canídeos e bovinos, tais como doenças neuromusculares e ao abortamento durante a transmissão vertical respectivamente. Tal abortamento gera perda econômica considerável em rebanhos. Já foram identificados diversos isolados do parasito em bovinos e canídeos que podem apresentar diferenças em resposta imunológica. Desse modo, o presente estudo visou avaliar comparativamente a resposta imune e a virulência desencadeada por duas cepas deste protozoário em modelo murino. Os isolados de *N. caninum* Nc-1 e Nc-Liv foram cultivados em células HeLa e inoculados pela via intraperitoneal em camundongos C57BL/6. Durante a curva de sobrevida realizada com 1×10^7 de taquizoítos com ambos os isolados, ocorreu à perda de 50% de camundongos infectados com Nc-Liv e nenhuma perda no grupo infectado com Nc-1. Além da sobrevida, foi analisada a morbidade entre os grupos, onde camundongos infectados com Nc-Liv teve maior perda de peso significativa, quando comparada com o grupo Nc-1. Durante a fase aguda da infecção (7dias), houve diferença significativa no parasitismo peritoneal e na fase crônica (30dias), houve diferença significativa no parasitismo cerebral, ambos detectado por PCR quantitativo, sendo que o maior número de cópias de DNA genômico foi encontrado em camundongos infectados com o isolado Nc-Liv. DNA de *N. caninum* foi detectado em amostras de fígado e pulmão de animais infectados com 7 dias com ambos os isolados, contudo sem diferenças significativas. Em relação ao padrão de citocinas elicitado na fase aguda e crônica, observou-se que a via de indução de uma resposta Th1 (IL-12, IFN- γ e NO) foram produzidas em quantidades semelhantes em fluido peritoneal, pulmão, fígado (todos com 7 dias de infecção) e cérebro (com 30 dias de infecção). Contudo, a análise da concentração sérica de citocinas (7dias) revelou que camundongos infectados com o isolado Nc-Liv contam com a indução de citocinas de perfil Th1, Th2 (IL-4) e Th17 (IL-23 e IL-17), além do maior recrutamento de neutrófilos quando analisados em células peritoneais, em comparação com o isolado Nc-1, que induziu somente um padrão Th1 clássico. Neste sentido, conclui-se que o isolado Nc-Liv possui uma maior virulência quando comparado ao isolado Nc-1, podendo esta estar relacionada devido à indução de um padrão misto de citocinas Th1/Th2/Th17 durante a infecção.

Palavr as Claves: Nc-1, Nc-Liv, isolados, resposta imune.

Abstract

Neospora caninum is a protozoan of the Apicomplexa phylum that affects several domestic and wild animals. This parasite cause neuromuscular commitment canines and abortion in bovines due to vertical transmission, respectively. A considerable economic loss in cattle production is due to this abortion. Additionally, it was found that different isolates of the parasite can induce distinct immune responses. Thus, this study aimed to compare the immune response profile and virulence triggered by Nc-1 and Nc-Liv strains of *N. caninum*. Both isolates were cultivated in HeLa cells and inoculated intraperitoneally in mice C57BL/6. For the survival assays, mice were infected with 1×10^7 tachyzoites of Nc-1 or Nc-Liv strains. It was observed a survival of 50% in the group infected with Nc-Liv. Mortality was not recorded in mice infected with Nc-1. Additionally, we found an increased weight loss in animals infected with Nc-Liv in comparison with the group infected with Nc-1. During acute phase of infection (7 days) a significant difference in peritoneal parasitism was identified, as well as in brain parasitism in the chronic phase of disease (30 days), evidenced by an enhanced number of DNA genomic copies found in each tissue. However, no significant differences were found in samples of lungs and liver during acute infection. The pattern of cytokine production demonstrated an induction of cytokines of Th1 response (IL-12, IFN- γ e NO) in a similar concentration in samples from the peritoneal fluids, lungs, livers (7 days) and brains (30 days). Nevertheless, the serum concentration of cytokines showed that mice infected with Nc-Liv also induced cytokines from Th2 (IL-4) e Th17 (IL-23 e IL-17A) profile. Moreover, an enhanced neutrophil recruitment was observed by Nc-Liv strain in comparison Nc-1. Thus, we conclude that Nc-Liv isolate possess an increased virulence in relation to Nc-1, which may be due to the induction of a mixed Th1/Th2/Th17 pattern of cytokines during the infection.

Key Words: Nc-1, Nc-Liv, isolates, immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| DCs | Células Dendríticas |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DL50 | Dose Letal 50% |
| DO | Densidade Óptica |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| GAPDH | Glicroldeído-3-Fosfatase Dehidrogenase |
| IgG2a | Imunoglobulina G subclasse 2 ^a |
| ITS1 | <i>Region spanning the internal transcribed spacers</i> |
| MyD88 | Fator de diferenciação mielóide 88 (<i>Myeloid differentiation factor 88</i>) |
| NK | Células Natural Killer |
| NLB | Tris-Base, NaCl e Na ₂ EDTA |
| NO | Óxido Nítrico |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa |
| RAPD | <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de Sódio |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| TLR2 | TollLike Receptor 2 |
| TMB | Tetrametilbenzidina |

Sumário

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 <i>Neospora caninum</i> | 13 |
| 1.2 Transmissão | 15 |
| 1.3 Patogenia | 17 |
| 1.4 Resposta Imune | 17 |
| 1.5 Isolados de <i>Neospora caninum</i> | 20 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 Objetivo geral | 28 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 28 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 Obtenção de camundongos | 30 |
| 4.2 Delineamento Experimental | 30 |
| 4.3 Manutenção de parasitos em cultura celular | 31 |
| 4.4 Ensaio de sobrevida | 31 |
| 4.5 Extração e quantificação de DNA | 32 |
| 4.6 Determinação da inflamação tecidual tecidual <i>in vivo</i> | 33 |
| 4.7 Quantificação de citocinas | 33 |
| 4.8 Determinação da produção de Óxido Nítrico | 35 |
| 4.9 Comparaçao da citologia peritoneal | 35 |
| 4.10 Análise Estatística | 36 |
| 4.11 Normas de Biossegurança | 36 |
| 5. RESULTADOS | 38 |
| 5.1. Camundongos infectados com isolado Nc-Liv são mais susceptíveis à infecção | 38 |
| 5.2. Padrão de citocinas elicitadas pelos diferentes isolados de <i>Neospora caninum</i> | 45 |
| 6. DISCUSSÃO | 51 |
| 7 CONCLUSÃO | 57 |
| 8 REFERÊNCIAS | 59 |
| 9. ANEXO | 65 |

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Parasito

A espécie *Neospora caninum* é um parasito do reino Protista, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Coccida, família Sarcocystidae, possuindo ciclo de vida intracelular obrigatório, sendo suas características principais, morfológicas e bioquímicas, similares ao *Toxoplasma gondii* (DUBEY; SCHARES, 2011). Foi descrito pela primeira vez em 1984 na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos semelhantes aos causados por *T. gondii*, com paralisia dos membros posteriores, mas contendo cistos teciduais morfologicamente distintos (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Todavia, algumas características diferenciais eram observadas tais como cistos teciduais; testes sorológicos e imunohistoquímicas negativos para *T. gondii*. Neste sentido, propôs-se a descrição de um novo gênero e espécie, sendo este posteriormente isolado em cultura celular e identificado em bovinos (DONAHOE *et al.*, 2015; DUBEY *et al.*, 1988; DUBEY; SCHARES, 2011). Este coccídio acomete vários animais domésticos e silvestres, notadamente nas espécies canina e bovina, induzindo nestes animais abortamentos sequenciais e desordens neuromusculares em cães (DUBEY; SCHARES, 2011).

O ciclo de vida envolve três formas infecciosas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos são formas intracelulares, que se dividem rapidamente por endodiogénia dentro de estruturas que o parasito forma no interior da célula hospedeira denominada de vacúolo parasítóforo (DUBEY *et al.*, 2002). Causam intensa resposta inflamatória, o que culmina na destruição de tecidos, sendo esta a causa principal das manifestações clínicas da doença durante a fase aguda da infecção (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Através de intensa pressão por parte do sistema imunitário do hospedeiro sobre o parasito, o mesmo se diferencia em bradizoítos, que são formas de latência, com replicação lenta, onde o parasito forma uma membrana envolta de si, formando assim cistos que se alojam nos tecidos do hospedeiro, principalmente musculares e neurais. De forma geral, os cistos teciduais não causam nenhuma manifestação clínica (DUBEY *et al.*, 2002).

Quando os cistos presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários são ingeridos por hospedeiros definitivos, ocorre um rompimento da parede dos cistos onde a mesma é digerida por enzimas proteolíticas do hospedeiro definitivo, liberando bradizoítos que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam a fase sexuada (esquizogonia) como formação de esquizontes e liberação de merozoítos, os quais iniciam a gametogonia, que resulta na produção de oocistos não esporulados que são eliminados com as fezes, onde em condições propícias de umidade e temperatura esporulam-se, formando uma estrutura contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (GONDIM *et al.*, 2004; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; MUGRIDGE *et al.*, 2000).

O ciclo de vida de *N. caninum* é do tipo heteroxênico. O parasito se desenvolve em hospedeiros definitivos, os canídeos, onde ocorre a fase sexuada de seu ciclo, na qual há a formação de oocistos provenientes de gametas, no interior do intestino delgado dos hospedeiros, que são eliminados juntamente com as fezes e se esporulam no ambiente, tornando-se infectantes. Quando ingerido por hospedeiros intermediários, como bovinos, equinos, felinos, suínos, ovinos, cervídeos, camelídeos e algumas aves, esses oocistos liberam taquizoítos que invadem as células realizando a reprodução assexuada do protozoário, podendo causar a infecção aguda, ou ocorre a formação de cistos teciduais com bradizoítos, tendo assim a infecção crônica da neosporose (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY;

SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; MCALLISTER *et al.*, 1998; MINEO *et al.*, 2011) (Fig 1).

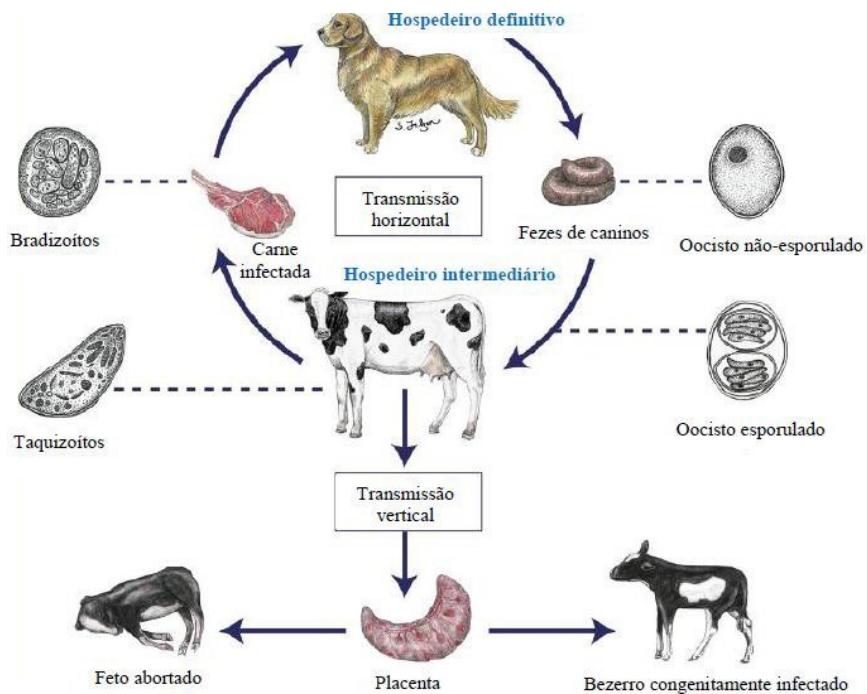


Figura 1: Ciclo Biológico *Neospora caninum*

Fonte: (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013)

1.2 Transmissão

A transmissão de *N. caninum* pode ocorrer de forma horizontal e vertical. A transmissão vertical se desenvolve por via transplacentária da mãe para o feto por via exógena ou endógena (TREES; WILLIAMS, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2009). A transmissão exógena inicia-se quando a progenitora *naïve* ingere oocistos esporulados contidos no ambiente e assim ocorre a transmissão para o feto durante a fase aguda da doença, causando aborto no rebanho. Já quando a vaca está infectada, com uma infecção crônica estabelecida, onde o

parasito está em latência, causada por uma ativação do perfil pró-inflamatório (Th1), pode ocorrer uma transmissão endógena se o animal engravidar, pois para a implantação da gestação o perfil de resposta atuante é o anti-inflamatório (Th2), e com isso bradizoítos voltam a ser taquizoítos circulantes, ocorrendo a reativação da doença, podendo então ser transmitida para o feto em até 95% dos casos (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; REICHEL *et al.*, 2013; TREES; WILLIAMS, 2005). Essa mudança de perfil de resposta inflamatória ocorre através dos níveis hormonais da mãe (CANTON *et al.*, 2014; DUBEY *et al.*, 2003). Esse modo de transmissão é o mais comum entre os bovinos, causando assim uma persistência da doença dentro do rebanho.

A transmissão vertical em hospedeiros definitivos também ocorre, visto que cadelas infectadas podem transmitir para os filhotes durante sucessivas gestações, entretanto é dada menor importância a esse tipo de infecção dentro deste grupo de animais, já que o aborto canino não constitui um problema financeiro assim como no grupo dos bovinos (DONAHOE *et al.*, 2015; DUBEY; SCHARES, 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Há ainda a transmissão horizontal através da ingestão de cistos teciduais de hospedeiros intermediários, ou a ingestão de oocistos contidos em fezes dos hospedeiros definitivos (DONAHOE *et al.*, 2015; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; DUBEY; SCHARES, 2011; DUBEY *et al.*, 2003). Cães que residem nas mediações de currais se contaminam por ingestão de restos de membranas de placenta de vacas contaminadas (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Além desse tipo de transmissão horizontal, há raros relatos de infecção via lactação em modelos de bezerros experimentais, mas esse tipo de transmissão não é observada na forma natural em cães e em

bezerros (DIJKSTRA *et al.*, 2001; DONAHOE *et al.*, 2015; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; MOSKWA *et al.*, 2007).

1.3 Patogenia

Os aspectos clínicos da neosporose são bem descritos em modelos bovinos e caninos. Os cães possuem um quadro clínico grave de comprometimento neuromuscular. De acordo com Basso e colaboradores (2005), cães infectados com *N. caninum* apresentaram problemas neurológicos, megaesôfago, além de dermatite severa. Ainda podem apresentar outras disfunções como dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, atrofia e flacidez muscular e falência cardíaca (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002). Já em bovinos, devido ao abortamento causado pela infecção, é gerada uma perda econômica na criação de rebanhos (INNES *et al.*, 2005). A causa dos abortamentos não é bem conhecida, podendo a morte fetal ser causada por fatores como lesões resultantes da invasão parasitária do feto ou por danos na placenta que interrompem o fornecimento de nutrientes para o feto (CANTON *et al.*, 2014). Bezerros que nascem infectados tendem a ser fracos, com falta de equilíbrio, sendo possivelmente acometidos por lesões ou más-formações neurológicas (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). O problema do aborto em um rebanho pode persistir por vários meses ou anos (BASSO *et al.*, 2010).

1.4 Resposta Imune

Em uma infecção oral por *N. caninum*, a primeira barreira ocorre através dos enterócitos e espessas junções intercelulares da mucosa intestinal. Quando as células epiteliais intestinais são infectadas secretam moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO), citocina (IL-15)

que ativam as células *natural killer* (NK), induzindo a produção de interferon gama (IFN- γ) e de quimiocinas, recrutando leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas (DCs) (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006). A partir deste recrutamento, ocorre a ativação de células da imunidade inata como macrófagos e DCs via reconhecimento pelo TLR2, dependente da molécula adaptadora MyD88, levando à secreção de IL-12 (MINEO *et al.*, 2009; MINEO *et al.*, 2010) que estimula as células NK a produzirem e secretarem altos níveis de IFN- γ , além de induzir a diferenciação de células T CD4 $^{+}$ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , citocinas críticas para a sobrevivência do hospedeiro (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006).

A alta produção de IFN- γ estimula macrófagos e células dendríticas a liberarem mais IL-12, aumentando ainda mais a liberação de IFN- γ . Esta secreção de IL-12 também ativa células T CD8 $^{+}$, que contribuem significativamente para o controle da infecção aguda. As células T CD8 $^{+}$, por sua atividade citotóxica, destroem células infectadas pelo protozoário, liberando taquizoítos, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos, tais como anticorpos, sistema complemento, macrófagos ativados e células NK (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; MINEO *et al.*, 2009; MUÑOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Os macrófagos ativados também podem induzir diferenciação do parasita da forma taquizoíto para a forma bradizoíto, além da formação e manutenção de cistos teciduais (WILLIAMS *et al.*, 2009). Esta interconversão entre os estágios evolutivos desempenha um papel fundamental no estabelecimento da infecção crônica (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002). Além disso os macrófagos são fundamentais para a manutenção da resposta inata e adaptativa, através da apresentação e do processamento

antigênico, morte parasitária, a modulação do perfil de citocinas envolvidas e exclusão de células apoptóticas (ABE *et al.*, 2014).

Para o controle de uma infecção parasitária é necessário o balanço da produção de citocinas dos distintos perfis de resposta Th1 e Th2 para que haja uma homeostasia no organismo do hospedeiro. Existe alguns tipos celulares importantes para este que este evento ocorra, como células TCD4⁺, TCD8⁺, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T γ δ (NISHIKAWA *et al.*, 2003). Desse modo é visto que citocinas do perfil de resposta Th2 também são importantes para o controle da infecção causada por *N. caninum*, apresentando efeitos inibitórios da resposta de macrófagos e de citocinas como IL-12 e IFN- γ (MURRAY; WYNN, 2011). Com isso, infecções em bovinos podem ter proteção com a produção de IL-4 e IL-10 para a modulação da resposta imune na interface materno-fetal, na qual a produção da resposta do tipo Th1 pode afetar a gestação, culminando na morte fetal no útero, ou a reabsorção ou mumificação, a presença de natimortos autolisados, ou também de nascidos vivos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas persistentemente infectados (ALMERIA; LOPEZ-GATIUS, 2013; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; REGIDOR-CERRILLO *et al.*, 2014; ROSBOTTOM *et al.*, 2011). Sabe-se que os bovinos, infectados de forma experimental ou natural, geram uma resposta imune associada à elevada produção de IFN- γ e anticorpos IgG2 antígeno-específicos (ANDRIANARIVO *et al.*, 2005; MOSKWA *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2009), indicando a participação ativa de imunidade celular e humoral. A sobrevivência do feto e a gravidade da infecção está relacionada ao trimestre de gestação e a sua competência imunológica, ao momento da infecção bem como a virulência da cepa infectante, combinado ao estado imunológico do feto e da mãe (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

O tipo de resposta imune do hospedeiro frente à infecção a parasitos depende da virulência do isolado e carga parasitária, podendo ocorrer o acometimento de órgãos como pulmões, coração, intestino e pele (ATKINSON *et al.*, 1999; BASSO *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2003).

1.5 Isolados de *Neospora caninum*

Isolado primeiramente em cães em 1988 (Nc-1) (DUBEY *et al.*, 1988), o protozoário *N. caninum* já foi isolado em bovinos e em outros hospedeiros. A maioria desses isolados eram de animais clinicamente infectados no período neonatal, exceto para os isolados de búfalos, ovelhas e cervos, que eram de animais adultos assintomáticos. O isolamento viável de *N. caninum* foi alcançado com uma variedade de culturas de células e por bioensaios em camundongos, gerbis e cães imunossuprimidos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; ROJO-MONTEJO *et al.*, 2009).

Até 2001 existiam 19 isolados de *N. caninum* em cães naturalmente infectados, sendo a maioria de cistos teciduais (GONDIM *et al.*, 2001). Hoje já se sabe a existência de cerca de 65 isolados deste protozoário encontrados em diversos hospedeiros (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007) (Tabela 1). Um deles, Nc-Bahia, foi isolado no Brasil a partir de um cão infectado com sinais neurológicos, que apresentava encefalite não-suprativa e cistos cerebrais com parede espessa e fortemente corados por imuno-histoquímica (CHRYSSAFIDIS *et al.*, 2014)

Desde a descoberta de *N. caninum*, o parasito foi isolado de cães em algumas oportunidades: Nc-1, nos EUA (DUBEY *et al.*, 1988) e Nc-Liverpool, na Inglaterra (BARBER *et al.*, 1995). Já isolados de bovinos foram descritos nos EUA denominado Nc- Beef, na Suécia, com o nome de Nc-SweB1 (CONRAD *et al.*, 1993; STENLUND *et al.*,

1997) e na Austrália foi chamado de Nc-Nowra, que possui uma baixa virulência comparada com outros isolados (MILLER *et al.*, 2002).

Em estudos que se relatam a diversidade genética e biológica de *N. caninum*, a análise comparativa entre diferentes isolados, mostrou que existe heterogeneidade dentro da espécie, particularmente com a taxa de crescimento *in vitro* (GONDIM *et al.*, 2001; SCHOCK *et al.*, 2001). O parasito exibe virulência variável nos diferentes isolados *in vivo*, como o de cães e bovinos sintomáticos, bezerros natimortos ou fetos abortados, os quais apresentam virulência acentuada (ATKINSON *et al.*, 1999; ROJO-MONTEJO *et al.*, 2009). A caracterização biológica entre os isolados revelou uma diversidade genética, variação significativa em características de patogenicidade e crescimento do parasito (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Há estudos que sugerem que a resposta imune do hospedeiro em infecções com diferentes isolados de *N. caninum* podem variar, assim como o resultado da infecção (AL-QASSAB *et al.*, 2009). Como exemplo, camundongos BALB/C infectados com Nc-Liverpool exibem resposta inflamatória mais grave no sistema nervoso central e necrose do que os infectados com Nc-Nowra e Nc-SweB1 (AL-QASSAB *et al.*, 2009). Já infecção com o isolado Nc-1 em vacas prenhas a morte fetal ocorre, enquanto nenhuma morte fetal é observada em vacas infectadas com Nc-Espanha 1H (AL-QASSAB *et al.*, 2009; ATKINSON *et al.*, 1999; DONAHOE *et al.*, 2015; ELLIS *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2002; SALEHI; GOTTSSTEIN; HADDADZADEH, 2015).

De acordo com Stenlund e colaboradores (1997), a detecção de parasitos de isolados bovinos ocorre por volta de 15 a 34 dias após a inoculação em cultura de células como Nc- SweB1 que não são identificados em culturas celulares antes de 56 dias pós-infecção,

enquanto que isolados de cães são detectados mais precocemente, como exemplo, Nc-Liv foi detectado após 5 dias de inoculação.

Diferentes técnicas de biologia molecular, incluindo técnicas baseadas em PCR, polimorfismo de nucleotídeo (SNP) e marcadores microssatélites têm sido usados para estudar taxonomia, polimorfismo genético e epidemiologia de muitos parasitos protozoários (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010). Por exemplo, a diversidade intra-espécies dentro de *N. caninum* foi demonstrada por RAPD-PCR (RAPDPCR). Além disso, a análise da sequência espaçadora interna de DNA transcrita (ITS-1) demonstrou alguma variação entre isolados de *N. caninum* (ATKINSON *et al.*, 1999; DONAHOE *et al.*, 2015; ELLIS *et al.*, 2010; SALEHI; GOTSTEIN; HADDADZADEH, 2015).

Gondim e colaboradores (2004) investigaram variações na sequência ITS1 de diferentes isolados de *N. caninum*, mostrando que variações dentro dos isolados podem ocorrer, a exemplo do isolado Nc-Bahia que apresenta diferenças em vários pares de bases em relação aos isolados da América do Norte e Europa. Salehi e colaboradores (2015) mostraram que os isolados Nc-Liv, Nc-Iran, Nc-SweB1, Nc-GER1, KBA1, e KBA2 apresentaram um perfil distinto, mas não revelaram qualquer relação entre o genótipo do hospedeiro e ou origem geográfica. Também encontraram diversidade genética e estruturas populacionais geográficas de *N. caninum* isolados de diferentes partes do mundo (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010).

Tabela 1: Isolados de *N. caninum* conhecidos atualmente:

| Designação | Fonte | País |
|---------------------------------|---|-----------------|
| Nc-1 | Cérebro de cachorros infectados verticalmente | EUA |
| Nc-2 | Biópsia de músculo de cães infectados naturalmente | EUA |
| Nc-3 | Cérebro e medula espinhal de cães | EUA |
| Nc-4 e Nc-5 | Cérebro de cachorros infectados verticalmente | EUA |
| Nc-6, 7 e 8 | Cérebro e músculo estriado de cães filhotes | EUA |
| Nc-9 | Cérebro de cão filhote infectado naturalmente | EUA |
| CN1 | Cérebro e medula espinhal de cães infectados verticalmente | EUA |
| BPA1 e BPA2 | Cérebro de fetos bovinos abortados | EUA |
| BPA3 e BPA4 | Cérebro de bezerros infectados verticalmente | EUA |
| BPA6 | Cérebro e medula espinhal de fetos de bovinos abortados | EUA |
| Nc-Beef | Bezerros infectados naturalmente | EUA |
| Nc-Illinois | Cérebro de bezerros infectados naturalmente | EUA |
| VMGL1 | Cérebro de bezerros abortados | EUA |
| Nc-deer1 | Cérebro de veados de cauda branca naturalmente infectado | EUA |
| Nc-WTDVA-1 | Cérebro de veados de cauda branca naturalmente infectado | EUA |
| Nc-WTDVA-2 e 3 | Cérebro de veados de cauda branca naturalmente infectado | EUA |
| Nc-Bahia | Cérebro de cães adultos infectados naturalmente | Brasil |
| BNC-PRI | Cérebro de bezerro cego infectado verticalmente | Brasil |
| BCN-PR3 | Cérebro de fetos de bovinos abortados | Brasil |
| Nc-Goiás | Cérebro de bezerros clinicamente saudáveis | Brasil |
| NcBrBuf-1,2,3,4,5 | Cérebro de búfalos infectados naturalmente | Brasil |
| Nc-6 Argentina | Oocistos de cães naturalmente infectados | Argentina |
| Nc-Liverpool | Cerebelo de cães filhotes infectados verticalmente | Reino Unido |
| Nc-LivB1 | Cérebro de bezerro natimorto | Reino Unido |
| Nc-LivB2 | Cérebro de fetos de bovinos abortados | Reino Unido |
| Nc-P1 | Oocistos de cães naturalmente infectados | Portugal |
| Nc-Porto1 | Cérebro de fetos de bovinos abortados | Portugal |
| Nc-Sp1 | Cérebro de fetos de bovinos abortados | Espanha |
| Nc-Spain 1H | Cérebro do bezerro saudável infectado naturalmente | Espanha |
| Nc-Spain 2H, 3H, 4H e 5H | Cérebro do bezerro saudável infectado naturalmente | Espanha |
| Nc-6,7, 8, 9, 10 | Cérebro do bezerro saudável infectado naturalmente | Espanha |
| Nc-VP1 | Cérebro de bezerros infectado verticalmente | Itália |
| NcPG1 | Cérebro, placenta e vilosidades cotiledonares de bezerros naturalmente infectados | Itália |
| Nc-Ger1 | Cérebro e medula espinhal de cães filhotes infectado verticalmente | Alemanha |
| Nc-GER2,3,4,5, 6,7,8 e 9 | Oocistos de cães naturalmente infectados | Alemanha |
| CZ-4 | Oocistos de cães naturalmente infectados | República Checa |
| Nc-PolB1 | Cérebro de bezerros naturalmente infectados | Polônia |

| | | |
|---------------------|--|---------------|
| Nc-SweB1 | Cérebro de bezerros natimortos | Suécia |
| Nc-Iran1 | Cérebro de fetos de bovinos abortados | Iran |
| NcIs491 | Cérebro de feto de bovinos abortados | Israel |
| NcIs580 | Cérebro de feto de bovinos abortados | Israel |
| Nc-MalB1 | Cérebro de bezerros infectados verticalmente | Malásia |
| NcNZ1 | Cérebro de vaca infectada naturalmente | Nova Zelândia |
| NcNz2 | Cérebro de bezerros infectados com 2 dias | Nova Zelândia |
| NcNz3 | Cérebro de bezerro natimorfo | Nova Zelândia |
| Nc-Nowra | Cérebro e medula espinhal de bezerros infectados verticalmente | Austrália |
| WA-K9 | Lesões de pele de cães naturalmente infectados | Austrália |
| JAP1 | Cérebro e medula espinhal de bezerros infectados verticalmente | Japão |
| BT-2 e JAP-2 | Cérebro de bezerros infectados verticalmente | Japão |
| JAP-5 | Cérebro e medula espinhal de bezerros infectados verticalmente | Japão |
| JAP-4 | Cérebro de bezerro natimorto | Japão |
| BT-3 | Cérebro de vacas adultas infectadas | Japão |
| Nc-Sheep | Cérebro de ovelhas grávidas naturalmente infectadas | Japão |
| KBA-1 | Cérebro de bezerros infectados verticalmente | Coréia do Sul |
| KBA-2 | Cérebro de fetos de bovinos abortados | Coréia do Sul |
| Nc-Kr2 | Cérebro de vacas infectadas naturalmente | Coréia do Sul |

Fonte: Al-Qassab e colaboradores, 2010

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A neosporose causa grande impacto econômico tanto na área agropecuária devido às perdas de animais, queda na produção de leite e ganho de peso, bem como às perdas afetivas quando se trata principalmente de cães (DE CRAEYE *et al.*, 2011; REICHEL; ELLIS, 2002). Há a estimativa de perdas por aborto de até 57% dos casos reportados (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007) devido à infecção por *N. caninum*, e por isso servem de incentivo para o desenvolvimento de tratamento e/ou vacinas.

Os estudos da imunidade a *N. caninum* em hospedeiros naturais são dificultados por custos envolvidos e pela dificuldade da disponibilidade de animais e reagentes específicos para a análise da resposta imune. Assim, pesquisas científicas são conduzidas em modelos murinos para se obter informações sobre a produção de cistos teciduais em cérebros, carga parasitária, lesões e produção de citocinas, assim como na infecção congênita e transmissão vertical do parasita.

Sabe-se que os diferentes isolados de *N. caninum* promovem respostas distintas por parte dos hospedeiros. Os isolados caninos Nc-1 e Nc-Liv geralmente são utilizados em estudos de comparação entre isolados bovinos e caninos, mas como seriam as diferenças entre dois isolados caninos em infecções experimentais com a utilização de camundongos?

Com base nisso, justifica-se o estudo aprofundado dos dois isolados para melhor entender os mecanismos de defesas de modelos murinos frente à infecção a *N. caninum*.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imunológica desencadeada em camundongos C57BL/6 pelos isolados Nc-1 e Nc-Liv de *N. caninum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a mortalidade de camundongos infectados pelos isolados Nc-1 e Nc-Liv de *N. caninum*;
- Avaliar se os isolados Nc-1 e Nc-Liv de *N. caninum* possuem diferenças na virulência;
- Quantificar o parasitismo em diferentes órgãos de camundongos infectados por Nc-1 e Nc-Liv, isolados de *N. caninum*;
- Avaliar a inflamação em diferentes órgãos de camundongos infectados com *N. caninum*;
- Avaliar o perfil de citocinas produzidas na infecção em dois isolados de *N. caninum*.

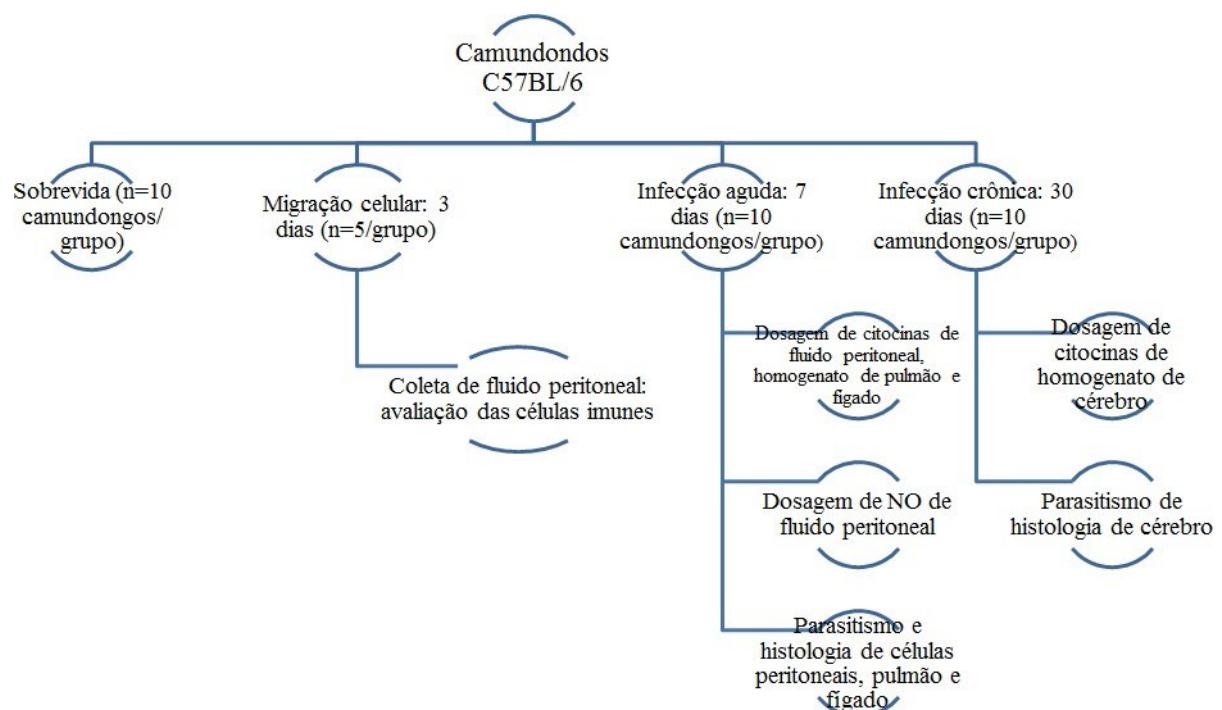
Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de camundongos

Camundongos C57BL/6 selvagens, com seis a oito 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, 2008). Os protocolos para utilização dos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da UFU (CEUA/UFU#087/12) (Anexo 1)

4.2 Delineamento experimental



4.3 Manutenção de parasitos em cultivo celular

Taquizoítos dos isolados Nc-1 (DUBEY *et al.*, 1988) e Nc-Liv (BARBER *et al.*, 1995) foram mantidos em monocamadas de células da linhagem HeLa (ATCC No. CCL-2), cultivadas em frascos com área de 25 cm² com meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 10% de solução de soro fetal bovino em atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem confluência. A manutenção foi realizada por meio de passagens seriadas após lise parcial da monocamada, em intervalos de 48 a 72 horas. O sobrenadante contendo parasitos extracelulares foi coletado e submetido a um processo de centrifugação diferencial (70 × g, 1 minuto, 4°C) para remoção de debríis celulares, sendo o sobrenadante novamente coletado e centrifugado (720 × g, 10 minutos, 4°C) para obtenção dos parasitos.

Os parasitos foram contados em câmara de hemocitométrica, utilizando o corante de exclusão vital Azul de Tripan a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), e imediatamente utilizados para a realização dos experimentos.

4.4 Ensaio de sobrevida

Camundongos C57BL/6 foram infectados com dose 1x10⁷ de taquizoítos dos isolados Nc- 1 ou Nc-Liv de *N. caninum*, em um volume de 200 µL, pela via intraperitoneal, sendo esta quantidade de parasitos a dose letal para 50% do grupo (DL=50) de camundongos infectados com o isolado Nc-Liv. Sabendo-se que a DL=50 para animais infectados com Nc-1 é de 2x10⁷. Esses padrões de doses letais foram padronizados em experimentos anteriores no

Laboratório de Imunoparasitologia da UFU. Os animais foram observados diariamente quanto à sobrevida e alterações de peso corporal durante 30 dias após o desafio.

4.5 Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA de células e tecidos de camundongos infectados com os dois isolados foi realizada como descrito por Miller e colaboradores (1988). Células do peritônio, pulmão, fígado e cérebro de animais infectados com 5×10^6 de taquizoítos dos dois grupos de isolados foram congelados em nitrogênio líquido para a preservação das amostras. Após processos de maceração dos órgãos foi adicionado o tampão de lise NL com SDS 10 e Proteinase . pós ficarem a 50 C *overnight* foi adicionado NaCl 6M para a separação do DNA. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e adicionado a álcool absoluto, no qual o DNA se tornou visível para coleta, onde foram adicionados à agua DEPC. As amostras então foram quantificadas em Nanodrop Lite, Thermo Scientific.

Para a quantificação do parasitismo tecidual, utilizou-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real, com o emprego de *SYBR green*. Para tal, foram utilizados pares de primers para detecção da região Nc5 de *N. caninum* (*Forward*: 5'-ACTGGAGGCACGCTGAACAC-3'; *Reverse*: 5'-AACAAATGCTTCGCAAGAGGAA-3'). Para a normalização dos resultados, quantificou-se o gene GAPDH de camundongos conforme descrição prévia (BARENCO *et al.*, 2014) (*Forward*: 5'-GGAGAACCTGCCAAGTATGATG-3'; *Reverse*: 5'-CAGTGTAGCCCCAAGATGCC-3'). As reações foram realizadas com um volume final de 25 μ l, contendo tampão de corrida com *SYBR green* (GoTaq qPCR, Promega), 10 pmol de cada primer e 100 ng e 5 ng de molde de DNA para os ensaios de detecção dos genes Nc5 e GAPDH, respectivamente. As curvas padrões (fator de diluição = 10) para ambas as sequências foram preparadas a partir de *N. caninum* e DNA genômico de camundongos e

foram utilizados para quantificação absoluta. Todas as amostras foram realizadas em triplicata. A amplificação, aquisição de dados e análise de dados foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (StepOne Plus, Applied Biosystems), e os valores de ciclo limiar (CT) foram exportados para o Microsoft Excel para análise.

4.6 Determinação da inflamação tecidual *in vivo*

Amostras de pulmão, fígado e sistema nervoso central de camundongos previamente infectados com ambos isolados foram coletadas em formol 10% tamponado com fosfato, substituído após 24h por etanol 70% 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). As lâminas foram fotografadas utilizando sistema de captura de imagens acoplado a microscópio (FSX100, Olympus).

4.7 Quantificação de citocinas

Para a determinação da produção de citocinas IL-12 e IFN- γ por camundongos infectados pelos isolados Nc-1 e Nc-Liv, foram feitos homogenatos de tecidos (pulmão, fígado e cérebro) onde os órgãos coletados foram pesados e a quantidade foi ajustada para 100mg de tecido em 500 μ L de solução contendo inibidor de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça). As amostras foram trituradas com o auxílio de um homogeneizador sendo em seguida centrifugada a 10.000 \times g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para a dosagem. Além dos órgãos, também foi coletado o exsudato peritoneal, e foi utilizado o método de ELISA segundo protocolos recomendados pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, EUA; BD Biosciences, San Diego, EUA). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning-Costar) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas

à temperatura ambiente. Após lavagem das placas com PBS-Tween 20 0,05% e bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras foram adicionadas, conforme diluições pré-padronizadas para cada analito, e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após novo ciclo de lavagens, adicionou-se os respectivos anticorpos de detecção biotinilados, e anticorpo conjugado estreptavidina-peroxidase. As reações foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H_2O_2 a 0,03%) e cromógeno 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 SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA.

Para quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-23 em amostras de soro, utilizou-se kits comerciais baseados em detecção de intensidade de fluorescência por beads recobertas com anticorpos de detecção, de acordo com instruções do fabricante (*Multiplex Flex Set Cytometric Bead Array*, CBA; BD Biosciences). Como curvas-padrão, as citocinas murinas recombinantes foram acrescentadas em diluições duplas seriadas (50 – 0,5 ng/mL). Adicionou-se a cada tubo 25 μ L de *beads* de captura; 25 μ L da solução de curva padrão ou amostras e 25 μ L anticorpo de detecção. pós 3 horas de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado 500 μ L do tampão de lavagem e centrifugado (200 x g / 5 minutos). Os ensaios foram adquiridos em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences) e os resultados obtidos foram analisados em *software* apropriado (FlowJo, TreeStar Inc., Asland, Oregon, EUA).

4.8 Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) em lavado peritoneal de animais infectados com ambos os isolados de *N. caninum* foi determinada a partir de *kit comercial* de detecção de NO (R&D Systems Inc., EUA). Um volume de 50µL de amostra foi acrescentado a placa de 96 poços paralelamente a curva padrão, seguido pela adição de NADH e nitrato redutase. Posteriormente, a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi desenvolvida por detecção colorimétrica utilizando reagente de Griess após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*Spectra Max M2e*, Molecular Devices, EUA) a 540nm com correção de 690nm sendo a concentração de NO determinada a partir da curva padrão e expressas em µmol/L.

4.9 Comparação da citologia peritoneal

Para análise da migração de diferentes tipos celulares elicitados pela infecção aguda por *N. caninum*, realizou-se a análise citológica do exsudato peritoneal de camundongos (n=5/grupo) infectados pela via intraperitoneal com uma dose de 5×10^6 de ambos os isolados estudados. Após três dias de infecção, os animais foram eutanaziados e foi realizado o lavado peritoneal com PBS para a coleta das células. O lavado foi coletado e centrifugado a 400 x g por 10 minutos para sedimentação da fração celular. O sobrenadante foi dispensado, as células foram ressuspensas e fixadas em lâminas histológicas por meio de esfregaço, os quais foram corados com solução comercial (Panótico Rápido, Laborclin produtos para laboratórios LTDA, Brasil). Foram quantificadas e qualificadas as células dispostas em dez campos em cada lâmina. As lâminas foram fotografadas utilizando sistema de captura de imagens acoplado a microscópio (FSX100, Olympus).

4.10 Análise estatística

Análise estatística foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Diferenças entre grupos foram analisadas por meio do teste One-way ANOVA, juntamente com os pós testes de comparação múltiplas de Bonferroni e Teste T ou Mann Whitney quando necessários. O ensaio de sobrevida foi estimado utilizando análise pelo método de Kaplan-Meier sendo que a curva de sobrevida foi comparada através do teste Log-rank (Mantel-Cox). Dados foram expressos em média e erro padrão. Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4.11 Normas de Biossegurança

A utilização dos equipamentos durante os experimentos, procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

Resultados

5. Resultados

5.1 Camundongos infectados com o isolado Nc-Liv são mais suscetíveis a infecção

Para avaliar a virulência de ambos os isolados estudados do protozoário *N. caninum*, foi realizado um ensaio de sobrevida com camundongos (n=10/grupo) com uma dose letal para 50% dos animais, DL50. Observou-se que camundongos pertencentes aos dois grupos apresentaram sinais clínicos da infecção a partir do sétimo dia, sendo observada letargia, postura encurvada, pêlos arrepiados e dificuldades respiratórias. A partir do 11º dia de infecção, notou-se a presença de sinais neurológicos, com paralisia de membros posteriores e anteriores, e/ou andando em círculos em cinco animais de ambos os grupos. Além disso, camundongos infectados com Nc-Liv apresentaram significativa perda de peso em relação aos animais infectados com o isolado Nc-1 ($P=0,0092$ Figura 2). Em relação à sobrevida, camundongos infectados com Nc-1 apresentou 100% de sobrevivência, tendo o grupo infectado com o isolado Nc-Liv apresentando a partir do 11º dia de infecção 50% de mortalidade ($P= 0,0115$ Figura 3).

Adicionalmente, analisou-se o perfil de células recrutadas ao peritônio após três dias de infecção. Neste ensaio, foi constatado um maior recrutamento de neutrófilos no peritônio de animais infectados com Nc-Liv, em relação com animais infectados com Nc-1 e NI (não infectados) ($P=0,001$ Figura 4A). Além disso, animais NI apresentaram maior recrutamento de eosinófilos ($P=0,0024$ Figura 4C), basófilos ($P=0,0249$ Figura 4D) e linfócitos ($P=0,0019$ Figura 4E) em relação aos animais infectados com ambos os isolados. Portanto, ocorreu um recrutamento de macrófagos/monócitos (Figura 4B) mas não houve diferenças significativas entre os grupos analisado.

Comparando-se a carga parasitária em diferentes fases da infecção, observou-se que camundongos infectados com Nc-Liv apresentaram maior número de cópias de DNA genômico do isolado em células do peritônio após 7 dias de infecção ($P=0,0065$) e no cérebro aos 30 dias de infecção ($P=0,0016$), quando comparados com animais infectados com o isolado Nc-1 (Figuras 5A e 5D). Amostras de pulmão e fígado de camundongos infectados com os dois isolados em análise apresentaram-se parasitados, contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$; Figuras 5B e 5C). Quanto ao padrão de inflamação tecidual, observou-se infiltrados inflamatórios nos diferentes tecidos analisados (Figura 6), sem diferenças quantitativas claras entre os grupos estudados.

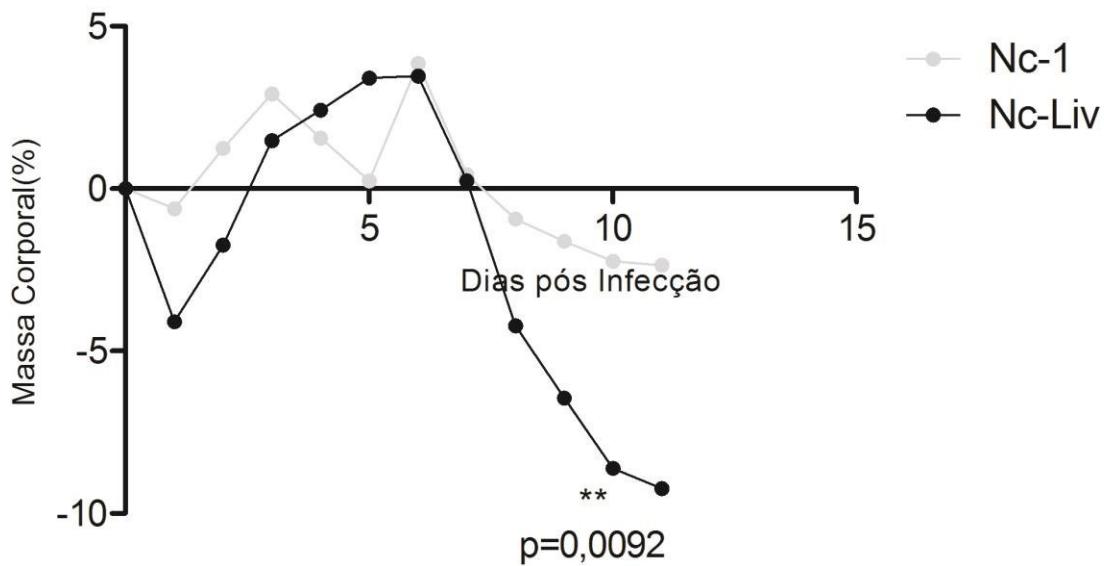


Figura 2: Curva de morbidade de camundongos infectados com os dois isolados de *N. caninum*, Nc-1 e Nc-Liv. Grupos de camundongos C57BL/6 (n=10/grupo) foram infectados com a dose (DL50) de 1×10^7 taquizoítos, pela via intraperitoneal. Os pesos dos animais foram monitorados durante a curva de sobrevida até o primeiro dia de mortalidade (11º dia). Diferenças entre grupos foram comparadas usando análise estatística paramétrico teste t Student. O valor de P para diferença significativa foi de $P < 0,05$.

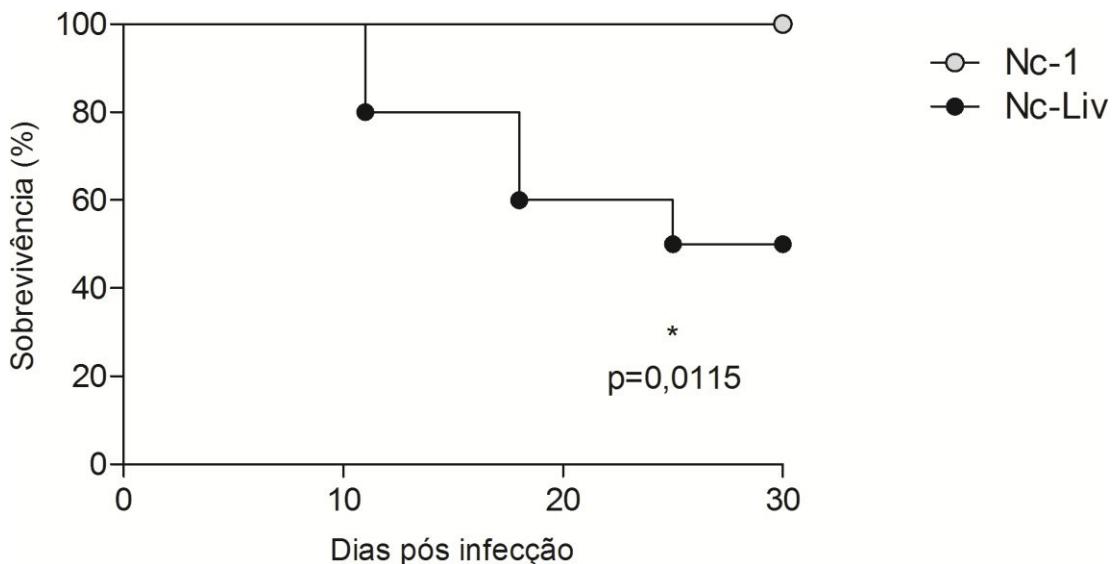
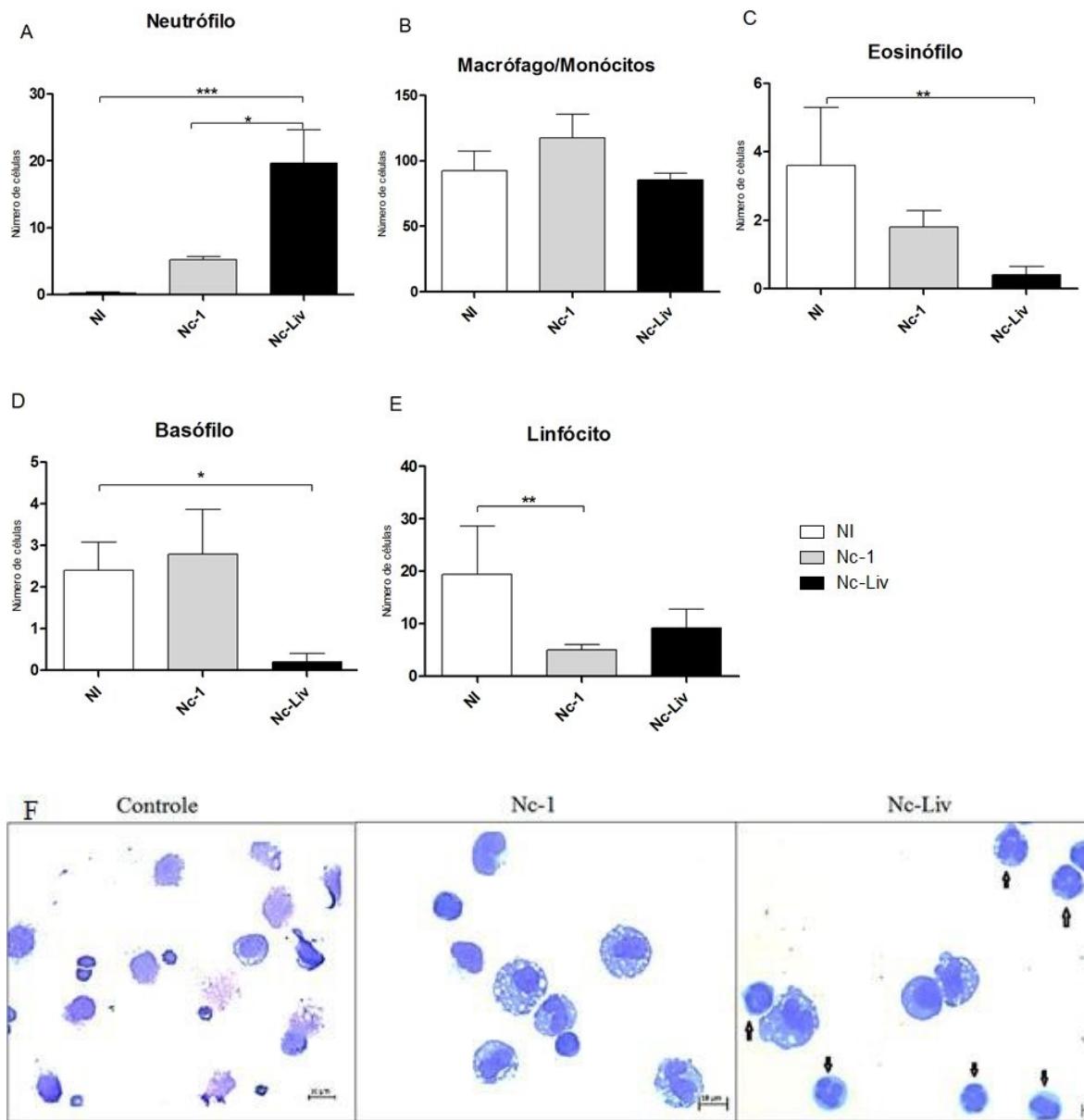


Figura 3: Curva de sobrevida de camundongos infectados com os dois isolados de *Neospora caninum*, Nc-1 e Nc-Liv. Grupos de camundongos C57BL/6 (n=10/grupo) foram infectados com a dose (DL50 para Nc-Liv) de 1×10^7 taquizoítos, pela via intraperitoneal. Após a infecção, os camundongos foram monitorados por 30 dias para determinação da curva de sobrevida. Diferenças entre grupos foi comparada usando análise de sobrevida por Kaplan-Meier, através do teste de log-rank. O valor de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.



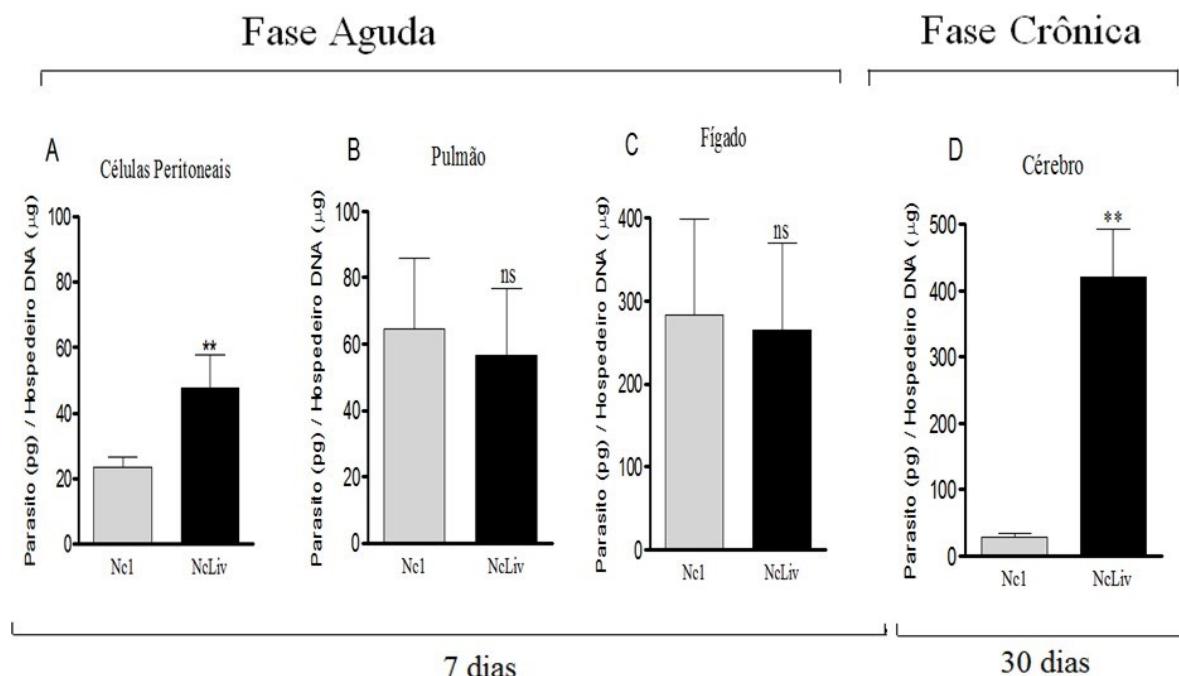


Figura 5: Quantificação da carga parasitária em diferentes regiões de camundongos infectados com os isolados Nc-1 e Nc-Liv do protozoário *N. caninum*. Camundongos foram infectados com 5×10^6 taquizoítos dos isolados Nc-1 e Nc-Liv de *N. caninum* e eutanaziados após sete dias para coleta de lavado peritoneal, amostras de pulmão e fígado e, aos 30 dias de infecção, amostras de tecido cerebral. Os dados foram obtidos a partir da reação de qPCR pela amplificação do gene Nc5, normalizado pelo gene GAPDH de camundongo. Diferenças entre grupos foram comparadas utilizando teste *t* de Student. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente relevante.

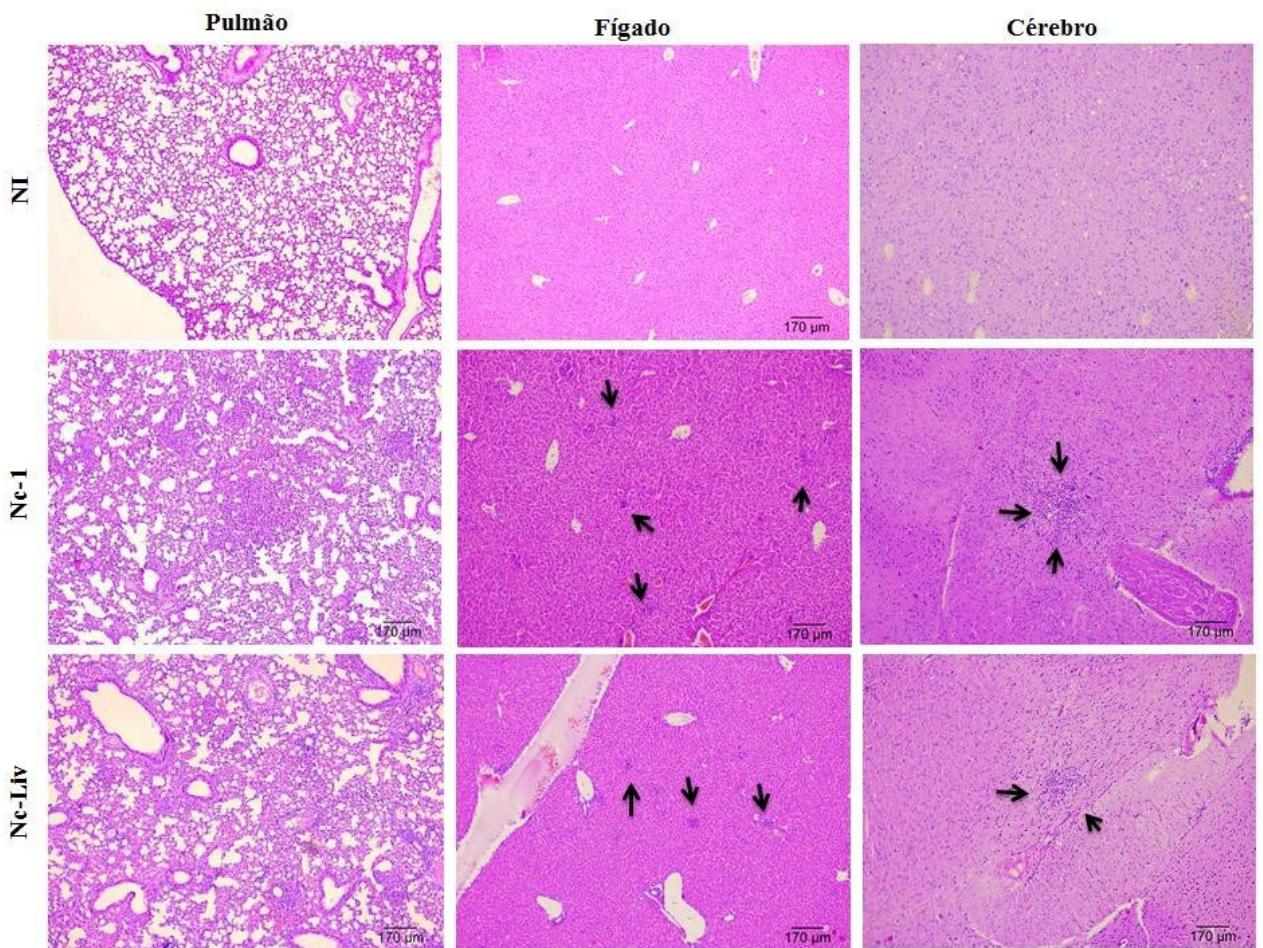


Figura 6: Inflamação tecidual em camundongos infectados com os isolados Nc-1 e Nc-Liv do protozoário *N. caninum*. Amostras de tecidos contendo infiltrados inflamatórios após sete dias (Pulmão e fígado) e 30 dias de infecção (Sistema nervoso central) com 5×10^6 taquizoítos dos isolados Nc-1 e Nc-Liv. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio equipado com sistema de captura de imagens. As setas nas imagens representam focos de inflamação.

5.2 Padrão de citocinas produzidas por camundongos infectados com Nc-Liv difere-se com os infectados com Nc-1

Para avaliar o padrão de produção de citocinas mediante a infecção pelos isolados estudados, foram realizadas dosagem de citocinas em diferentes amostras biológicas de camundongos infectados, durante as fases agudas e crônicas da infecção.

Primeiramente, determinou-se a indução do perfil de resposta Th1 (produção de IL-12 e IFN- γ) de camundongos infectados com os isolados Nc-1 e Nc-Liv e também os NI em exsudato peritoneal, pulmão, fígado e cérebro. Houve produção com diferenças significativas das citocinas nos camundongos infectados em relação com os não infectados: exsudato peritoneal, IL-12 P= 0,0008 (Figura 7A) e IFN- γ P=0,0003 (Figura 7); pulmão, IL-12 P=0,0001 (Figura 7C) e IFN- γ P=0,0004 (Figura 7D); fígado, IL-12 P=0,0004 (Figura 7E) e IFN- γ não ouve diferença significativa (Figura 7F); e cérebro, IL-12 P= 0,0012 (Figura 7G) e IFN- γ não ocorreu detecção.

Também foi determinada a produção de óxido nítrico, onde animais infectados com Nc- Liv apresentou diferença significativa (P=0,0402) quando comparados ao grupo NI, entretanto, não há diferença quando comparado com a produção em camundongos infectados com Nc-1 (Figura 8).

Com a intenção de se verificar a indução de outros padrões de resposta imune celular elicitadas pelos isolados de *N. caninum*, analisou-se a produção de diferentes citocinas no soro de camundongos após 7 dias de infecção. Camundongos infectados com Nc-Liv apresentaram uma maior produção das citocinas IL-2 (P=0,0043 Figura 9A), IL-4 (P=0,0181 Figura 9B), IL-17 (0,0007 Figura 9E) e IL-23 (P=0,0001 Figura 9F) em relação aos animais infectados com Nc-1 e também aos NI, além disso camundongos infectados apresentaram maior

produção de TNF em relação aos NI ($P=0,0003$ Figura 9D) e os infectados com Nc-Liv apresentaram maior produção de IL-21 quando comparados com o NI ($0,0129$ Figura 9G), entretanto, quando comparados aos infectados com o isolado Nc-1, não apresentou diferenças.. As demais citocinas analisadas, como IL-6 (Figura 9C) e IL-10 (Figura 9H), apresentaram produção semelhante entre os grupos analisados, com exceção da citocina IL- 17F, que não foi detectada nas amostras.

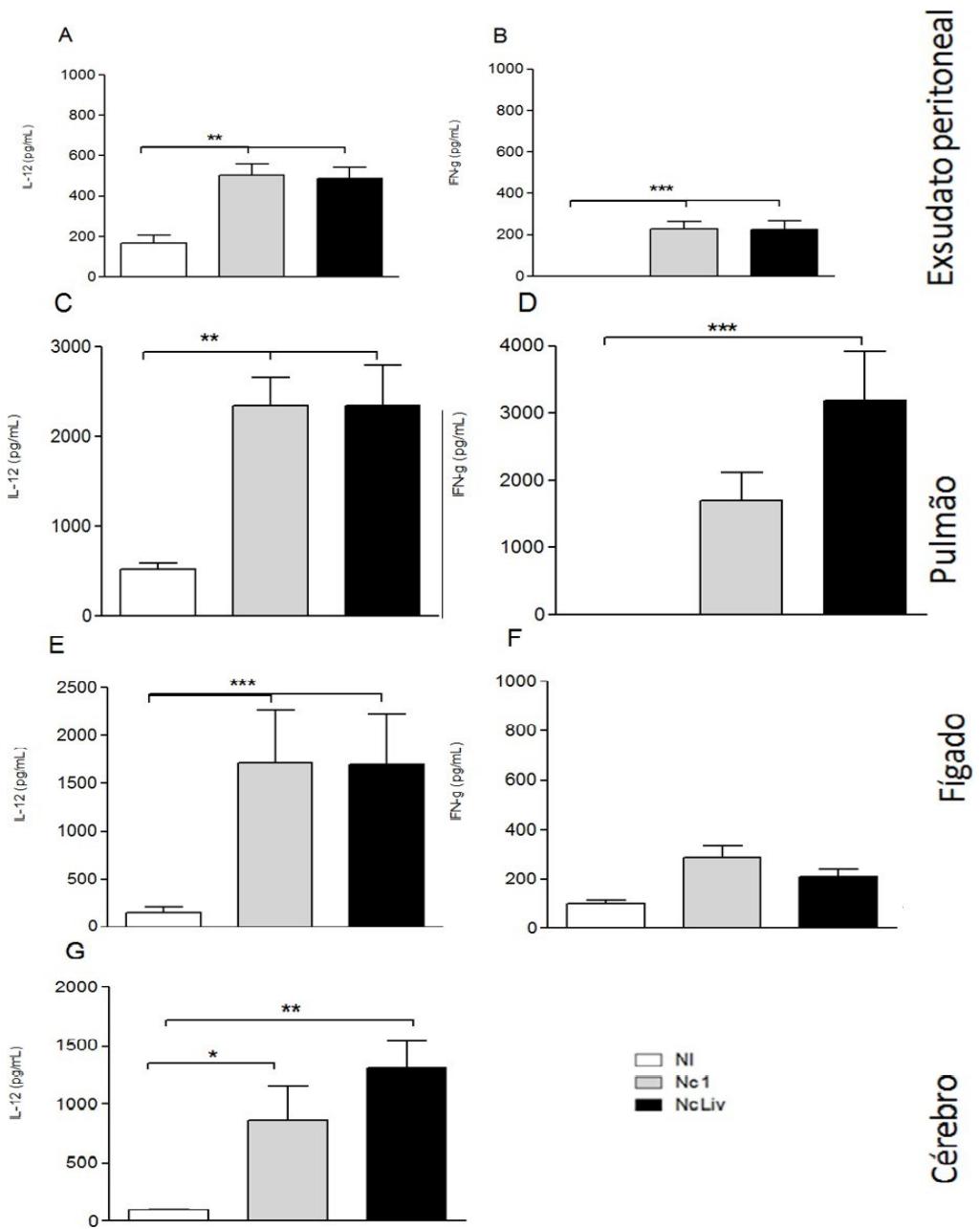


Figura 7: Nível de citocinas IL-12 e IFN- γ em diferentes regiões de camundongos infectados com os isolado Nc-1 e Nc-Liv do protozoário *N. caninum*. Grupos de camundongos foram infectados com 5×10^6 taquizoítos dos isolados Nc-1 e Nc-Liv (NI=Não Infectado) de *N. caninum* e analisados (n=10 camundongos/grupo). A produção de IFN- γ e IL-12p40 foi mensurada 7 dias pós infecção em lavado peritoneal e homogenato de pulmão e fígado e 30 dias em homogenato de cérebro. Os dados foram analisado com o método estatístico paramétrico One way ANOVA com pós teste de múltipla comparação de Bonferroni, o valor de P para diferença significativa foi de P<0,05.

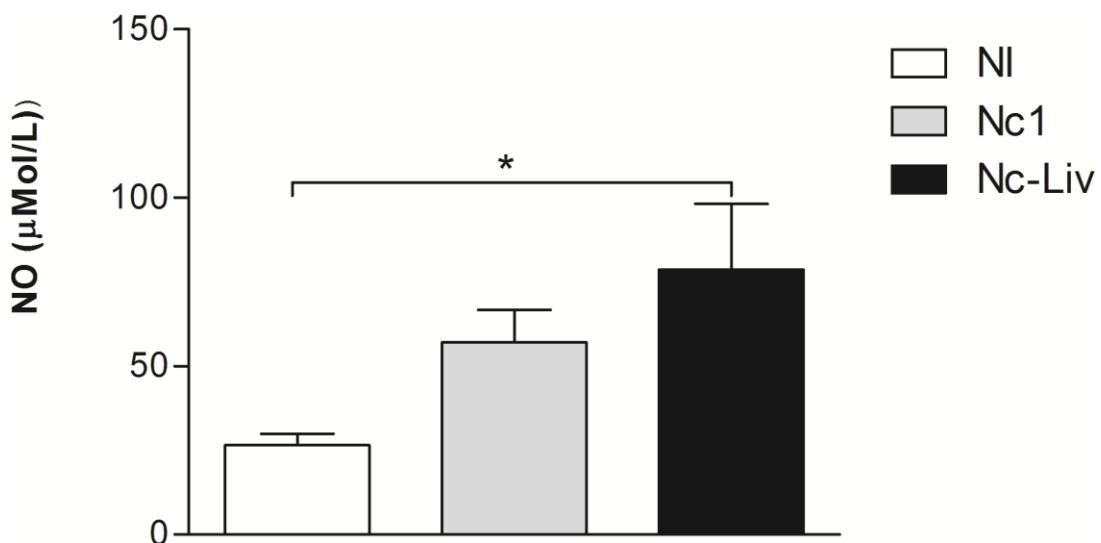


Figura 8: Dosagem da produção de Óxido Nítrico em exsudato peritoneal de camundongos infectados com os isolado Nc-1 e Nc-Liv do protozoário *N. caninum*. Grupos de camundongos foram infectados com 5×10^6 taquizoítos dos isolados Nc-1 e Nc-Liv (NI= Não Infectado) de *N. caninum* (n=10 camundongos/grupo). A produção de NO (óxido nítrico) foi mensurada 7 dias após a infecção em amostras de lavado peritoneal. Os dados foram obtidos a partir da reação de nitrato redutase com a analisado com o método estatístico paramétrico One way ANOVA com pós teste de múltipla comparação de Bonferroni, o valor de P para diferença significativa foi de P<0,05.

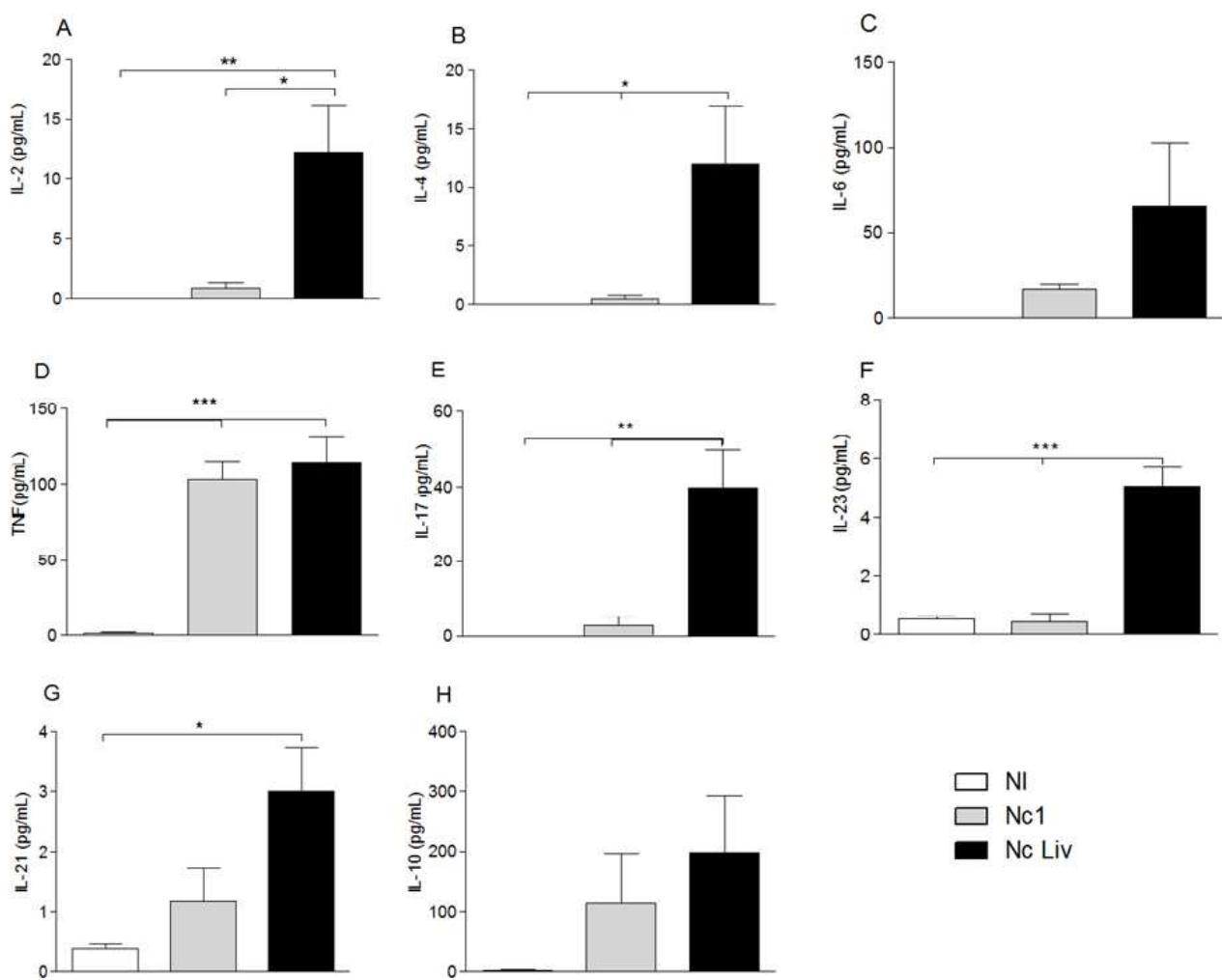


Figura 9 Mensuração de citocinas séricas de camundongos infectados com os isolado Nc-1 e Nc-Liv do protozoário *N. caninum*. Grupos de camundongos foram infectados com 5×10^6 taquizoítos dos isolados Nc-1 e Nc-Liv de *N. caninum* (n=10 camundongos/grupo). A produção das citocinas foi mensurada em amostras de soro extraídas de animais Não Infectados (NI) ou após 7 dias de infecção com os diferentes isolados. Os dados foram obtidos a partir da reação de CBA. Utilizou-se o método One way ANOVA com pós teste de múltipla comparação de Bonferroni para comparação estatística dos grupos, onde o valor de P<0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

Discussão

6. Discussão

A grande importância de estudos com o protozoário *N. caninum* se dá pela questão da infecção em bovinos pela perda econômica na produção de rebanhos e láctea devido à infecção congênita, além de causar doença neuromuscular em cães (DONAHOE *et al.*, 2015). As características do parasito, forma de infecção e patogenia são motivos de pesquisa, para então poder diferenciar o protozoário estudado com *Toxoplasma gondii*, já que o perfil de infecção é muito similar. Como sabemos, o parasito *T. gondii* apresenta diversas cepas divididas em tipo I, tipo II e tipo III de acordo com sua virulência (JIANG *et al.*, 2015), já *N. caninum* possui diferentes isolados, encontrados em canídeos, bovinos e outros animais que são estudados, não possuem um padrão de virulências de cepas como é o caso de *T. gondii* (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Neste estudo as características de resposta imune dos dois isolados (Nc-1 e Nc-Liv) de *N. caninum* foram comparados. De acordo com Dubey e Schares (2011) a maioria dos isolados de cães, como os estudados, foram encontrados em animais doentes. Um requisito fundamental para a compreensão da epidemiologia e patogenicidade de *N. caninum* é o conhecimento da diversidade biológica e genética encontrada dentro da espécie (AL- QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010; SCHOCK *et al.*, 2001). Vários autores tem descrito a existência de variabilidade intra-específica de *N. caninum*, uma vez que as diferenças no crescimento *in vitro* e virulência em modelos murinos foram observados entre diferentes isolados (ROJO-MONTEJO *et al.*, 2009). Isso pode estar relacionado devido à grande quantidade de hospedeiros intermediários da espécie, distribuição geográfica mundial e sua

capacidade para a reprodução sexual; por isso, diferenças biológicas e genéticas significativas se poderia esperar de existir (AL-QASSAB *et al.*, 2009).

Comparando ambos os isolados em relação à mortalidade, sugere-se que Nc-Liv apresenta maior efeito prejudicial sobre camundongos infectados com 1×10^7 de taquizoítos quando comparados a animais infectados com Nc-1. Resultado que está de acordo com Collantes-Fernandez (2006), onde camundongos BALB/c infectados com 1×10^6 taquizoítos de Nc-Liv apresentam maior mortalidade e apresentavam maiores sinais clínicos da infecção por *N. caninum*, tais como: perda de peso, caquexia e sinais neurológicos, quando comparados também a Nc-1, assim como ocorreu com o presente estudo. Em estudo comparando cães filhotes nascidos infectados com Nc-1 com cães infectados com Nc-Spain, os animais com o isolado Nc-1 apresentaram mais sinais clínicos e maior mortalidade em relação ao isolado Nc-Spain (ROJO-MONTEJO *et al.*, 2009). Ainda os isolados NCts-8 e Nc-2 quando comparados com Nc-1 apresentaram menos mortalidade em animais com genes depletados para o receptor TNF, IFN- γ e IL-10 (RITTER *et al.*, 2002). Com isso, podemos afirmar que ocorre uma linha de virulência com relação à mortalidade dentro dos isolados, pois Nc-Liv apresenta maior mortalidade quando comparados com Nc-1, enquanto Nc-1 parece ser mais virulento que outros isolados.

Durante a infecção por *N. caninum* via intraperitoneal ocorre parasitismo na região peritoneal, pulmão e fígado com 7 dias, e no cérebro com 30 dias, como demonstrado no estudo. Ainda foi identificado um maior parasitismo em células do peritônio e no cérebro de animais infectados com o isolado Nc-Liv comparando-se com Nc-1, o que concorda com estudos onde durante a infecção crônica, camundongos infectados com Nc-Liv possuem um maior parasitismo cerebral quando comparado com Nc-1 (COLLANTES-FERNANDEZ *et*

al., 2006). Além disso em estudos comparando a quantidade de cistos teciduais no cérebro de camundongos infectados com Nc-Liv e Nc-2, os infectados com Nc-Liv apresentavam maior quantidade de cistos na superfície cerebral (MCGUIRE *et al.*, 1997). Em contraste, em estudos de Ritter e colaboradores (2002), animais IL-10 *-/-* infectados com Nc-2 apresentaram maior parasitemia cerebral quando comparados aos infectados com Nc-1. Isso demonstra ainda que o isolado Nc-Liv possui maior capacidade de parasitemia cerebral quando comparado ao isolado Nc-1, até mesmo pela capacidade da formação de cisto que o isolado possui (BARBER *et al.*, 1995).

As análises histológicas do presente estudo não apresentaram diferenças, entretanto há ocorrências de focos inflamatórios em pulmões, fígados e cérebros de animais infectados, concordando assim com o estudo de Miller e cols. (2002) onde demonstra focos inflamatórios de animais infectados com o isolado de Nc-Liv. No mesmo estudo as lesões são comparadas com animais infectados com o isolado NC-Nowra, no qual camundongos infectados com Nc-Liv apresentavam maior número de lesões (MILLER *et al.*, 2002).

A infecção do protozoário *N. caninum* ativa uma resposta de perfil Th1, na qual ocorre a produção de IL-12 por APCs onde acontece a liberação de IFN- γ para o controle parasitário (MINEO *et al.*, 2009). No presente estudo, foi analisada a produção das citocinas IL-12 e IFN- γ no exsudato peritoneal, homogenatos de pulmão, fígado e cérebro e foi constatado a produção das mesmas, mesmo não ocorrendo diferenças significativas entre os grupos dos isolados mas com diferença significativa quando comparado ao grupo de animais não infectados. Em concordância com estudos imunológicos realizados em bovinos e camundongos, a imunidade protetora do hospedeiro frente a uma infecção por *N. caninum* é típica resposta Th1 (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006). Na fase aguda

da infecção, esta é mediada pela ativação de células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas via reconhecimento pelo TLR2, dependente da molécula adaptadora MyD88, levando à secreção de IL-12 que estimula as células NK a produzirem e secretarem altos níveis de IFN- γ , além de induzir a diferenciação de células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ (NISHIKAWA *et al.*, 2003; HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006; MINEO *et al.*, 2009; MINEO *et al.*, 2010; DONAHOE *et al.*, 2015).

Entretanto ocorreu diferença durante a infecção na maior produção de respostas do tipo Th2 e Th17 em camundongos infectados com o isolado Nc-Liv em relação com o isolado Nc-1. A produção da citocina IL-17 vem sendo elucidada para explicar a chave do sistema imunológico, exibindo proteção contra doenças infecciosas e promovendo inflamação (PECKHAM *et al.*, 2014). O papel das células Th17 durante a infecção por *N. caninum* pode possivelmente estar relacionado com a produção de anticorpo protetor, ou um nível mais elevado de função como recrutamento de neutrófilos efetores em influxo celular (PECKHAM *et al.*, 2014). A evidência a partir de *T. gondii*, que é um parasito intimamente relacionado ao *N. caninum* sugere a interação das respostas do tipo Th1 e Th17 ao darem origem à patologia, visto que durante a infecção oral ocorre uma forte resposta Th1 que pode desenvolver grave patologia intestinal, enquanto que a inflamação neurológica causada pela infecção crônica é mediada pela IL-17 (STUMHOFER *et al.*, 2006). Ainda, em estudos com *T. gondii* sugerem que vários tipos de moléculas do parasito poderiam induzir IL-23 e IL-12 na secreção de células monocíticas (QUAN *et al.*, 2013).

Em estudos, células *naïves* de bovinos infectadas com *N. caninum* apresentaram a produção da citocina IL-17. Este resultado identifica uma potencial ligação entre a imunopatologia causada por esforços do organismo do hospedeiro para tentar limitar a

replicação do parasita. Este resultado pode oferecer alguns *insights* sobre o duplo papel aparente de IFN- γ na mediação de proteção e patologia durante a infecção *N. caninum*, pois a produção de ambas as citocinas podem estar interligadas no início da infecção (CUA *et al.*, 2003).

O recrutamento de neutrófilo foi observado ainda por camundongos infectados com o isolado Nc-Liv. Isso pode ser explicado pela ativação da resposta do perfil Th17, com a produção de IL-17, pois a mesma é caracterizada por uma resposta rápida a agentes infecciosos pelo recrutamento de neutrófilos como primeira linha de defesa e induzir a produção de peptídeos antimicrobianos (ISAILOVIC *et al.*, 2015). Além disso, em estudos, IL-17 mostrou ser expressa pelos neutrófilos de camundongos com periodontite e, mais recentemente, uma população de neutrófilos humanos que expressa o fator de transcrição dependente do retinóide-receptor órfão gama t (ROR γ t) foi identificado, e ambos produz e responde a interleucina-17 (ZENOIA; HAJISHENGALLIS, 2015).

Por fim, os resultados demonstrados neste trabalho mostram que o isolado Nc-Liv quando comparado ao isolado Nc-1 de *N. caninum* apresenta uma virulência mais acentuada, podendo ser explicada pelo perfil de resposta Th17 que é ativado durante a infecção.

Conclusões

7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, concluímos:

- O isolado Nc-Liv, quando comparado ao isolado Nc-1, induz maior comprometimento clínico dos camundongos, com a indução de mortalidade;
- Camundongos infectados com o isolado Nc-Liv possuem um maior parasitismo peritoneal na fase aguda, e cerebral na fase crônica da infecção, em relação a infecção por Nc-1;
- Ambos os isolados induzem de forma semelhante à produção de mediadores de padrão Th1 durante as diferentes fases da infecção;
- Camundongos infectados com Nc-Liv possuem um maior recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal durante a fase aguda da infecção;
- A infecção pelo isolado Nc-Liv induz um padrão de resposta imune celular misto, com a presença concomitante de citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17, enquanto Nc-1 elicitava uma resposta de perfil Th1 clássico.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ABE, C.; TANAKA, S.; IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 21, 1185-1188,2014. <https://doi.org/10.1128/CVI.00082-14>

AL-QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. *Mol Cell Probes*, 24, 20-26,2010. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.08.002>

AL-QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; IVENS, A.; ELLIS, J. T. Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Mol Cell Probes*, 23, 132-139, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.01.006>

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. *Res Vet Sci*, 95, 303-309,2013. ANDRIANARIVO, A. G.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; GARDNER, I. A.; REYNOLDS, J. P.; CHOROMANSKI, L.; CONRAD, P. A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol Res*, 96, 24-31,2005. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1313-y>

ATKINSON, R.; HARPER, P. A.; RYCE, C.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 118 (Pt 4), 363- 370,1999. BARBER, J. S.; HOLMDAHL, O. J.; OWEN, M. R.; GUY, F.; UGGLA, A.; TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology*, 111 (Pt5), 563-568, 1995.

<https://doi.org/10.1017/S0031182000077039>

BARENCO, P. V.; LOURENCO, E. V.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ROQUE BARREIRA, M. C.; SILVA, D. A.; ARAUJO, E. C.; COUTINHO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Toxoplasma gondii 70 kDa heat shock protein: systemic detection is associated with the death of the parasites by the immune response and its increased expression in the brain is associated with parasite replication. *PLoS One*, 9, e96527,2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096527>

BASSO, W.; SCHARES, S.; MINKE, L.; BARWALD, A.; MAKSIMOV, A.; PETERS, M.; SCHULZE, C.; MULLER, M.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol*, 173, 24-31,2010.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.009>

BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; KIENAST, M.; UNZAGA, J. M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Vet Parasitol*, 131, 299-303,2005.61

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.003>

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*, 70, 271-274,1984.

<https://doi.org/10.1007/BF00942230>

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol*, 18, 546-552,2002.

[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol*, 22, 448-452,2006.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.002>

CANTON, G. J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; BENAVIDES-SILVAN, J.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PANG, Y.; SMITH, S. H.; ROCCHI, M.; BUXTON, D.; INNES, E. A.; CHIANINI, F. Cytokine expression in the placenta of pregnant cattle after inoculation with *Neospora caninum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 161, 77-89,2014.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.07.004>

CHRYSSAFIDIS, A. L.; CANTON, G.; CHIANINI, F.; INNES, E. A.; MADUREIRA, E. H.; GENNARI, S. M. Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora caninum* in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy. *Parasitol Res*, 113, 1521-1528,2014.

<https://doi.org/10.1007/s00436-014-3796-x>

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; LOPEZ-PEREZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infect Immun*, 74, 2491-2494,2006.

<https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2491-2494.2006>

CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J. P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitology*, 106 (Pt 3), 239-249,1993.

<https://doi.org/10.1017/S0031182000075065>

CUA, D. J.; SHERLOCK, J.; CHEN, Y.; MURPHY, C. A.; JOYCE, B.; SEYMOUR, B.; LUCIAN, L.; TO, W.; KWAN, S.; CHURAKOVA, T.; ZURAWSKI, S.; WIEKOWSKI, M.; LIRA, S. A.; GORMAN, D.; KASTELEIN, R. A.; SEDGWICK, J. D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-748,2003.

<https://doi.org/10.1038/nature01355>

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? *Vet Parasitol*, 178, 64- 69,2011.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.016>

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 31, 747- 752,2001.62

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00230-2)

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; SLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 4, 216-238,2015.

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol*, 134, 267-289,2006. 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. *J Am Vet Med Assoc*, 193, 1259-1263,1988.

<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.004>

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, 67, 1-59,1996.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7)

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; HILL, D.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C.; SILVA, J. C.; OLIVEIRA-CAMARGO, M. C.; GENNARI, S. M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. *J Parasitol*, 88, 1251-1252,2002.
[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1251:POATNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1251:POATNC]2.0.CO;2)

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. *Vet Parasitol*, 180, 90- 108,2011.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev*, 20, 323-367,2007.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol*, 116, 275-296,2003.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00263-2)

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. *Mol Biochem Parasitol*, 174, 117-127,2010.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.08.007>

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R. C.; BJORKMAN, C.; LOCK, T. F.; FIRKINS, L. D.; GAO, L.; FISCHER, W. R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J Parasitol*, 90, 1394-1400,2004.
<https://doi.org/10.1645/GE-359R>

GONDIM, L. F.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O.; JESUS, E. E.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet Parasitol*, 101, 1-7,2001.63
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00493-9)

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. *Infect Genet Evol*, 13, 133-150,2013.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology*, 133, 261- 278,2006.
<https://doi.org/10.1017/S0031182006000485>

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 108, 29-36,2005.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>

ISAILOVIC, N.; DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; SELMI, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun*, 60, 1-11,2015.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.04.006>

JIANG, Z. R.; AN, R.; YANG, J.; WAN, L. J.; DU, J. [Construction and Identification of Transgenic Strain of *Toxoplasma gondii* High-expressing Virulence Factor ROP18]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 33, 14-18,2015.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*, 18, 198-201,2002.

[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02248-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02248-1)

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*. *Int J Parasitol*, 28, 1473- 1478,1998.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6)

MCGUIRE, A. M.; MCALLISTER, M. M.; JOLLEY, W. R.; ANDERSON-SPRECHER, R. C. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J Parasitol*, 83, 647-651,1997.

<https://doi.org/10.2307/3284241>

MILLER, C. M.; QUINN, H. E.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust Vet J*, 80, 620-625,2002.

<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2002.tb10967.x>

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

<https://doi.org/10.7476/9788570785237>

MINEO, T. W.; BENEVIDES, L.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. *Vet Res*, 40, 32,2009.

<https://doi.org/10.1051/vetres/2009015>

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. *Vet Parasitol*, 182, 352- 355,2011.64

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.022>

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*. *Immunol Cell Biol*, 88, 825-833,2010.

<https://doi.org/10.1038/icb.2010.52>

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

<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0288-7>

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; JAKEL, T.; HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. *Mol Biol Evol*, 17, 1842-1853,2000.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026285>

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*, 240, 269-285,2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*, 89, 557-563,2011.

<https://doi.org/10.1189/jlb.0710409>

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Vet Parasitol*, 116, 175-184,2003.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.001>

PECKHAM, R. K.; BRILL, R.; FOSTER, D. S.; BOWEN, A. L.; LEIGH, J. A.; COFFEY, T. J.; FLYNN, R. J. Two distinct populations of bovine IL-17(+) T-cells can be induced and WC1(+)IL 17(+)gammadelta T-cells are effective killers of protozoan parasites. *Sci Rep*, 4, 5431,2014.

<https://doi.org/10.1038/srep05431>

QUAN, J. H.; ZHOU, W.; CHA, G. H.; CHOI, I. W.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. Kinetics of IL-23 and IL-12 secretion in response to *Toxoplasma gondii* antigens from THP-1 monocytic cells. *Korean J Parasitol*, 51, 85-92,2013.

<https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.1.85>

REGIDOR-CERRILLO, J.; ARRANZ-SOLIS, D.; BENAVIDES, J.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; MEZO, M.; PEREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; GONZALEZ WARLETA, M. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet Res*, 45, 10,2014.

<https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-10>

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. *Int J Parasitol*, 43, 133-142,2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Control options for *Neospora caninum* infections in cattle--current state of knowledge. *N Z Vet J*, 50, 86-92,2002.65

<https://doi.org/10.1080/00480169.2002.36288>

RITTER, D. M.; KERLIN, R.; SIBERT, G.; BRAKE, D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J Parasitol*, 88, 271-280,2002.

[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0271:IFITCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0271:IFITCO]2.0.CO;2)

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ALVAREZ GARCIA, G.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; PEDRAZA-DIAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Vet Parasitol*, 159, 7-16,2009.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.009>

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, H.; KAISER, P.; HARTLEY, C.; SMITH, R. F.; ROBINSON, R.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *PLoS One*, 6, e15799,2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015799>

SALEHI, N.; GOTTSSTEIN, B.; HADDADZADEH, H. R. Genetic diversity of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite markers. *Parasitol Int*, 64, 357-361,2015.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.05.005>

SCHOCK, A.; INNES, E. A.; YAMANE, I.; LATHAM, S. M.; WASTLING, J. M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 123, 13-23,2001.

<https://doi.org/10.1017/S003118200100796X>

STENLUND, S.; BJORKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J.; KINDAHL, H.; UGGLA, A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 83, 214-219,1997.
<https://doi.org/10.1007/s004360050236>

STUMHOFER, J. S.; LAURENCE, A.; WILSON, E. H.; HUANG, E.; TATO, C. M.; JOHNSON, L. M.; VILLARINO, A. V.; HUANG, Q.; YOSHIMURA, A.; SEHY, D.; SARIS, C. J.; O'SHEA, J. J.; HENNIGHAUSEN, L.; ERNST, M.; HUNTER, C. A. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*, 7, 937-945,2006.

<https://doi.org/10.1038/ni1376>

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30, 1217-1258,2000. TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol*, 21, 558-561,2005.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>

WILLIAMS, D. J.; HARTLEY, C. S.; BJORKMAN, C.; TREES, A. J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology*, 136, 1895-1900,2009.

<https://doi.org/10.1017/S0031182009990588>

ZENOBLIA, C.; HAJISHENGALLIS, G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*, 69, 142-159,2015.

<https://doi.org/10.1111/prd.12083>

9. ANEXO



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 N° 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 DESTE ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 26 de Setembro de 2012



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