

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E
HUMORAL DE CÃES FRENTE À INFECÇÃO ORAL
POR *NEOSPORA CANINUM***

Tiago Wilson Patriarca Mineo
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E
HUMORAL DE CÃES FRENTE À INFECÇÃO ORAL
POR *NEOSPORA CANINUM***

Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador: Prof. Dr. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2007

DADOS CURRÍCULARES DO AUTOR

TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO, nascido em São Paulo – SP, no dia 13 de março de 1979, é filho de José Roberto Mineo e Luiza Silva Patriarca Mineo, graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, em janeiro de 2002. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, nesta instituição, em julho de 2003. Desde então, se dedicou ao melhor entendimento das interações do *Neospora caninum* com seus hospedeiros, com maior enfoque aos cães, seus hospedeiros definitivos. Desde 1998 tem se dedicado a pesquisas científicas relacionadas à biologia e epidemiologia dos protozoários *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, sendo que estas geraram nove publicações científicas em periódicos nacionais e internacionais de impacto na área. Durante estes anos dedicados à pesquisa científica, participou de 17 eventos nacionais e internacionais durante os últimos nove anos, os quais levaram a apresentação de 29 trabalhos como autor ou co-autor. Atualmente, encontra-se envolvido em diversos projetos pesquisa relacionados à biologia de parasitas, principalmente *N. caninum*, em diversas espécies animais. Alguns destes ainda se encontram em fase de desenvolvimento, enquanto outros já foram submetidos à análise do corpo editorial de periódicos nacionais e internacionais. Durante o período em que permaneceu em Jaboticabal, teve a oportunidade de lecionar aos cursos de graduação em Medicina Veterinária, Zootecnia e Ciências Biológicas, em disciplinas como Imunologia Veterinária, Parasitologia Geral e Veterinária e Doenças Parasitárias dos animais domésticos. Foi professor responsável pela disciplina de Parasitologia Geral no curso de Ciências Biológicas da FCAV/UNESP no ano de 2005, além de ministrar os módulos de protozoologia e artrópodes vetores ao mesmo curso, no segundo semestre de 2006. Após seu doutoramento, a intenção deste pesquisador é averiguar sobre aspectos inéditos da relação parasito-hospedeiro entre *N. caninum* e os hospedeiros-chave em seu ciclo biológico, com o intuito de se desenvolver terapias e/ou métodos profiláticos contra a infecção por este protozoário de grande importância na Medicina Veterinária e com alto potencial zoonótico.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a razão fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos.”

“Algo é só impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”

Albert Einstein (1879-1955)

Ao meu Pai,

que foi o grande responsável por minha inicialização científica, além de, juntamente com minha Mãe, prover-me com a genética, valores sociais e visão crítica, sem os quais seria incapaz de ser quem sou. Obrigado por ter me dado um rumo a minha vida, nos momentos que mais precisei...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

. À minha Mãe e irmãs, Ana Luiza e Marcela, por todos os momentos que passamos juntos e por saber que sempre acreditaram em mim;

. À Fernanda, minha companheira por nove anos, e Isabella, nossa filhinha de cinco meses. Vocês são a minha motivação para sempre perseverar;

. Aos meus avós, tios e primos, pela eterna amizade, paciência, respeito e carinho;

. Ao Gilberto e Maria José, bem como toda a família, que me acolheu como se fosse um dos seus.

. Aos grandes amigos Fabrício e Sérgio, por esses longos anos de amizade irrestrita;

. A todos os amigos que fiz em Jaboticabal, àqueles de Uberlândia e espalhados mundo afora, pela troca de experiências que enriquecem nossa existência.

Agradecimentos

À Profa. Rosangela Zacarias Machado, que foi uma grande mãe para mim desde o mestrado, me acolheu em seu laboratório e me deu todas as oportunidades para que eu pudesse realizar a pesquisa científica que sempre vislumbrei. Ao mesmo tempo em que me deu liberdade para que fizesse diferentes experimentos de forma independente, soube me guiar na direção correta aos menores sinais de desânimo e apreensão;

Às pessoas que integram e integraram o Laboratório de Imunoparasitologia desta instituição, por todo o suporte científico, amizade e momentos de diversão que passamos juntos. Agradeço imensamente aqueles que muitas vezes souberam ouvir minhas piadas, bem como minhas reclamações... as amizades são sempre baseadas em verdades!

Ao Prof. Aramis Augusto Pinto e seus orientados, com quem pude discutir protocolos utilizados em diferentes campos de pesquisa, sendo estes diálogos fundamentais para a produção de diferentes trabalhos científicos em conjunto;

Ao Departamento de Patologia Veterinária, por ter me acolhido desde 2002. Agradeço a todos os seus docentes e funcionários por esses anos de proveitosa convivência

Ao laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP, por meio do Prof. João Santana da Silva, Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos e seus orientados, os quais tornaram possíveis diversos experimentos realizados neste trabalho;

À Dr. Deise A. O. Silva, do Laboratório de Imunoparasitologia da UFU, pelo auxílio no desenvolvimento da técnica de Western blotting, além dos longos anos de amizade e orientação;

Ao Prof. Michael J. Day, da Bristol University – Reino Unido, que acreditou em nossas idéias e nos providenciou seus exclusivos monoclonais para a detecção das subclasses de IgG caninas;

Ao Hemocentro-RP e HC-USP/RP por ceder os aparelhos de citometria de fluxo em momentos de dificuldades;

A CAPES, por financiar meus cinco anos de pós-graduação na FCAV/UNESP, tornando este sonho uma realidade;

À FAPESP, que financiou o projeto 2004/05224-5, o qual originou esta tese de doutorado.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xvii
Abreviaturas	xviii
Resumo	xxii
Abstract	xxiii
1. Introdução	1
1.1. Parasito	1
1.2. Hospedeiros	2
1.3. Ciclo biológico	5
1.4. Resposta imune	7
2. Objetivo geral	11
2.1. Objetivos específicos	11
Capítulo I: Inoculação de cães com tecidos de bezerro e com ovos embrionados experimentalmente infectados com <i>N. caninum</i>	12
I.1. Material e métodos	13
I.1.1. Obtenção e manutenção de taquizoítas de <i>N. caninum</i>	13
I.1.2. Modelos experimentais utilizados como fonte de inóculo para os cães	13
I.1.2.1. <i>Bezerro</i>	13
I.1.2.2. <i>Ovos embrionados</i>	14
I.1.3. Inoculação de cães	14
I.1.3.1. Seleção dos cães a serem utilizados	14

I.1.3.2. Animais infectados	15
I.1.3.3. Animais controles	15
I.1.4. Avaliação histopatológica em tecidos do bezerro e ovos embrionados infectados com <i>N. caninum</i>	16
I.1.5. Imunoistoquímica para a detecção de <i>N. caninum</i> em tecidos do bezerro e ovos embrionados experimentalmente infectados	18
I.1.6. Ensaios sorológicos para detecção de anticorpos anti- <i>N. caninum</i>	18
I.1.6.1. Confeção de lâminas para RIFI	18
I.1.6.2. Detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães e bezerro	19
I.2. Resultados	20
I.2.1. Bezerro	20
I.2.2. Ovos embrionados	21
I.2.3. Cães	25
I.3. Discussão	33
Capítulo II: Cinética da resposta imune humoral em cães inoculados com tecidos infectados por <i>N. caninum</i>	26
II.1. Material e métodos	37
II.1.1. Animais utilizados	37
II.1.2. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG, IgG ₁ , IgG ₂ , IgA e IgE séricos totais nos cães experimentalmente infectados	37
II.1.2.1 Análise das DOs obtidas	38
II.1.3. ELISA para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães experimentalmente infectados	39
II.1.3.1 Análise das DOs obtidas	39

II.1.4. ELISA para a detecção de subclasses de anticorpos IgG (IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ , IgG ₄) específicos à <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães experimentalmente infectados	40
II.1.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos das classes IgA e IgE específicos à <i>N. caninum</i> nos cães experimentalmente infectados	41
II.1.6. Western blotting das amostras de soro dos cães experimentalmente infectados	42
II.2. Resultados	43
II.2.1. Anticorpos IgM específicos	43
II.2.2. Anticorpos IgA séricos totais e específicos	45
II.2.3. Anticorpos IgE séricos totais e específicos	48
II.2.4. Anticorpos IgG totais e específicos	51
II.2.5. Subclasses de IgG totais e específicas	55
II.2.6. Reconhecimento antigênico por anticorpos IgG específicos	65
II.3. Discussão	67
Capítulo III: Fenotipagem de linfócitos T de sangue periférico e células dos linfonodos poplíteos de cães inoculados com tecidos infectados por <i>N. caninum</i>	72
III.1. Material e métodos	73
III.1.1. Imunofenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do sangue periférico de linfonodos poplíteos por citometria de fluxo	73
III.1.1.1. Obtenção do antígeno solúvel de taquizoítas de <i>N. caninum</i>	73
III.1.1.2. Estimulação de células de linfonodos poplíteos <i>in vitro</i>	73
III.1.1.3. Determinação das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico e linfonodos poplíteos	74
III.1.1.4. Índices de normalidade calculados para a porcentagem, expressão e Índice de produção de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	75

III.1.2. Imunofenotipagem de células contidas em linfonodos poplíteos por imunistoquímica	75
III.2. Resultados	79
III.2.1. Imunofenotipagem de linfócitos T por citometria de fluxo	79
III.2.2. Imunofenotipagem por imunistoquímica	85
III.3. Discussão	89
Capítulo IV: Perfil da expressão de mRNA para a produção de citocinas durante a fase aguda da infecção experimental por <i>N. caninum</i> em cães jovens inoculados pela via oral	93
IV.1. Material e métodos	94
IV.1.1. Animais utilizados	94
IV.1.2. Detecção de anticorpos IgG anti- <i>N. caninum</i> no soro dos animais infectados	94
IV.1.3. Detecção da expressão de mRNA para citocinas em cães experimentalmente infectados, por meio de Real time RT-PCR	94
IV.1.3.1. Obtenção das amostras de PBMC e estimulação das células <i>in vitro</i>	94
IV.1.3.2. Extração de RNA total	95
IV.1.3.3. Real time RT-PCR	95
IV.1.3.4. Análise dos dados obtidos por meio do Real time RT-PCR	96
IV.2. Resultados	99
IV.3. Discussão	111
3. Discussão geral	114
4. Conclusões	120
5. Referências	122
6. Apêndice	144
6.1. Lista de reagentes e equipamentos utilizados	144

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Diagrama representativo do delineamento experimental utilizado para se analisar os diferentes parâmetros imunes durante a infecção experimental de cães por <i>N. caninum</i> pela via oral	17
Figura 2: Perfil da cinética de anticorpos IgM e IgG específicos anti- <i>Neospora caninum</i> em amostras de soro de bezerro experimentalmente infectado, pela Reação de Imunofluorescência Indireta	22
Figura 3: Fotomicrografia de tecidos musculares de bezerro experimentalmente infectado com <i>Neospora caninum</i> , após 200 dpi	23
Figura 4: Lesões macroscópicas e microscópicas na membrana corioalantóide de embrião de galinha inoculado com 10 ⁶ taquizoítas do isolado NC-1 de <i>N. caninum</i>	24
Figura 5: Oocisto semi-esporulado representativo encontrado nas fezes dos cães pertencentes ao G1 e G2, inoculados com tecidos de um bezerro experimentalmente infectado por taquizoítas de <i>N. caninum</i>	26
Figura 6: Cinética da detecção de anticorpos IgM específicos a <i>N. caninum</i> em soros dos cães dos grupos G1 e G2 por meio de RIFI	30
Figura 7: Cinética da detecção de anticorpos IgG específicos a <i>N. caninum</i> em soros dos cães dos grupos G1 e G2 por meio de RIFI	31
Figura 8: Lesões macroscópicas observadas nos cães experimentalmente inoculados com tecidos de bezerro infectados por <i>N. caninum</i> pela via oral	32
Figura 9: Cinética da detecção de anticorpos IgM específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães dos grupos G1 e G2 por meio de ELISA	44
Figura 10: Cinética da detecção de anticorpos IgA séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	46
Figura 11: Cinética da detecção de anticorpos IgA específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	47
Figura 12: Cinética da detecção de anticorpos IgE séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	49

Figura 13: Cinética da detecção de anticorpos IgE específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	50
Figura 14: Cinética da detecção de anticorpos IgG séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	53
Figura 15: Cinética da detecção de anticorpos IgG específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soro dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	54
Figura 16: Cinética da detecção de anticorpos IgG ₁ séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	57
Figura 17: Cinética da detecção de anticorpos IgG ₁ específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soro dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	58
Figura 18: Cinética da detecção de anticorpos IgG ₂ séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	59
Figura 19: Cinética da detecção de anticorpos IgG ₂ específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soro dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	60
Figura 20: Cinética da detecção de anticorpos IgG ₃ específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soro dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	62
Figura 21: Cinética da detecção de anticorpos IgG ₄ específicos a <i>N. caninum</i> e, amostras de soros dos cães dos grupos G1 e G2, por meio de ELISA	64
Figura 22: Demonstração da análise de amostras de PBMC no aparelho de citometria de fluxo	77
Figura 23: Porcentagem, expressão e Índice de produção de CD4 e CD8 em células advindas de linfonodos poplíteos dos cães do G1, G2 e controles frente à estimulação com meio de cultura, ConA e AgNc	80
Figura 24: Cinética da porcentagem, expressão e índice de produção de células T CD4 ⁺ em PBMC dos cães pertencentes ao G1 e G2	83
Figura 25: Cinética da porcentagem, expressão e índice de produção de células T CD8 ⁺ em PBMC dos cães pertencentes ao G1 e G2	84

Figura 26: Contagens de marcadores celulares e anticorpos associados à membrana, revelados por imunistoquímica em cortes de linfonodos poplíteos dos animais pertencentes ao G1, G2 e controles	86
Figura 27: Fotos de ensaios imunistoquímicos para MHC de classe II e iNOS em linfonodos poplíteos de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i>	87
Figura 28: Fotos de ensaios imunistoquímicos para IgG ₁ e IgA em linfonodos poplíteos de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i>	88
Figura 29: Demonstração de uma curva de amplificação das amostras obtidas a partir de PBMC de cães infectados por <i>N. caninum</i> , por meio de Real time RT-PCR, amplificadas para gene normalizador e oito citocinas diferentes	97
Figura 30: Cinética da detecção de anticorpos IgG específicos a <i>N. caninum</i> em amostras de soros dos cães do grupo G3 por meio de ELISA	100
Figura 31: Expressão de mRNA codificando IFN γ em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	103
Figura 32: Expressão de mRNA codificando IL-2 em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	104
Figura 33: Expressão de mRNA codificando IL-4 em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	105
Figura 34: Expressão de mRNA codificando IL-6 em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	106
Figura 35: Expressão de mRNA codificando IL-10 em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	107
Figura 36: Expressão de mRNA codificando IL-12 p40 em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	108

Figura 37: Expressão de mRNA codificando $TGF\beta_1$ em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	109
Figura 38: Expressão de mRNA codificando $TNF\alpha$ em PBMC de cães infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno, com estimulação por ConA ou AgNc	110
Figura 39: Proposta para os eventos desencadeados pela infecção oral por <i>N. caninum</i> em cães, com base nos dados obtidos com este trabalho	118

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Diluições ótimas de amostras de soro e dos conjugados para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos a <i>N. caninum</i> , por meio de RIFI em cães e bovinos experimentalmente infectados	20
Tabela 2: Avaliação da eliminação de oocistos pelos cães pertencentes aos grupos G1, G2, G3 após inoculação experimental oral com diferentes tecidos infectados por <i>N. caninum</i>	27
Tabela 3: Diluições dos soros e conjugados utilizados nos ensaios de dosagens de anticorpos séricos totais produzidos por cães experimentalmente infectados com <i>N. caninum</i>	38
Tabela 4: Valores normais médios obtidos para cães adultos e filhotes quanto à concentração de diferentes classes de anticorpos séricos totais	38
Tabela 5: Anticorpos monoclonais utilizados para a detecção de subclasses de IgG canina, por meio de ELISA, nos soros dos cães experimentalmente infectados por <i>N. caninum</i>	41
Tabela 6: Cinética do perfil de bandas de <i>N. caninum</i> reconhecidas por anticorpos IgG em soros de cães experimentalmente infectados com <i>Neospora caninum</i> por meio da técnica de Western blotting	66
Tabela 7: Faixas de normalidade para porcentagem, expressão e Índice de produção de CD4+ e CD8+ calculados a partir de amostras de PBMC de animais não infectados	78
Tabela 8: Oligonucleotídeos e sondas utilizadas para a detecção de amostras de mRNA codificando citocinas e gene normalizador advindas de cães experimentalmente infectados por <i>N. caninum</i>	98

ABREVIATURAS**A**

- . *ABC*: Complexo avidina-biotina
- . *AgNc*: Antígeno solúvel de taquizoítas de *N. caninum*

B

- . *BSA*: Soro-albumina bovina

C

- . *CA*: Cavidade alantóide (Líquido, membrana)
- . *CD*: Grupos de diferenciação presentes na superfície celular
- . *cDNA*: Ácido desoxirribonucléico complementar
- . *CO₂*: Gás carbônico
- . *ConA*: Concanavalina A
- . *CV-1*: Fibroblastos renais de macaco verde africano

D

- . *DAB*: Diaminobenzidina
- . *DNase*: Enzimas degradantes de ácido desoxirribonucléico
- . *DO*: Densidade óptica
- . *Dpi*: Dias pós-infecção

E

- . *EDTA*: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- . *ELISA*: Ensaio imunoenzimático

F

- . *FA*: Fosfatase alcalina
- . *FACS*: Separador de células ativado por fluorescência
- . *FITC*: Isotiocianato de fluoresceína

. *FIV*: Vírus da imunodeficiência felina

G

. *GALT*: Tecido linfóide associado à mucosa intestinal

. *G3PDH*: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

H

. *HE*: Hematoxilina e Eosina

. *HIV*: Vírus da imunodeficiência humana

. *HRPO*: Peroxidase extraída de rabanete

I

. *IE*: Índice ELISA

. *IFN γ* : Interferon gama

. *Ig*: Imunoglobulina

. *IHQ*: Imunoistoquímica

. *IL*: Interleucina

. *Índice A/P*: Razão entre a amostra-teste e o controle positivo da reação

. *iNOS*: Sintase de óxido nítrico induzível

J

. *J774A*: Linhagem de macrófagos murinos

K

. *kDa*: Kilo Dalton

L

M

. *MALT*: Tecidos linfóides associados à mucosa

. *MHC*: Complexo principal de histocompatibilidade

. *mRNA*: Ácido ribonucléico mensageiro

N

. *NaOH*: Hidróxido de sódio

. *NC-1*: Primeiro isolado de *N. caninum*, obtido a partir de tecidos caninos

. *NcSAG1*: Antígeno taquizoíta-específico de *N. caninum*

. *NcSAG4*: Antígeno bradizoíta-específico de *N. caninum*

. *NcSRS2*: Seqüência 2 relacionada aos antígenos de superfície 1 de *N. caninum*

. *NK*: Células 'natural killer'

O

P

. *PA*: Analiticamente puro

. *PBMC*: Células mononucleares de sangue periférico

. *PBS*: Salina tamponada com fosfato

. *PBS-T*: Salina tamponada com fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20

. *PCR*: Reação em cadeia da polimerase

. *PE*: Ficoeritrina

. *pNPP*: p-Nitrofenil Fosfato

Q

R

. *RIFI*: Reação de imunofluorescência indireta

. *RNA*: Ácido ribonucléico

. *RNAse*: Enzimas degradantes de ácido ribonucléico

. *RPMI 1640*: Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)

. *RT-PCR*: Reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa

S

- . *SFB*: Soro fetal bovino
- . *sIgA*: Imunoglobulina A secretória
- . *SNC*: Sistema nervoso central

I

- . *TBS*: Salina tamponada com Tris
- . *TBS-T*: Salina tamponada com Tris adicionado de 0,05% de Tween 20
- . *TC*: Ciclo inicial de amplificação (“Threshold cycle”)
- . *Th1, Th2 e Th17*: Resposta de linfócitos T auxiliares tipo 1, 2 e induzidos por IL-17
- . *TLR*: Receptores do tipo *Toll*
- . *TMB*: Tetrametilbenzidina
- . *TNF α* : Fator de necrose tumoral alfa
- . *TGF β ₁*: Fator de transformação de crescimento beta 1

U

V

- . *V:V*: Na proporção de uma parte da amostra para cada parte do diluente

W

- . *WB*: Western blotting

X

- . *x g*: Força centrífuga relativa

Z

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário do Filo Apicomplexa, que foi primeiramente descrito como causa de encefalomielite em filhotes caninos sorologicamente negativos para *Toxoplasma gondii*. Estudos anteriores neste importante hospedeiro da cadeia epidemiológica de *N. caninum* demonstram que as respostas de anticorpos IgG são tardiamente detectadas e que a infecção clínica é de difícil indução. Desta forma, este trabalho objetivou o estudo da imunidade de cães frente à infecção oral por *N. caninum*. Os resultados obtidos a partir de análises de diversos animais experimentalmente infectados indicam que os cães apresentam uma prolongada fase aguda da infecção, com eliminação de oocistos associado à queda nos níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ e diminuição de MHC de classe II por células apresentadoras de antígeno. Adicionalmente, os animais apresentam soroconversão instável durante o mesmo período, sendo que somente IgG₁ e IgG₃ foram detectados em adultos e filhotes, respectivamente, entre o 2^o e 3^o mês de infecção. De forma concomitante, observa-se uma predominância da expressão de citocinas imunomoduladoras como TGFβ₁, IL-4 e IL-10. Após dois meses de infecção, o perfil da resposta se inverte, sendo observado picos de produção dos marcadores CD4 e CD8 de linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias como IFNγ, IL-6 e IL-12, além do aumento nos títulos de anticorpos, principalmente IgG₁ e IgG₄ nos cães jovens. Com base nestes resultados, conclui-se que os cães apresentam uma relação de equilíbrio com *N. caninum*, a qual induz nesta espécie uma modulação da resposta imunológica durante a fase de merogonia.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, cães, resposta mediada por células, resposta imune humoral, expressão de citocinas.

ABSTRACT

Neospora caninum is an Apicomplexan parasite firstly described as the cause of encephalomyelitis in puppies serologically negative to *Toxoplasma gondii*. Previous reports on the parasite's definitive host indicate a late IgG antibody response and that clinical disease is difficult to be induced. The aim of this study was to investigate canine immunity during *N. caninum* oral infection. The results obtained from the analysis of infected animal's samples indicate that dogs present a protracted acute phase, with oocyst shedding correlated to a drop in CD4⁺ and CD8⁺ T cell levels, and low MHC class II expression by antigen presenting cells. Additionally, the dogs presented an unstable seroconversion pattern in the same period, with only IgG₁ and IgG₃ being detected in adult dogs and puppies, respectively, between the second and third months of infection. Concomitantly, dominant Th2 cytokine expression was observed, with peak expression levels of TGFβ₁, IL-4 and IL-10. After 2 months of infection, the immunity profile shifts towards a Th1 response, with high levels of CD4 and CD8 lymphocytary marker production and pro-inflammatory cytokine expression (IFNγ, IL-6 and IL-12), besides of the raise in antibody levels, especially IgG₁ and IgG₄ in puppies. Based in the results presented herein, we may conclude that dogs present a balanced host-parasite relationship, modulating the host immune response during *N. caninum* merogony.

Keywords: *Neospora caninum*, dogs, cell mediated immune responses, humoral immune response, cytokine expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Parasito

Neospora caninum é um protozoário do Filo Apicomplexa, Família *Sarcocystiidae*, subfamília *Toxoplasmatinae*, composta por parasitos pertencentes aos gêneros *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Isospora*, *Sarcocystis*, *Frenkelia* e *Hammondia* (DUBEY et al., 1988a).

Evidências da infecção por *Neospora* foram primeiramente descritas na Noruega, em uma infecção por um coccídeo formador de cistos como causa de encefalomielite em sete filhotes sorologicamente negativos para *Toxoplasma gondii*, originados de três gestações distintas de uma cadela da raça Labrador (BJERKÅS et al., 1984). Quando analisado por microscopia eletrônica, notaram-se diferenças ultra-estruturais significativas entre o protozoário desconhecido e *T. gondii* (BJERKÅS; PRESTHUS, 1988). Parasito com descrição semelhante também foi encontrado em tecidos fixados de 10 cães que vieram a óbito com diagnóstico de toxoplasmose atendidos em um hospital veterinário norte-americano, o que originou a descrição de uma nova espécie, *N. caninum*, criada pois que o parasito não se adequava aos gêneros já existentes (DUBEY et al., 1988a).

Três características principais foram utilizadas para separar *N. caninum* de *T. gondii* e outros coccídeos relacionados: a.) sinais clínicos díspares, sendo que a neosporose canina induzia principalmente paralisia dos membros posteriores, sintoma este não presente na toxoplasmose clínica canina; b.) os cistos teciduais de ambas as espécies apresentavam diferenças em relação à parede externa: enquanto os cistos de *N. caninum* apresentam paredes significativamente mais espessas, com até 4 μm , geralmente restrita a tecidos neurais, os de *T. gondii* podem ser encontrados em diversos órgãos, e possuem uma parede delgada (mais fina que 0,5 μm); e c.) os cães nos quais os parasitos haviam sido encontrados em seus tecidos eram sorologicamente negativos para *T. gondii*, bem como seus tecidos se mostraram negativos em ensaios imunistoquímicos utilizando anticorpos anti-*T. gondii* específicos (DUBEY et al., 1988a).

Logo após sua descrição, *N. caninum* foi isolado em cultura de células a partir de tecidos de cães infectados de forma congênita, os quais sofriam de síndrome similar àquela descrita por BJERKÅS e colaboradores (1984). Simultaneamente ao isolamento em cultivo celular, tecidos neurais destes cães foram inoculados em camundongos alogênicos imunocompetentes da linhagem Swiss-Webster, e estes apresentaram cistos teciduais com paredes espessas no sistema nervoso central, semelhantes aos encontrados nos tecidos incluídos em parafina (DUBEY et al., 1988b). A partir do isolamento, ensaios sorológicos e imunoistoquímicos foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico diferencial das infecções por *N. caninum* e *T. gondii* (DUBEY et al., 1988b; LINDSAY; DUBEY, 1989).

1.2. Hospedeiros

Com a possibilidade de se realizar ensaios sorológicos, outras espécies animais se tornaram alvos de inquéritos soroepidemiológicos. Além dos cães, anticorpos específicos contra *N. caninum* foram identificados em gatos, bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, eqüinos, camelídeos, raposas, lobos, cachorros do mato, guaxinins, gambás, capivaras, cervídeos, e mamíferos marinhos (DUBEY et al., 1999; GENNARI, 2004; VITALIANO et al., 2004). Adicionalmente, cães, bovinos, ovinos, gatos, camundongos, ratos, gerbis, coelhos e aves carnívoras foram experimentalmente infectados (BAKER et al., 1995; DUBEY; LINDSAY, 1996; McALLISTER et al., 1998). A infecção experimental em cães possibilitou a McAllister e colaboradores (1998) descreverem o cão como hospedeiro definitivo do parasito, por liberarem oocistos em suas fezes após ingestão de tecidos murinos infectados. Recentemente, foi relatado que coiotes (*Canis latrans*) também realizam a reprodução sexuada de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004), sugerindo, portanto, que outros canídeos possam também se comportar como hospedeiros definitivos.

Devido ao fato de macacos rhesus (*Macaca mulata*) terem sido infectados experimentalmente com sucesso (BARR et al., 1994), criou-se uma expectativa em relação ao potencial zoonótico do recém descrito protozoário. Primeiramente, anticorpos contra *N. caninum* foram demonstrados, pela técnica de WB, em indivíduos com ou sem reatividade sorológica para *T. gondii* (NAM et al., 1998). Posteriormente,

outros grupos de pesquisa investigaram soropositividade a *N. caninum* em diversas subpopulações humanas, como agricultores e mulheres com problemas reprodutivos, porém sem sucesso (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999). Entretanto, TRANAS e colaboradores (1999) descreveram que aproximadamente 7%, de mais de mil amostras de doadores de sangue do estado da Califórnia (EUA), eram sororeagentes positivos ao teste de imunofluorescência indireta para *N. caninum*. Em outro estudo, verificou-se uma baixa positividade sorológica ao parasito em 500 amostras advindas de trabalhadores rurais e mulheres com abortos recorrentes (HEMPHILL;GOTTSTEIN, 2000). Em um relato mais recente, observou-se que pacientes imunocomprometidos devido à infecção por HIV, ou apresentando desordens neurológicas, apresentam taxas de positividade sorológica para *N. caninum* até oito vezes maiores que indivíduos normais (LOBATO et al., 2006). Estes relatos sugerem que a população humana possa entrar em contato com o parasito, apesar de não ser possível até o momento inferir que possa haver problemas clínicos decorrentes, indicando apenas que os indivíduos imunocomprometidos possam ser mais susceptíveis à infecção por *N. caninum*.

Da ampla gama de espécies com as quais o parasito entra em contato, os animais que apresentam sinais clínicos mais importantes decorrentes da infecção por *N. caninum* são os cães e os bovinos. Nos cães, a neosporose está geralmente associada à encefalomielite ou infecções congênitas, porém o parasito pode acometer todos os órgãos dos animais, podendo levá-los a desordens respiratórias, cardíacas, digestórias e dermatológicas (ORDEIX et al., 2002; DUBEY, 2003; BASSO et al., 2005). As taxas de soropositividade encontradas mundialmente em cães são muito variáveis, uma vez que há uma variação entre 0 e 97% nas diferentes populações caninas estudadas (BARBER et al., 1997; ANTONY;WILLIAMSON, 2003). Cães presentes nas áreas rurais e regiões periurbanas tendem a apresentar maiores taxas de positividade quando comparados aos estritamente urbanos, possivelmente por estarem mais expostos a fatores de risco para a infecção (PATITUCCI et al., 2001; SANCHÉZ et al., 2003).

No Brasil, alguns grupos de pesquisa têm trabalhado com o intuito de se investigar a presença do parasito no país. Verificou-se que o agente está disseminado

por todo o país, sendo que já foram encontrados anticorpos em bovinos, cães, canídeos silvestres, gatos, búfalos, ovinos, caprinos, eqüinos, cervídeos, gambás e capivaras, conforme previamente revisado (GENNARI, 2004). Dentre as espécies mais estudadas, os bovinos apresentam positividade sorológica variando entre 6,8 e 67,8% dos animais nos diferentes estudos realizados (BELO et al., 1999a; COSTA et al., 2001). Dentre as diferentes populações caninas brasileiras analisadas, observou-se grande diferença entre a reatividade sorológica de cães urbanos e rurais, sendo que os animais amostrados em cidades apresentam positividade variando de 6,7 a 35,6% (BELO et al., 1999b; MINEO et al., 2001), enquanto que cães advindos de zonas rurais podem apresentar quase 60% de animais positivos (HASEGAWA, 2000). Dentre as populações urbanas, observou-se que não há diferença significativa na taxa de soropositividade de cães atendidos em diferentes clínicas e hospitais veterinários, bem como em animais errantes, fato este oposto à positividade sorológica para *T. gondii*, onde os animais errantes apresentam taxa de positividade bem superior aos demais grupos analisados (MINEO et al., 2004).

Os bovinos têm sido intensamente estudados, já que a bovinocultura representa um importante valor econômico na pecuária mundial (TREES et al., 1999). Desde a década de 1980, pesquisadores americanos estão atentos a uma série de abortamentos ocorrendo em bovinos, cujas lesões fetais são semelhantes às aquelas causadas por protozoários. Em diferentes estudos, fetos bovinos foram observados com encefalites multifocais, com a presença de parasitos no cérebro, quadro este semelhante ao aborto ovino provocado por *T. gondii*. Hoje, sabe-se que *N. caninum* apresenta distribuição mundial, atuando como um importante agente causador de abortamentos em rebanhos bovinos em todo o mundo (DUBEY, 1999). Os índices de positividade são variáveis, podendo alternar entre 2 e 50% (WOUDA et al., 1999; BJÖRKMAN et al., 2000). A neosporose é apontada como causa de aproximadamente 40.000 abortamentos de bovinos por ano no estado da Califórnia, EUA, gerando uma perda econômica para os produtores de cerca de US\$ 35 milhões/ano (ANDERSON et al., 1991; ANDERSON et al., 1995). Em relato semelhante, estimou-se o prejuízo de US\$ 85 milhões/ano na indústria leiteira na Austrália (ELLIS, 1997).

1.3. Ciclo biológico

N. caninum possui um ciclo de vida heteroxeno, realizando replicação sexuada e assexuada em hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente. A replicação assexuada pode ocorrer em todos os animais homeotermos, enquanto a reprodução sexuada ocorre somente nos canídeos (GONDIM et al., 2004), que também podem se comportar como hospedeiros intermediários do parasito.

N. caninum apresenta três formas principais: a.) taquizoítas, presentes na infecção ativa, são estágios intracelulares obrigatórios presentes em células mononucleares, com maior afinidade por células com potencial macrófago, de replicação rápida, responsáveis pela disseminação pelo organismo do animal afetado; b.) bradizoítas, que são formas de latência do parasito, replicando-se lentamente e secretando proteínas que impermeabilizam as membranas dos vacúolos parasitóforos formando cistos teciduais, estruturas estas que são capazes de impedir a ativação do sistema imunológico do hospedeiro nestes microambientes, porém atuando como fonte de infecção para predadores, no caso de carnivorismo; c.) esporozoítas, contidos em oocistos, em número de oito, resultam da replicação sexuada do agente no trato gastrointestinal dos canídeos, os quais são responsáveis pela contaminação ambiental e subsequente dispersão do agente. É possível que outras formas participem do ciclo sexuada do parasito, porém não existem estudos até o momento relatando a alternância de estágios na replicação sexuada, bem como o local onde esta possa ocorrer nos canídeos.

Na transmissão horizontal (heteroxena cíclica) de *N. caninum*, cistos presentes nos tecidos de presas ou oocistos contidos na água e alimentos são ingeridos e sofrem digestão química e enzimática após passagem pelo estômago e duodeno, respectivamente, liberando as formas infectantes para a luz do intestino (DUBEY et al., 1999). Os bradizoítas e esporozoítas, agora convertidos em taquizoítas, invadem as células epiteliais intestinais e se multiplicam rapidamente por endodiogenia, levando à formação de vacúolos que, quando repletos de parasitos, rompem a célula hospedeira liberando mais taquizoítas, que invadem novas células. Os parasitos mantêm este ritmo de replicação, migrando para o GALT. A partir desse momento, os taquizoítas são disseminados por todo o organismo do animal, por meio da circulação linfática e

sanguínea, e via ascendente por tecidos nervosos periféricos, atingindo diretamente o sistema nervoso central (SAWADA et al., 1997; SHIBAHARA et al., 1999).

Durante a fase aguda da infecção, *N. caninum* mantém seu rápido ritmo de replicação nos diferentes tecidos, causando uma resposta inflamatória devido à destruição dos tecidos parasitados, principalmente no pulmão (COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006). Quando o hospedeiro é capaz de ativar uma resposta imune celular eficiente contra *N. caninum*, este parasito passa a alternar a expressão de genes específicos como NcSAG1 e NcSAG4, que desencadeiam uma cascata de eventos. Dentre estes, a interconversão de estágios (HOWE et al., 1998; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al. 2006), e a migração preferencial para o sistema nervoso central, onde há a formação de cistos teciduais, tornando o hospedeiro intermediário em reservatório da infecção para predadores, como os canídeos, hospedeiros definitivos. Neste contexto, a maioria dos hospedeiros infectados não apresenta mortalidade frente à infecção, apesar destes animais apresentarem as formas latentes do parasito, que persistem por toda a vida do hospedeiro (SHIBAHARA et al., 1999; COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006). Em condições experimentais, cães excretam oocistos após ingestão de camundongos, ratos, cobaias, ovinos e caprinos experimentalmente infectados, além de placentas bovinas naturalmente infectadas (McALLISTER et al., 1998; DIJKSTRA et al., 2001). A presença de fezes caninas nos cochos de alimentação e bebedouros aumenta significativamente a probabilidade de infecção do rebanho bovino a *N. caninum* (DIJKSTRA et al., 2002).

Apesar de o parasito apresentar adaptação evolutiva para a transmissão pela via oral, a via de infecção transplacentária apresenta-se como uma alternativa para a manutenção do parasito nas populações animais já infectadas (TREES; WILLIAMS, 2005). Esta modalidade de infecção já foi demonstrada em cães, gatos, camundongos, ovinos, caprinos, macacos e suínos, e demonstra alto grau de importância em bovinos, espécie na qual pode ser transmitido por consecutivas gerações, sendo desnecessária a presença do hospedeiro definitivo para disseminar a doença (DUBEY, 1999). Vários autores tentaram estimar o sucesso da transmissão vertical pelo parasito, encontrando valores que variaram de 81 a 95% (PARÉ et al., 1996; DAVISON et al., 1999). Há duas modalidades de infecção vertical: a.) a fêmea prenhe pode entrar em contato com o

parasito pela via oral e, com a disseminação do agente na fase aguda da infecção, há a passagem de taquizoítas pela interface materno-fetal, deixando o feto exposto ao desafio por *N. caninum*; b.) reativação de uma infecção latente, que ocorre devido à variação hormonal e conseqüente mudança de padrão de resposta imunológica materna, que tende a mudar o perfil de expressão de citocinas do padrão Th1 para o padrão Th2, que é uma alternância importante para a aceitação do conceito pelo organismo materno (INNES et al., 2001; QUINN et al., 2002). Adicionalmente, a replicação intensa do parasito em células binucleadas trofoblásticas bovinas *in vitro* sugere a participação destas na transmissão intra-uterina do protozoário; estas células de linhagem macrofágica também são responsáveis pela produção de hormônios como a progesterona, um potente indutor de resposta Th2 (MACHADO et al., no prelo).

1.4. Resposta imune

Não foram encontradas na literatura informações sobre o perfil de resposta imune inata estimulado por *N. caninum*, com o intuito de esclarecer estes fenômenos. Porém, pode-se extrapolar eventos que ocorrem durante a infecção por outros protozoários, como *T. gondii*, para se ter uma noção dos mecanismos inatos envolvidos no reconhecimento e estímulo inicial do sistema imune dos hospedeiros infectados.

As respostas imunes, independentemente do perfil apresentado, são iniciadas por células sentinelas, que dentre suas várias atribuições, desempenham a função primordial de apresentação antigênica. Estas células apresentadoras de antígenos, do mesmo modo que as células dendríticas, encontram-se normalmente em tecidos não-linfóides. Quando estimuladas por antígenos, como os bacterianos, produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-12, que são importantes na diferenciação de linfócitos T em células com perfil Th1 (KAISHO; AKIRA, 2001). Tais estímulos induzem uma regulação positiva de moléculas co-estimulatórias nas células dendríticas como CD40, CD80 e CD86, fazendo com que estas células entrem em maturação, fator essencial para a ativação de células T virgens (REIS e SOUZA et al., 1999). Adicionalmente, em resposta ao estímulo antigênico, as células dendríticas migram para regiões de células T em tecidos linfóides secundários (DE SMEDT et al., 1996). Estas habilidades das células dendríticas em reconhecer antígenos microbianos diversos e participar de

respostas pró-inflamatórias sincronizadas são desempenhadas primordialmente por meio de receptores de quimiocinas e TLRs.

Estudos indicam que a resistência aos protozoários intracelulares, como *N. caninum*, é dependente de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T CD4+ tipo 1 (Th1), com a imunidade mediada por células exercendo papel fundamental no controle da infecção (HEMPHILL, 1999; HUNTER; REINER, 2000), principalmente em função da ação sinérgica entre linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos e células NK. Durante a infecção aguda, IL-12 é produzida por células fagocitárias infectadas, diferenciando linfócitos T CD4+ e CD8+ em subpopulações produtoras de citocinas pró-inflamatórias e estimulando células NK a produzirem IFN γ , ativando macrófagos e eliminando células infectadas pelo parasito, através de mecanismos mediados por óxido nítrico (STASKA et al., 2003; BOYSEN et al., 2006; WILLIAMS; TREES, 2006).

A importância das células T na resistência à infecção por *N. caninum* foi demonstrada quando camundongos atímicos apresentaram 100% de mortalidade antes de completar 30 dias de infecção. A maior susceptibilidade destes animais sugere que as células T têm papel chave suprimindo a propagação de taquizoítas. Estes animais apresentaram uma elevada produção de IFN γ e IL-6 quando comparados a BALB/c selvagens, indicando prováveis mecanismos compensatórios para o controle da replicação de taquizoítas, na ausência de função efetora de células T (SHIBAHARA et al., 1999). PBMC de bovinos experimentalmente infectados com *N. caninum* proliferam em resposta a antígenos do parasito e produzem IFN γ (LUNDÉN et al., 1998), o qual inibe a multiplicação do parasito *in vitro* (INNES et al., 1995). Em camundongos, demonstrou-se a importância de IFN γ e IL-12 no controle da infecção. De fato, animais *knock-out* para ambos os genes, ou tratados com anticorpos que neutralizam a ação destas citocinas, tornam-se vulneráveis à infecção (KHAN et al., 1997; BASZLER et al., 1999; DUBEY, 1999), animais deficientes para estas citocinas chaves têm as taxas de mortalidades relacionadas às elevadas cargas parasitárias detectadas em todos os órgãos (SHIBAHARA et al., 1999). YAMANE e colaboradores (2000) observaram que a adição de IFN γ e TNF α em culturas primárias de células cerebrais bovinas inibiram a multiplicação de taquizoítas de *N. caninum*. Diversos grupos de pesquisa relataram

proliferação de células antígeno-específico e produção de IFN γ em bovinos infectados natural ou experimentalmente (LUNDÉN et al., 1998; MARKS et al., 1998; DEMAREZ et al., 1999; WILLIAMS et al., 2000; ANDRIANARIVO et al., 2001; TREES et al., 2002). Em contrapartida, a adição de IL-4 em culturas de macrófagos J774A.1 infectados com *N. caninum* e tratados com IFN γ aumentou a viabilidade dos taquizoítas, levando a crer que o balanço IFN γ /IL-4 é crucial para o controle da infecção (NISHIKAWA et al., 2003).

Este fato é relevante em fêmeas prenhes, pois respostas imunes predominantemente Th1 são incompatíveis com o sucesso de uma gestação (RAGHUPATHY, 1997). Para que o feto e seus anexos possam ser reconhecidos como 'próprios' durante o período gestacional, há uma imunomodulação da resposta levando à expressão de citocinas para um padrão Th2 nos linfócitos T CD4+, sendo este perfil induzido principalmente pelos altos níveis de progesterona mantidos durante a gestação (INNES et al., 2002). Estes eventos levam ao desenvolvimento de sinais paradoxais ao sistema imune das fêmeas, que é induzido a optar entre o comprometimento da gestação pela resposta imune ao parasito ou ao empenho na manutenção da gestação, que leva à conseqüente reativação do agente (QUINN et al., 2002). Ambas as opções podem levar a uma provável perda fetal. Esta imunomodulação é mediada por IL-10, que possui efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN γ , diferenciação de clones Th1, produção de IFN γ por células NK e linfócitos T CD4+ e CD8+, além da produção de IL-12 por células acessórias, sendo altamente expressa em astrócitos advindos de cultivo primário infectados por *N. caninum* (INNES et al., 2002; PINHEIRO et al., 2006).

A participação efetiva das diferentes classes de imunoglobulinas na resistência à infecção por *N. caninum* é incerta. Especula-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção, participando da neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente (INNES et al., 2002). Porém, a ausência de linfócitos B em camundongos geneticamente deficientes leva a uma falha no controle da infecção, indicando que os anticorpos possam ter papel relevante no controle da infecção (EPERON et al., 1999; AMMANN et al., 2004). Adicionalmente, foi observado que a infecção por *N. caninum* em camundongos induz uma expansão clonal de linfócitos B periféricos, contudo gerando

uma depleção de células precursoras na medula óssea (TEIXEIRA et al., 2005).

Aparentemente, a soroconversão é parcial, uma vez que os títulos de anticorpos apresentados por animais infectados são geralmente baixos, principalmente em cães. A maior parte destes não desenvolve resposta humoral frente ao desafio, sendo que os animais que chegam a produzir anticorpos, o fazem de forma retardada, apresentando anticorpos IgG específicos somente após 4 semanas, prazo este que pode se estender por quase 500 dias (SCHARES et al., 2001; GONDIM et al., 2003). As demais espécies já estudadas não apresentam tal cinética tardia de resposta mediada por anticorpos da classe IgG, porém geralmente mantém baixos níveis séricos por curtos períodos de tempo (McGUIRE et al., 1999; MINEO et al., 2005; COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006). Os bovinos, exceção a este fenômeno, geralmente apresentam uma rápida soroconversão, com altos títulos, e tendem a manutenção de positividade durante um longo período (DIJKSTRA et al., 2003).

Considerando os trabalhos acima explicitados, podemos afirmar que existem diversos mecanismos pelos quais os hospedeiros e parasitos interagem, sendo que esta interação tende a uma maior complexidade devido à co-evolução entre as espécies. A imunidade do hospedeiro frente à infecção por *N. caninum*, bem como contra outros protozoários relacionados, é fortemente dependente de uma resposta inflamatória, que envolve principalmente a participação da imunidade adaptativa celular do hospedeiro.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a relação parasito-hospedeiro na infecção por *N. caninum* em cães, por meio da avaliação da imunidade celular, humoral e expressão de citocinas em animais inoculados experimentalmente *per os*.

2.1. Objetivos específicos

- Observar a cinética da porcentagem e expressão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ sanguíneos durante a infecção experimental por *N. caninum* em cães pela via oral
- Analisar as quantidades dos marcadores CD3, CD79, MHC de classe II, CD163, iNOS, TGFβ₁, IgG₁, IgG₂, IgM, IgA e IgE em linfonodos poplíteos de cães durante a fase aguda da infecção experimental por *N. caninum*.
- Avaliar a imunidade humoral de cães por meio da cinética de produção de anticorpos IgM, IgG e subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), IgA e IgE durante a infecção experimental oral por *N. caninum*;
- Analisar o perfil da expressão das citocinas IFNγ, TNFα, TGFβ₁, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 p40 em cães experimentalmente inoculados pela via oral, durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*.

CAPÍTULO I

Inoculação de cães com tecidos de bezerro e com ovos embrionados experimentalmente infectados com N. caninum

I.1. MATERIAL E MÉTODOS

I.1.1. Obtenção e manutenção de taquizoítas de *N. caninum*

Taquizoítas do isolado NC-1 de *N. caninum* foram cultivados em sistema de cultivo celular, utilizando células CV-1 como hospedeiras (gentilmente cedidos pela Profa. Solange Maria Gennari, VPS-FMVZ, USP, São Paulo, SP). As células hospedeiras foram cultivadas a 37°C com injeção constante de 5% de CO₂, em 5 ml de meio RPMI 1640 com 10% de SFB até atingirem a confluência, quando foram infectados com suspensões parasitárias contendo de 5 x 10⁵ a 1 x 10⁶ taquizoítas. Após três a cinco dias da infecção das células, utilizando RPMI 1640 sem a adição de SFB, a quantidade de taquizoítas gerados foi entre 5 x 10⁷ e 1 x 10⁸ por frasco de 25 cm². O sobrenadante foi colhido, passado em seringa com agulha para a liberação dos parasitos intracelulares, recolhidos em tubos cônicos, que foram centrifugados a 400 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de PBS. A suspensão de taquizoítas resultante do cultivo foi utilizada para infecção de novos frascos de cultivo, infecção do bezerro, preparo de antígeno formolizado para a confecção de lâminas de Imunofluorescência Indireta, antígeno solúvel para a sensibilização de placas de ELISA, protocolos de WB e estimulação de linfócitos de cães *in vitro*.

I.1.2. Modelos experimentais utilizados como fonte de inóculo para os cães

I.1.2.1. Bezerro

Foi utilizado neste experimento um bezerro da raça Holandesa Preta e Branca (Holstein-Friesian, *Bos taurus taurus*), mantido em regime fechado em baias do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, sorologicamente negativo para *N. caninum*, *T. gondii*, *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*. O animal foi infectado pela via endovenosa com 5x10⁸ taquizoítas de *N. caninum*, diluídos em meio RPMI 1640 contendo 1% de estreptomicina/anfotericina B. Este animal foi mantido infectado por um período de 200 dias, recebendo um novo inóculo aos 160 dpi, com uma dose de 5x10⁶ taquizoítas, pela via subcutânea. Amostras de soro foram colhidas do animal a cada 15 dias para se verificar os títulos de anticorpos IgG específicos para *N. caninum*. Avaliações clínicas e hematológicas foram realizadas durante todo o

período experimental, após o qual o animal foi abatido por meio de eletrochoque, tendo seu SNC e fragmentos de musculatura esquelética colhidos e mantidos em gelo e em formol tamponado a 10%, de forma pareada. Os tecidos colhidos foram repartidos de forma igual, em 12 porções de 500g, para a administração oral a cães pré-selecionados, conforme descrito por GONDIM e colaboradores (2002).

I.1.2.2. *Ovos embrionados*

Ovos embrionados de galinha foram submetidos à infecção com taquizoítas de *N. caninum* derivados de cultivo celular, conforme protocolo descrito anteriormente (FURUTA et al., submetido para publicação). Brevemente, ovos embrionados foram mantidos em incubadora com temperatura (37°C) e umidade (60%) controladas, tendo sua viabilidade monitorada por meio de ovoscopia. Os embriões foram infectados no décimo dia de incubação, via cavidade alantóide, por meio de inoculação direta de 0,1 ml de solução contendo 1×10^6 taquizoítas de *N. caninum*, diluídos em PBS estéril contendo 1% de solução de estreptomicina/anfotericina B. Os ovos foram observados diariamente durante 8 dias de incubação pós-infecção. Os embriões mortos previamente ao período de incubação estabelecido foram descartados. Dos ovos viáveis foram retirados os embriões, bem como seus anexos os quais foram mantidos em gelo até serem administrados por via oral aos cães sob experimentação. Cada cão recebeu cinco embriões e anexos por dia, durante três dias consecutivos.

I.1.3. **Inoculação de cães**

I.1.3.1. *Seleção dos cães a serem utilizados*

Todos os cães foram previamente selecionados, por meio de triagem clínica e sorológica, constatando-se serem todos os animais saudáveis e sorologicamente negativos para *N. caninum*, *T. gondii*, *B. canis*, *Leishmania chagasi* e *Ehrlichia canis*. Foram realizados também exames coprológicos para se descartar a presença de outros patógenos intestinais. Os animais selecionados foram vermifugados e vacinados contra os principais agentes infecciosos virais e bacterianos. Os cães foram mantidos desde seu nascimento no canil experimental do Departamento de Patologia Veterinária desta instituição, eliminando assim o risco de infestação por ectoparasitos e outros agentes que pudessem causar alterações nos parâmetros analisados.

Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram procedidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais de laboratório, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com o artigo 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia (AVMA, 2001).

I.1.3.2. *Animais infectados*

Um total de oito cães, sem raça definida, distribuídos em três grupos experimentais distintos, foram experimentalmente inoculados com *N. caninum* pela via oral durante a realização deste trabalho. Primeiramente, quatro cães, divididos em dois grupos (G1: 2 cães, irmãos, machos, de 1 ano de idade – 1A e 1B; G2: 2 cães, irmãos, machos, de 60 dias de idade – 2A e 2B) ingeriram infectados tecidos de bezerro. Estes animais foram destinados para experimentos de fenotipagem da resposta imune celular e cinética da produção de anticorpos durante 250 dias, com datas de coleta de soro sanguíneo realizadas nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 14, 20, 25, 30, 35, 42, 50, 58, 64, 75, 85, 92, 100, 110, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 225, 235 e 250 dpi. Ao final do experimento, os cães foram eutanasiados com injeção letal de T-61, para a observação de alterações *post mortem*. Apesar de o planejamento inicial contar com apenas os dois grupos acima descritos, as amostras de PBMC cultivadas e armazenadas com o intuito de se analisar a expressão de citocinas pelos cães do G1 e G2 sofreram com uma forte degradação do mRNA. Para que estas informações fossem obtidas, utilizou-se um grupo adicional de cães (G3: 4 cães, irmãos, machos, de 2 meses de idade – 3A, 3B, 3C e 3D), inoculados por meio da ingestão de ovos embrionados experimentalmente infectados, com o objetivo de se observar a expressão de citocinas durante a fase aguda da infecção (Período de observação de 90 dias). As fezes de todos os cães infectados foram colhidas entre dois dias pré-infecção até 40 dpi para a identificação de oocistos de *N. caninum* liberados, por meio de técnica de flutuação por sacarose (GONDIM et al., 2002). O delineamento experimental está apresentado de forma resumida na Figura 1.

I.1.3.3. *Animais controles*

O grupo controle foi constituído por um total de 17 cães, sendo 2 cães de 1 ano de idade, irmãos, acompanhados durante o mesmo período experimental e por

amostras colhidas de 15 cães, pertencentes a 4 diferentes ninhadas, com idades variando entre 2 e 6 meses. Ambos os animais adultos, bem como amostras de 10 cães jovens, constituíram o grupo controle nos ensaios sorológicos e imunofenotipagem celular. Para o experimento envolvendo a expressão de citocinas, cinco animais jovens foram utilizados. Todas as amostras colhidas dos animais controles foram utilizadas para a determinação de faixas de normalidade para os diferentes ensaios utilizados neste trabalho.

I.1.4. Avaliação histopatológica em tecidos do bezerro e ovos embrionados infectados com *N. caninum*

Para observação da morfologia e histopatologia dos diferentes órgãos do bezerro e ovos experimentalmente infectados, diversos tecidos do bezerro e dos embriões de galinha e seus anexos foram submetidos à análise histopatológica, por meio da coloração de HE. Os tecidos musculares com alterações microscópicas visualizadas foram posteriormente analisados utilizando a coloração por tricrômio de Gomori, método este que evidencia fibras musculares em necrose. Foram colhidos fragmentos de 3 cm de comprimento por 3 cm de largura e 1 cm de profundidade e imersos em formalina tamponada a 10% por 24 horas, e posteriormente em álcool 70%, até o momento da emblocagem em parafina.

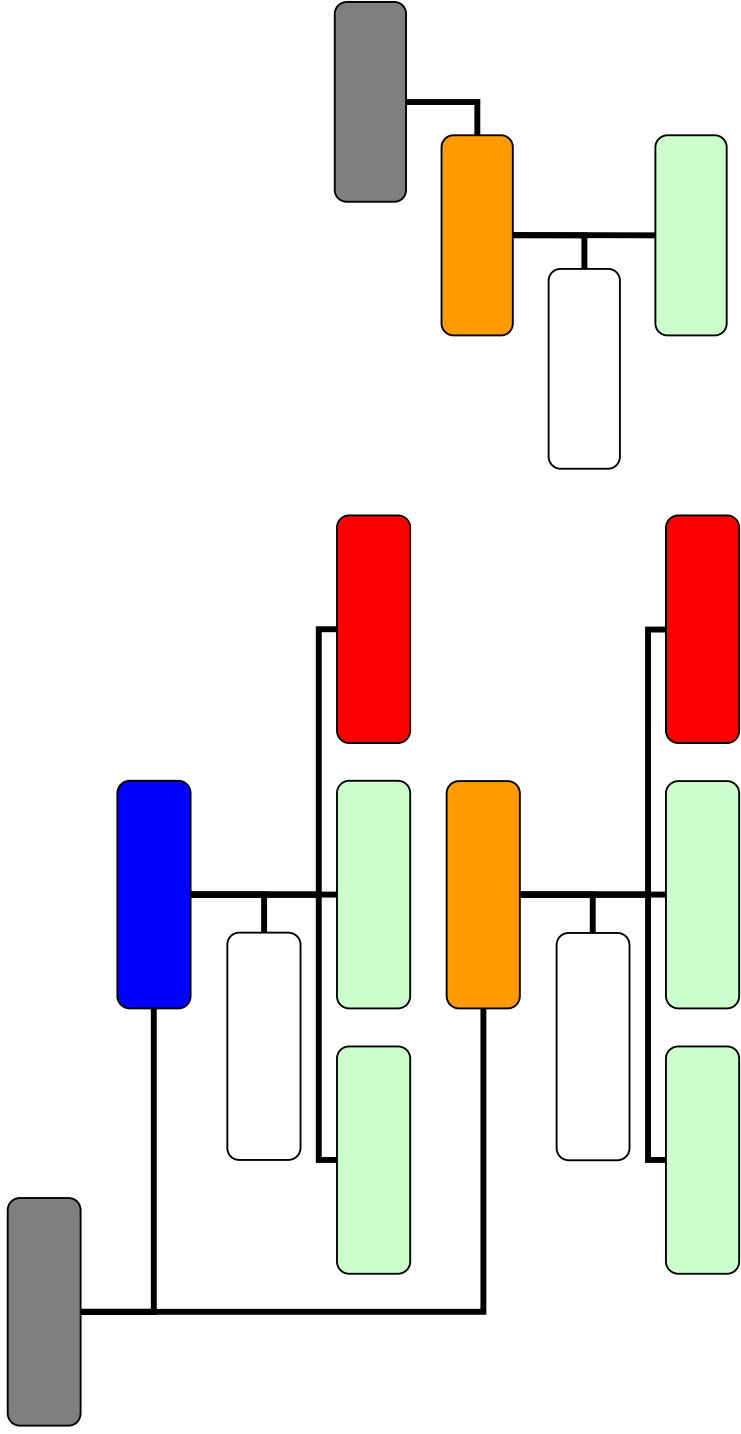


Figura 1: Diagrama representativo do delineamento experimental utilizado para se analisar os diferentes parâmetros imunes durante a infecção experimental de cães por *N. caninum* pela via oral. (■) Inóculos; (■) Cães adultos; (□) Cães jovens; (□) Cães controles; (■) Experimentos realizados; (■) Experimentos não realizados.

I.1.5. Imunoistoquímica para a detecção de *N. caninum* em tecidos do bezerro e ovos embrionados experimentalmente infectados

Cortes ultrafinos de 4 µm de espessura dos tecidos emblocados foram fixados em lâmina de microscopia revestida com poli-L-lisina. O ensaio foi realizado segundo protocolo previamente descrito por CASTRO e colaboradores (2004). O anticorpo primário utilizado consistiu de um pool de soros policlonais de camundongos infectados com 5×10^6 taquizoítas do isolado NC-1 de *N. caninum*, após 45 dpi, possuindo título de anticorpos IgG-específicos de 1:800 por RIFI. A diluição ótima de uso para o protocolo de imunoistoquímica foi padronizado em 1:1000 por experimentos realizados anteriormente (MINEO et al., submetido para publicação). O complexo ABC foi utilizado como anticorpo secundário. As marcações foram reveladas com DAB e contra coradas com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram cobertas por lamínulas e analisadas quanto à presença de marcação específica para *N. caninum*. Ensaio controles foram realizados na ausência do anticorpo primário específico, com o intuito de se observar marcações inespecíficas dos demais reagentes.

I.1.6. Ensaio sorológicos para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*

I.1.6.1. Confecção de lâminas para RIFI

Taquizoítas advindos de cultivo *in vitro* foram primeiramente submetidos à centrifugação para retirada do meio de cultura, a 600 x g, por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os parasitos foi lavado por duas vezes em 10 ml de PBS. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensão em 5 ml de PBS contendo 1% de formaldeído e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação, com o intuito de se fixar e preservar os antígenos de superfície dos taquizoítas. Após este período, o substrato antigênico foi submetido a dois novos ciclos de lavagens para se retirar o excesso de tampão fixador, sendo ressuspensos em água bi-destilada. Após o estabelecimento da concentração de taquizoítas nas lâminas em 20 parasitos por campo, 10 µl da suspensão foram adicionados por poço de lâminas próprias para a RIFI, sendo o excesso retirado. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente acondicionadas individualmente em lenços de papel e embrulhadas com papel alumínio para o armazenamento a -20°C, até o momento do uso.

1.1.6.2. *Detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para N. caninum em amostras de soros dos cães e bezerro*

As reações foram padronizadas utilizando-se amostras de soro controles positivos e negativos, advindas do serviço de diagnóstico de rotina do Laboratório de Imunoparasitologia desta instituição, alternando-se diluições iniciais dos soros, concentração dos conjugados, tempo de incubação, além de métodos e soluções de lavagens. Após sucessivos testes, chegou-se ao seguinte protocolo base para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos a *N. caninum* nos soros do bezerro e dos cães experimentalmente infectados: 1.) Os soros foram diluídos em PBS (A descrição da diluição utilizada para cada ensaio pode ser encontrada na Tabela 1), sendo adicionado 10 µl de cada amostra diluída às cavidades das lâminas, que foram incubadas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Em cada lâmina foi adicionada uma amostra controle positiva e outra negativa, sendo estas espécie e anticorpo específicos; 2.) Após o período de incubação das amostras de soro, foram realizados três ciclos de lavagem de cinco minutos em PBS; 3.) Após secagem das cavidades, foi adicionado 10 µl do conjugado de interesse, diluído em PBS com 0,01% de Azul de Evans como contra-coloração e as lâminas novamente incubadas por 30 minutos a 37°C; 4.) Após a incubação do conjugado, seguiu-se um novo ciclo de lavagem como anteriormente descrito. Utilizou-se IgG de cabra anti-IgM e IgG de coelho anti-IgG para os ensaios de detecção dos anticorpos bovinos, da mesma forma, os anticorpos caninos foram detectados por meio de IgG de cabra anti-IgM e IgG de coelho anti-IgG, sendo todos com conjugados FITC. As diluições ótimas das amostras de soro e dos diferentes conjugados utilizados estão dispostas na Tabela 1; 5.) As lâminas foram, então, cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado com carbonato-bicarbonato de sódio, pH 9.0, para que houvesse um aumento da intensidade de marcação; 6.) Após o término da reação, as lâminas foram lidas em microscópio equipado com luz fluorescente. As amostras foram consideradas positivas quando se observava fluorescência completa da membrana dos taquizoítas, por toda a extensão das cavidades analisadas. Poços que apresentavam parasitos com reatividade apical, de membranas internas ou com fluorescência parcial da membrana externa foram considerados negativos.

Tabela 1: Diluições ótimas de amostras de soro e dos conjugados para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos a *N. caninum*, por meio de RIFI em cães e bovinos experimentalmente infectados.

Espécie	Diluição do soro		Diluição do conjugado	
	IgM	IgG	IgM	IgG
Cães	1:25	1:25	1:40	1:700
Bovino	1:25	1:200	1:50	1:350

I.2. RESULTADOS

I.2.1. Bezerro

O bezerro experimentalmente infectado apresentou sinais clínicos brandos da infecção, sendo estes restritos ao aumento dos linfonodos cervicais nos primeiros 8 dpi. Não foi observado aumento de temperatura retal do animal, nem a presença de sinais clínicos compatíveis com aqueles descritos para a infecção por *N. caninum*. Após novo desafio aos 160^o dpi, o animal não demonstrou sinais de doença, sem qualquer alteração em seu estado clínico. Variações hematológicas sutis foram verificadas, como o aumento de leucócitos totais do animal nos primeiros 7 dias após a primo infecção, seguida de uma queda progressiva até se estabilizar entre 60 e 70 dpi. As contagens de linfócitos também aumentaram (Dia 0 = 35%; Dia 35 = 59%), porém os níveis permaneceram dentro dos limites considerados normais durante quase todo o período experimental (Dados não mostrados). Sorologicamente, o animal apresentou anticorpos IgM e IgG específicos contra *N. caninum* a partir do 7 dpi (Figura 2). A produção de anticorpos IgM se mostrou baixa durante o período experimental, revelando um padrão crescente até os 35 dpi, pico máximo mensurado, estabilizando-se no título 1:100 até o novo inóculo, quando os títulos aumentaram novamente para 1:200 e permaneceram inalterados até o sacrifício do animal. Quanto aos anticorpos IgG, o bezerro apresentou títulos crescentes até os 50 dpi, onde os títulos atingiram 1:12800, permanecendo inalterados durante 30 dias. Após os 80 dpi, e pelos próximos 80 dias, o animal apresentou um declínio gradual na produção de IgG, chegando a produzir oito vezes

menos anticorpos neste período. Porém, com o novo inoculo, a produção de IgG específica ao parasito mostrou um forte aumento, com título estabelecido pela RIFI em 1:25600, um aumento de dezesseis vezes, título este que permaneceu inalterado até o fim do período experimental.

O exame histopatológico dos tecidos colhidos do bezerro após o sacrifício e corados pelo HE revelaram áreas com reações inflamatórias constituídas predominantemente por células mononucleares, principalmente em cortes de músculo esquelético, coração e língua. Nos cortes corados pelo Tricrômio de Gomori foi possível a visualização de feixes musculares em necrose, evidenciadas pelo 'arredondamento', diminuição de tamanho e coloração escura das fibras musculares. Observou-se também a presença de células mononucleares fagocitando fibras necróticas. Os diversos tecidos colhidos do bezerro submetidos à reação de imunoistoquímica, para verificação da presença do *N. caninum* revelaram marcações específicas do parasito em tecidos como cérebro, coração, outros músculos esqueléticos, intestino e, principalmente língua. Os achados histológicos mais significativos estão ilustrados na Figura 3.

I.2.2. Ovos embrionados

Os ovos embrionados infectados revelaram alto grau de parasitismo após o período de 8 dpi. Além da mortalidade de 15% encontrada nos embriões, pode-se constatar macroscopicamente que as membranas CA estavam edemaciadas e apresentavam pontos esbranquiçados por toda sua extensão (Figura 4A), os quais continham altas concentrações de parasitos quando analisados a fresco. Histologicamente, vários focos de replicação do parasito puderam ser evidenciados em diversos tecidos como SNC, coração, fígado, baço, pulmão, músculos esqueléticos diversos, além da membrana CA (Figura 4B). Os resultados observados por meio de histopatologia foram posteriormente confirmados pela técnica de imunoistoquímica (Figura 4C).

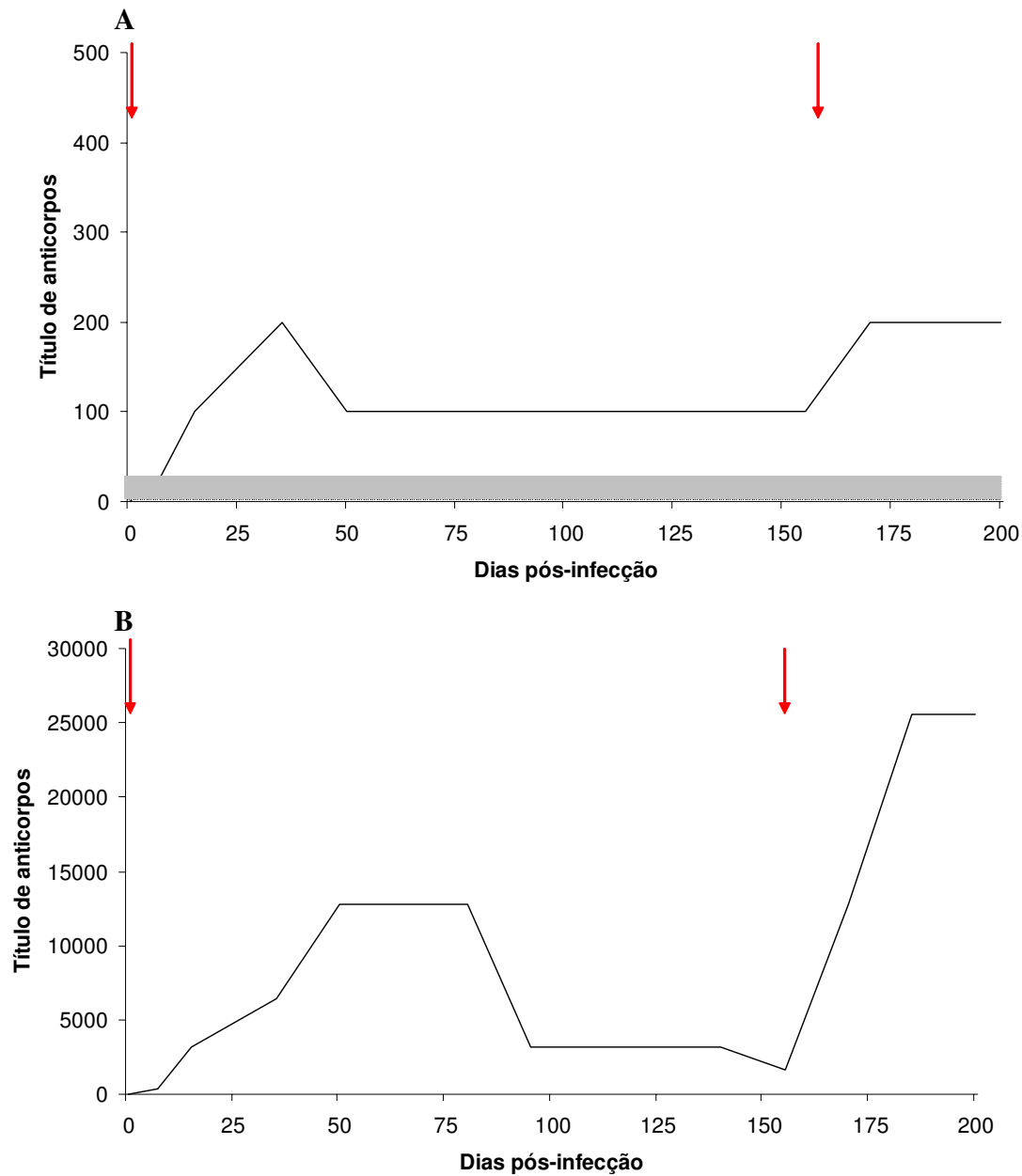


Figura 2: Perfil da cinética de anticorpos IgM (A) e IgG (B) específicos anti-*Neospora caninum* em amostras de soro de bezerro experimentalmente infectado, pela Reação de Imunofluorescência Indireta. As setas vermelhas indicam os dias dos inóculos e a faixa cinza indica o ponto de corte da reação.

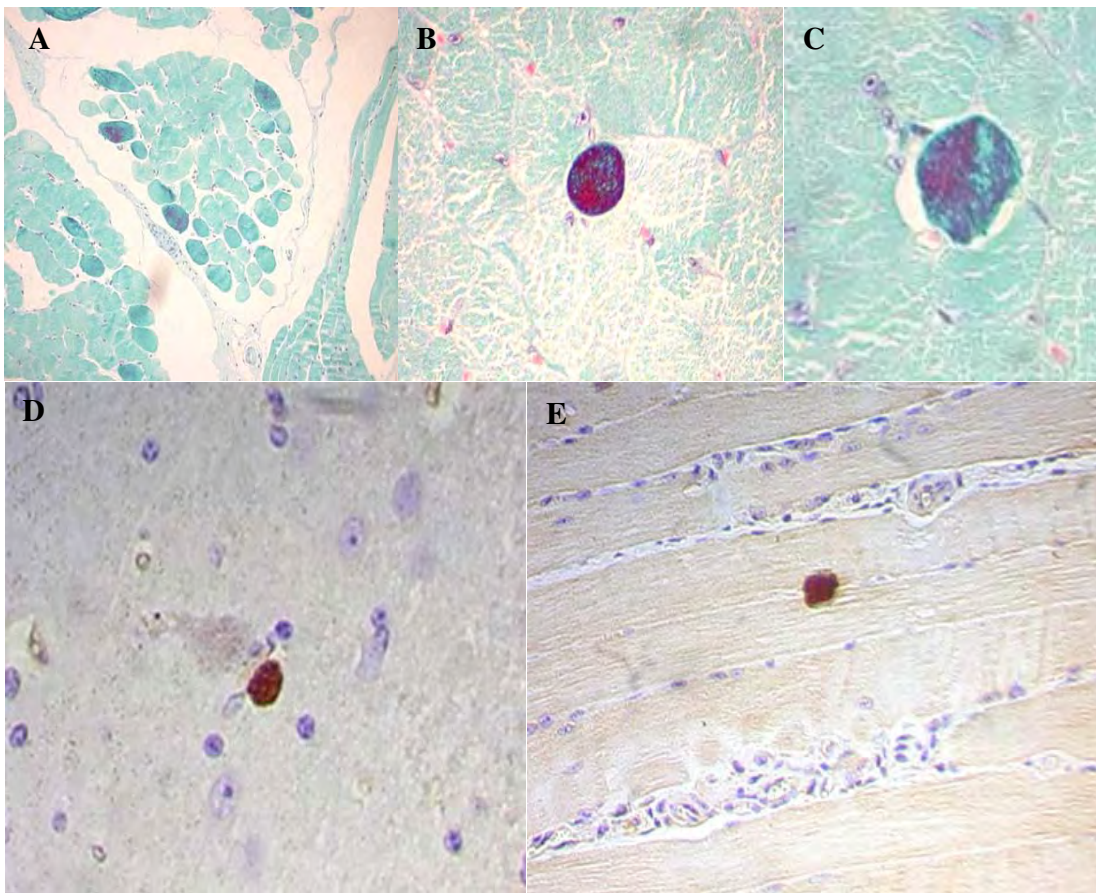


Figura 3: Fotomicrografia de tecidos musculares de bezerro experimentalmente infectado com *Neospora caninum*, após 200 dpi (A-C). A – Feixe muscular da língua com diversas fibras em necrose, representadas por ‘arredondamento’, diminuição do tamanho e escurecimento na coloração por Tricrômio de Gomori (40x); B – Fibra muscular da língua em necrose, ao redor de fibras normais (400x); C – Fibra muscular da língua em necrose, evidenciado pela presença de células mononucleares realizando fagocitose (1000x). Presença de parasitos em tecidos do sistema nervoso central (D – 100x) e fibras de músculos esqueléticos (E – 400x), revelados por imunistoquímica específica para *N. caninum*.

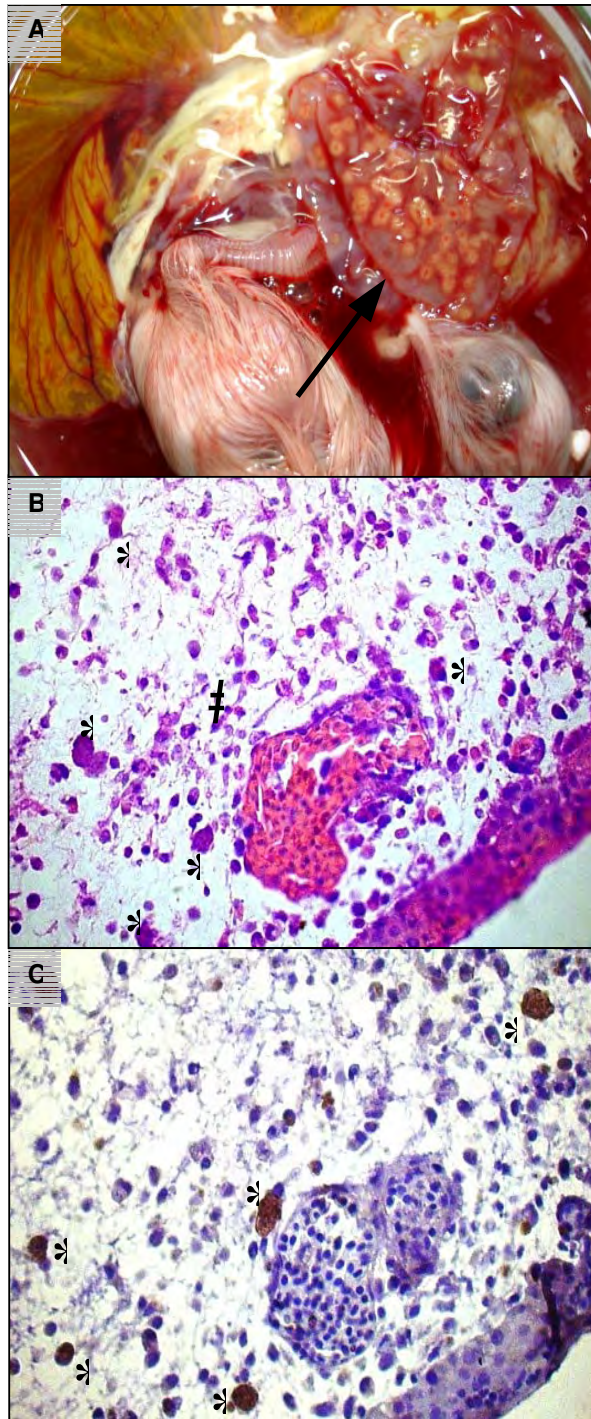


Figura 4: Lesões macroscópicas na membrana corioalantóide de embrião de galinha inoculado com 10^6 taquizoítas do isolado NC-1 de *N. caninum* (A - Seta). Microscopicamente, a coloração por HE (B) revelou a presença de infiltrado inflamatório misto (#) e focos de replicação parasitária (*), também evidenciados por meio de imunohistoquímica (C).

I.2.3. Cães

Os cães dos grupos G1 e G2, os quais ingeriram tecidos do bezerro infectado experimentalmente, não apresentaram sinais clínicos clássicos da infecção por *N. caninum*, como convulsões e paresia dos membros posteriores. Não foram observadas alterações significativas na temperatura retal dos animais. Foi observada diarreia nos primeiros três dias de infecção, porém supõe-se que esta seja decorrente da ingestão de tecidos musculares e do sistema nervoso central do bezerro, uma vez que os animais só haviam ingerido ração comercial até o momento da infecção. Durante os primeiros 40 dpi, os animais apresentaram secreção mucosa sobre o bolo fecal esporadicamente, com maior frequência nos cães do G2 e concomitantemente a presença de oocistos. Porém, o animal 2B apresentou forte prurido na região ventral da mandíbula, pescoço e porção anterior do tórax. Não haviam lesões focais ou exsudação evidente. Não foi possível o isolamento de *N. caninum* por meio do raspado de pele. Quanto à eliminação de oocistos, observou-se a presença de oocistos não esporulados e semi-esporulados nas fezes dos cães do G1 e G2 (Figura 5). Os animais do G2 apresentaram um período mais longo de eliminação, iniciando-se na primeira semana de infecção, perdurando até 28 dpi. Oocistos também foram visualizados no bolo fecal dos cães do G1, porém em um menor número de dias e mais tardio, quando comparado ao G2 (Tabela 2). Os cães do G3 não apresentaram alterações clínicas e oocistos detectáveis em suas fezes no período de 40 dpi.



Figura 5: Oocisto semi-esporulado representativo encontrado nas fezes dos cães pertencentes ao G1 e G2, inoculados com tecidos de um bezerro experimentalmente infectado por taquizoítas de *N. caninum*. Barra = 10 μ m. 1000x.

Observando a cinética de anticorpos IgM anti-*N. caninum* produzidos pelos animais infectados, pode-se observar que dentre os animais do grupo G1, apenas o cão 1B apresentou uma reatividade tardia revelada pela RIFI, com título limítrofe, dos 85 aos 225 dpi. O animal 1A não apresentou reatividade à RIFI-IgM (Figura 7A). Os animais do grupo G2 apresentaram reatividade inicial para IgM entre 30-35 dpi, com títulos de 1:25. Aos 130 dpi, títulos de ambos os animais apresentaram um aumento para 1:50, permanecendo estável no animal 2A até o final do período experimental. O animal 2B manteve o título de 1:50 até 160 dpi, quando o título regrediu a 1:25 (Figura 6). Os cães pertencentes ao G3 não apresentaram reatividade na RIFI para a detecção de anticorpos IgM contra *N. caninum*.

A produção de anticorpos IgG por ambos os grupos revelou uma baixa reatividade ao ensaio de imunofluorescência indireta. Porém, observou-se uma reatividade ligeiramente superior dos cães mais jovens em relação aos adultos. O G1 apresentou somente títulos no ponto de corte do ensaio, sendo que o animal 1B reagiu ao ensaio positivamente dos 5 aos 14 dpi, quando voltou a ser negativo. O animal 1A não apresentou anticorpos detectáveis até o 85 dpi, seguido por uma nova reatividade do cão 1B aos 92 dpi, ambos mantendo título estável (1:25) até o final do período de experimentação. Quanto aos animais do G2, observou-se um primeiro pico de anticorpos entre o 25º e o 35º dpi pelo cão 2B, soronegativando e voltando a produzir anticorpos detectáveis aos 75 dpi, mantendo títulos de 1:25 até o 130 dpi, quando os níveis de anticorpos subiram levemente para 1:50 até o 170 dpi, voltando a regredir para os títulos basais observados até os 250 dpi. Quanto ao animal 2A, este apresentou uma soroconversão mais tardia, de forma semelhante ao 1A, aos 64 dpi. Os títulos de anticorpos permaneceram em 1:25 até o 110 dpi, quando subiram para 1:50, permanecendo inalterados até o final do experimento (Figura 6). Dentre os cães do G3, observou-se a soroconversão somente do animal 3C, aos 64 dpi. Os demais animais permaneceram soronegativos durante toda a avaliação experimental.

Após a eutanásia dos cães, observou-se um espessamento proeminente da mucosa duodenal do animal 1A, com a presença de secreção muco purulenta (Figura 8A), sendo constatada também acentuada congestão esplênica e endocardiose moderada. De forma semelhante, o cão 1B apresentou a mucosa do jejuno e íleo

levemente espessadas, acompanhadas de hiperplasia de polpa branca no baço, quadro este também observado no 2A, porém de forma mais intensa. Apesar de não apresentar alterações na mucosa intestinal dignas de nota, o cão 2A apresentou uma forte hiperemia da porção delgada do intestino (Figura 8B). Dentre todos os animais analisados *post mortem*, o animal 2B foi aquele que demonstrou alterações patológicas mais graves. Notou-se a presença de hemorragia no esôfago acompanhada de bolo fecal escurecido. Quadros hemorrágicos também foram observados na vesícula biliar (Figura 8C) e linfonodos mesentéricos, os quais se apresentavam com volume aumentado (Figura 8D).

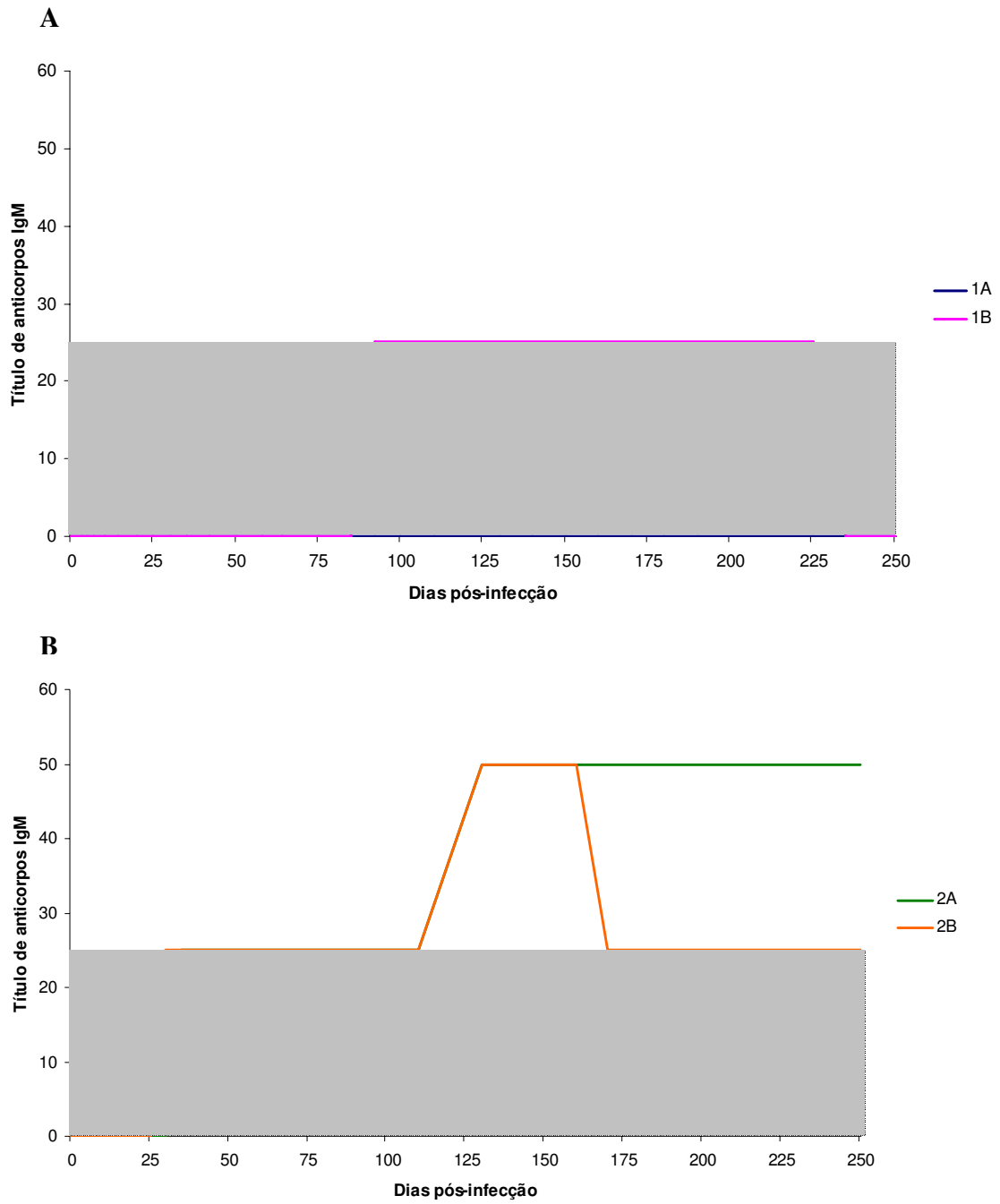


Figura 6: Cinética da detecção de anticorpos IgM específicos a *N. caninum* em soros dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B) por meio de RIFI. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (1:25 – faixa cinza).

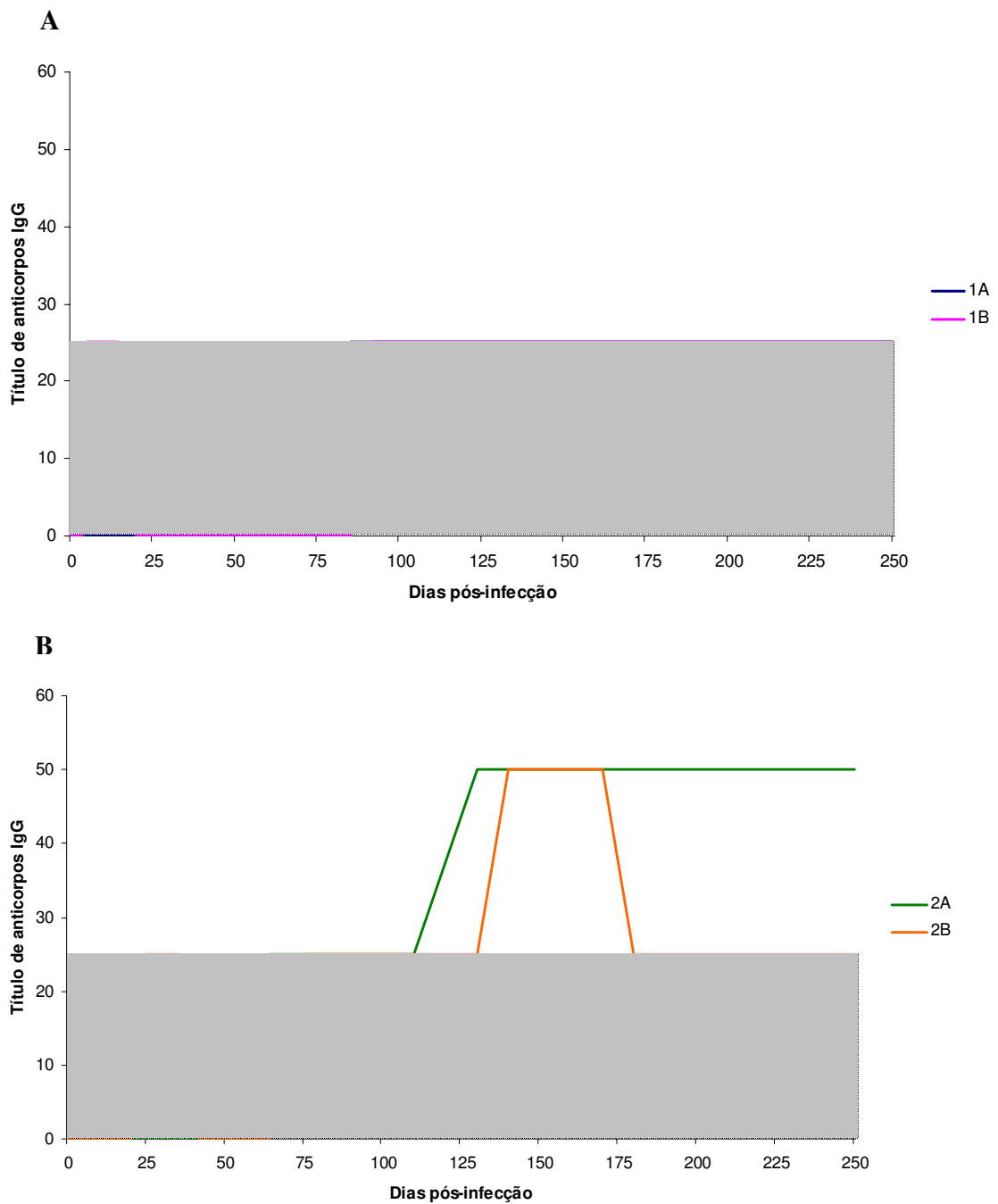


Figura 7: Cinética da detecção de anticorpos IgG específicos a *N. caninum* em soros dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B) por meio de RIFI. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (1:25 – faixa cinza).

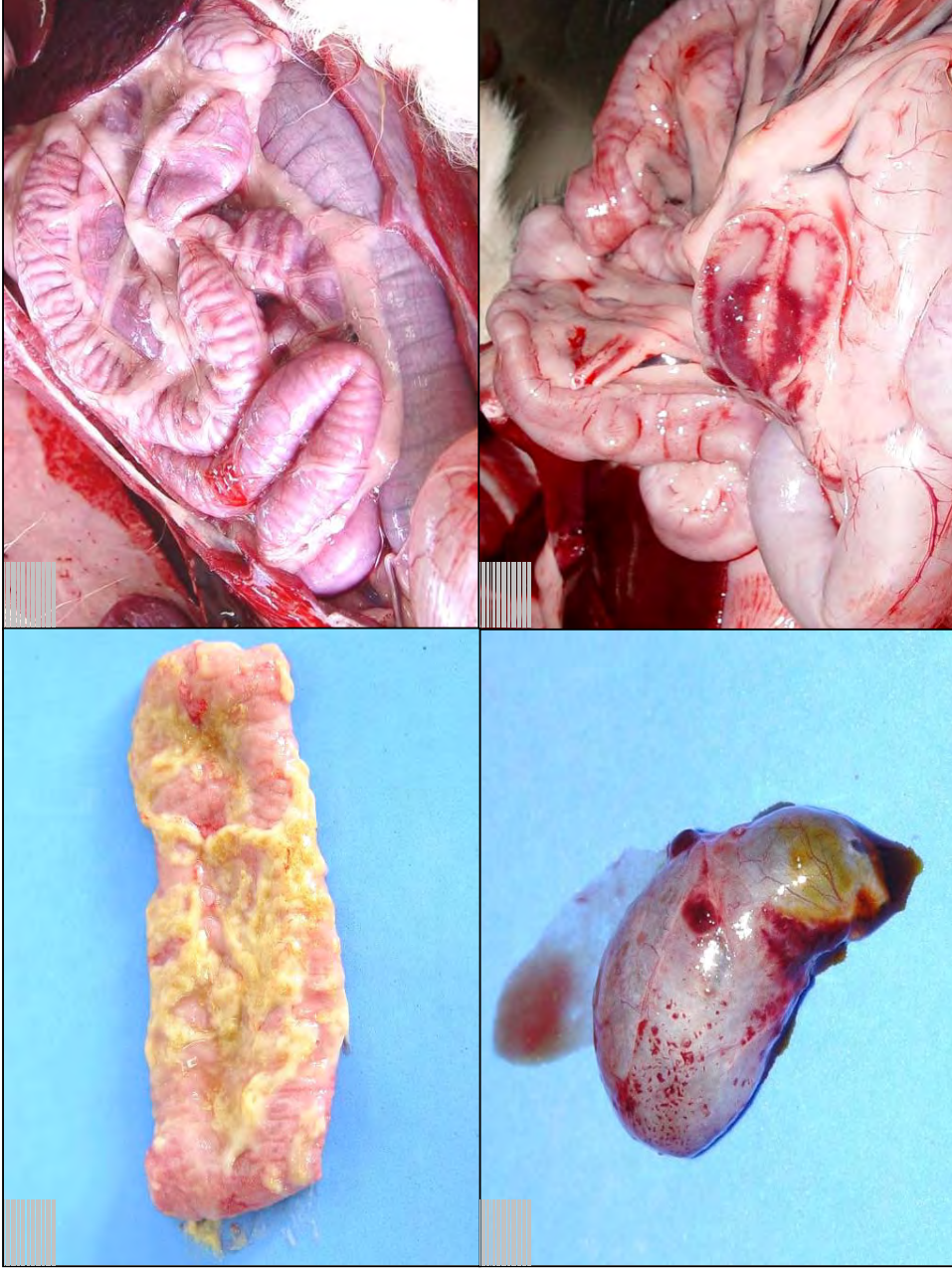


Figura 8: Lesões macroscópicas observadas nos cães experimentalmente inoculados com tecidos de bezerro infectados por *N. caninum* pela via oral. (A) cão 1A - Espessamento da mucosa duodenal com presença de secreção muco-purulenta; (B) cão 2A – Forte hiperemia do intestino delgado; (C) cão 2B – Hemorragia de vesícula biliar e (D) linfonodo mesentérico, o qual também se apresentava aumentado.

I.3. Discussão

A infecção por *N. caninum* em cães tem sido adereçada em artigos científicos por meio de estudos soroepidemiológicos (CHEADLE et al., 1999; MINEO et al., 2001; GENNARI et al., 2002), eliminação de oocistos (McALLISTER et al., 1998; DIJKSTRA et al., 2001; GONDIM et al., 2005) e métodos de diagnóstico, principalmente àqueles baseados em ensaios sorológicos (HIGA et al., 2000; PINHEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2007). A resposta imune do cão frente ao protozoário não tem sido alvo de investigações mais aprofundadas, o que não ocorre em outros modelos experimentais, como bovinos e camundongos. Em um único relato, SCHARES e colaboradores (2001) descreveram de forma mais objetiva a ausência ou aparecimento tardio de anticorpos IgG específicos contra o parasito em cães, fato este previamente relatado superficialmente (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2002). Para que haja subsídios que proporcionem um melhor entendimento da merogonia, epidemiologia e diagnóstico desta parasitose faz-se necessário a obtenção de informações mais precisas sobre o comportamento do sistema imune dos cães quando desafiados pelo parasito pela via oral.

Primeiramente, quanto às fontes de infecção utilizadas nos diferentes grupos experimentais, o bezerro experimentalmente infectado por taquizoítas de *N. caninum* demonstrou uma alta soroconversão de anticorpos da classe IgG específico ao parasito, contando também com níveis detectáveis de anticorpos IgM por todo o período experimental. Após seu sacrifício, a presença do parasito pode ser constatada no sistema nervoso central do animal, bem como em diferentes tecidos musculares, com maior concentração detectada na língua. As colorações de cortes de língua do animal com fibras em necrose indicaram que este seja o tecido muscular preferencial de replicação do parasito. A alta concentração de anticorpos em bovinos natural e experimentalmente infectados vão de encontro com relatos prévios na literatura (INNES et al., 2001; DIJKSTRA et al., 2002; MINEO et al., 2006). A presença de cistos teciduais é descrita principalmente no sistema nervoso central em bovinos (HEMPHILL et al., 2006), porém um único grupo de pesquisa relatou a presença de formas latentes do parasito em musculatura (PETERS et al., 2001). A confirmação da soroconversão e de

estágios do parasito nos tecidos do bezerro inoculado, garantiu o sucesso da infecção experimental no bovino e, principalmente, assegura que os cães experimentais entraram em contato com *N. caninum*, por via oral. Porém, esta técnica não permite estimar o inóculo administrado aos cães do G1 e G2, uma vez que a distribuição do parasito nos tecidos não é homogênea. Sendo assim, alternativas para a inoculação de quantidades conhecidas do parasito também foram adereçadas neste estudo. Padronizou-se uma técnica de infecção de ovos embrionados de galinhas com taquizoítas de *N. caninum* derivados de cultivo celular. Os experimentos conduzidos para se padronizar esta técnica indicam a presença do parasito de forma abundante no líquido e membranas CA, além de diversos órgãos do embrião. Quanto à avaliação da produção, foi possível recuperar as mesmas quantidades de parasitos inoculados somente no líquido alantóide, indicando que a incubação de sete dias promove uma multiplicação satisfatória de *N. caninum*. Adicionalmente, informações obtidas através da literatura mostram que há expressão de mRNA codificando antígenos taquizoíta- e bradizoíta-específicos, indicando que o parasito realiza interconversão de estágio neste modelo (FURUTA et al., encaminhado para publicação).

Após a ingestão dos tecidos do bezerro infectado, foram observadas amostras de fezes positivas no G2 para oocistos de *N. caninum* por um período de vinte e oito dias (entre 4 e 28 dpi), enquanto que no G1, o período de eliminação foi restrito a apenas um dos animais (1B), de forma tardia e eliminação de menor número de oocistos. Quanto aos animais do G3, oocistos não foram detectados nas fezes durante a avaliação de quarenta dias de experimento. A fase aguda da infecção oral por *N. caninum* em cães é marcada pela eliminação de oocistos, os quais são detectados nas fezes durante os primeiros 30-40 dias de infecção (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2002; FURUTA et al., encaminhado para publicação).

Infecções experimentais têm sido realizadas com tecidos murinos e de ruminantes, com o intuito de se estudar o ciclo sexuado de *N. caninum* no cão, bem como método de bioensaio (McALLISTER et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004). GONDIM e colaboradores (2002) demonstraram maior produção de oocistos em cães alimentados com tecidos bovinos em detrimento da utilização de camundongos infectados. Uma possível explicação para este fato é a correlação entre o número de

cistos teciduais ingeridos e a quantidade de oocistos eliminados pelos cães experimentalmente infectados (McALLISTER et al., 1998). O estágio de bradizoíta é essencial para o sucesso da infecção oral de carnívoros, principalmente, uma vez que os cistos teciduais são resistentes à digestão química estomacal e utilizam as enzimas presentes no duodeno para romper suas paredes, como observado no modelo da infecção oral de gatos por *T. gondii* (FREYRE et al., 2007). A baixa quantidade de cistos teciduais presentes nos ovos embrionados, devido ao curto tempo para a realização de interconversão de estágio, pode ter sido a causa da ausência de formas sexuadas nas fezes dos cães.

Como observado previamente, a infecção de cães com ovos embrionados, utilizando o mesmo protocolo realizado neste estudo, leva a uma produção de oocistos relativamente baixa e tardia (pós-40 dpi), porém assegura que os animais se infectem pela abundância de parasitos administrados (FURUTA et al., encaminhado para publicação). De forma complementar, a maior eliminação de oocistos nos animais do G2 já era esperada, uma vez que cães jovens são mais susceptíveis a realização do ciclo sexuado do parasito, quando comparados a animais adultos (GONDIM et al., 2005). Além disso, observou-se uma coincidência de eventos nos diferentes grupos experimentais, o que indica que a infecção pelo parasito em cães apresenta características bem delimitadas, independentemente dos modelos de infecção oral utilizados neste estudo, corroborando com resultados prévios sobre a utilização de ovos embrionados como fonte de antígeno e infecção (FURUTA et al., encaminhado para publicação). Também, pode-se observar que diferentes protocolos experimentais, realizados em ensaios independentes, utilizando cães de diferentes parentescos, indicam perfil semelhante de resposta imune ao parasito.

CAPÍTULO II

Cinética da resposta imune humoral em cães inoculados com tecidos infectados por N. caninum

II.1. MATERIAL E MÉTODOS

II.1.1. Animais utilizados

Para a realização dos ensaios sorológicos com o intuito de se acompanhar a cinética da resposta imune humoral de cães pertencentes a diferentes faixas etárias, utilizou-se os cães do G1, G2, dois cães controles adultos e 10 cães controles filhotes.

II.1.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG, IgG₁, IgG₂, IgA e IgE séricos totais nos cães experimentalmente infectados

Para se observar a cinética de produção de anticorpos das classes IgG, IgA e IgE, além das subclasses de IgG (IgG₁ e IgG₂) totais durante o período experimental, foram utilizados kits contendo anticorpos purificados contra a imunoglobulina alvo purificada, amostras controle positivas e conjugados marcados com HRPO. Placas de poliestireno de 96 cavidades (Immuno Plate Maxisorp) foram sensibilizadas com 100 µl dos anticorpos purificados na concentração de 10 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a sensibilização, as placas foram lavadas por três vezes utilizando-se TBS-T. Realizou-se o bloqueio contra reatividades inespecíficas utilizando-se TBS adicionado de 1% de BSA, no volume de 200 µl por poço, durante 30 minutos a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, 100 µl das amostras de soro diluídas em PBS-T + BSA 1% foram incubadas, em duplicata, por duas horas, à temperatura ambiente. Paralelamente as amostras-teste, foi adicionada a amostra positiva do kit, com concentração estimada de 10.000 ng/ml da imunoglobulina desejada. Após incubação das amostras de soro, as placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com 100 µl por cavidade dos conjugados, diluídos em PBS-T + BSA 1%, por duas horas à temperatura ambiente. A diluição utilizada para os soros teste e conjugados, contra as diversas classes de imunoglobulinas, está descrita na Tabela 3. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes e reveladas com a adição de 100 µl por poço de TMB, incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. A reação foi interrompida com a adição de 100 µl de ácido sulfúrico 2M e a leitura foi realizada em

leitor de placas em comprimento de onda 450 nm, sendo obtidas DO para cada amostra analisada.

Tabela 3: Diluições dos soros e conjugados utilizados nos ensaios de dosagens de anticorpos séricos totais produzidos por cães experimentalmente infectados com *N. caninum*.

Imunoglobulina	Diluição	
	Soro	Conjugado
IgG	1:32000	1:100000
IgG1	1:8000	1:50000
IgG2	1:32000	1:100000
IgA	1:8000	1:10000
IgE	1:200	1:10000

II.1.2.1 Análise das DOs obtidas

Para se corrigir os valores obtidos para cada amostra, primeiramente descontou-se a leitura óptica de poços sem a presença de soro (branco) de todas as DOs obtidas (DO líquida). A partir das DOs líquidas, dividiu-se os valores das amostras teste pelo valor obtido para o controle positivo do kit, obtendo-se assim os Índices A/P individuais. Amostras dos animais controles (filhotes e adultos) também foram submetidas à análise, com o intuito de se estabelecer uma média de normalidade para a produção de cada anticorpo alvo, em cada grupo etário (Tabela 4).

Tabela 4: Valores normais médios obtidos para cães adultos e filhotes quanto à concentração de diferentes classes de anticorpos séricos totais

Anticorpo	Índice A/P	
	Adultos	Filhotes
<i>IgG</i>	0,818	0,651
<i>IgG₁</i>	0,648	0,289
<i>IgG₂</i>	0,644	0,581
<i>IgA</i>	0,407	0,103
<i>IgE</i>	0,775	0,372

II.1.3. ELISA para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos a *N. caninum* em amostras de soros dos cães experimentalmente infectados

Para a realização de ensaios imunoenzimáticos com o intuito de se detectar anticorpos IgM e IgG específicos a *N. caninum*, placas de poliestireno (Nunclon Delta Surface) foram sensibilizadas com AgNc, conforme descrição no Capítulo II. As placas foram bloqueadas com tampão carbonato-bicarbonato de sódio adicionado de 5% de leite em pó desnatado, utilizando-se 200 µl da solução por poço, durante 1 hora a 37°C. Após este período, as placas foram submetidas a três ciclos de lavagem com PBS-T. Em seguida, os soros foram diluídos 50 vezes em PBS-T contendo 5% de soro normal de coelho, tendo 100 µl da solução, em duplicata, adicionada por cavidade e incubada por 2 horas a 37°C. Além das amostras advindas dos animais pertencentes ao G1 e G2, amostras controles positivas e negativas foram inseridas em cada placa, para se constatar o bom funcionamento dos ensaios e para se calcular posteriormente os pontos de corte da reação. Após a incubação das amostras teste, as placas foram lavadas cinco vezes, e adicionou-se 100 µl por cavidade dos anticorpos secundários, para uma nova incubação de duas horas a 37°C. Quando o objeto de análise eram anticorpos IgM específicos, o conjugado utilizado foi IgG de cabra anti-IgM de cão marcada com FA, diluído na proporção de 1:100 e para a detecção de IgG específica ao parasito, utilizou-se IgG de coelho anti-IgG de cão também marcada com FA diluído 1:5000, em PBS-T contendo 5% de soro normal de coelho. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes e reveladas com a adição de 100 µl por cavidade de solução 1 mg/ml de pNPP, sendo incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. As reações foram lidas em leitor de placas em comprimento de onda 405 nm, sendo obtidas DOs para cada amostra analisada.

II.1.3.1. Análise das DOs obtidas

As leituras ópticas obtidas foram processadas conforme descrição anterior (SILVA et al., 2005). Brevemente, as amostras teste foram descontadas do branco, obtendo-se as DOs líquidas. Para se estabelecer os pontos de cortes das reações, foi realizada uma média dos cinco controles negativos de cada faixa etária adicionados por placa. A partir da média, adicionaram-se três desvios padrões às mesmas e

delimitaram-se assim os pontos de corte das reações. Os valores foram expressos em IE, sendo esta a razão entre as DOs líquidas de cada amostra sobre o ponto de corte da respectiva faixa etária. Foram consideradas positivas amostras cujo valor de IE fosse maior que 1.

II.1.4. ELISA para a detecção de subclasses de anticorpos IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) específicos à *N. caninum* em amostras de soros dos cães experimentalmente infectados

Para a detecção das subclasses de IgG, realizou-se um ELISA nos moldes daquele descrito para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para *N. caninum*. As diferenças neste ensaio foram os volumes utilizados para as várias etapas da reação (Sensibilização – 75 µl; Soros – 50 µl; Conjugado – 50 µl) e a inserção de uma etapa de incubação com anticorpos monoclonais. Após a incubação das amostras teste, as placas foram lavadas cinco vezes, e adicionou-se 50 µl por poço dos anticorpos monoclonais produzidos a partir de esplenócitos de camundongos, específicos para cada subclasse de IgG canina, nas diluições recomendadas pelo Prof. Dr. Michael J. Day (Bristol University, Bristol, Inglaterra), o qual gentilmente cedeu os anticorpos para este trabalho (Tabela 5). Após a incubação dos anticorpos secundários, por duas horas a 37°C, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes e, em seguida, adicionou-se o conjugado composto por IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com FA, na diluição de 1:5000, em PBS-T adicionado de 5% de soro normal de coelho, sendo incubado por uma hora, a 37°C. O restante da reação e a análise dos valores obtidos foram realizados conforme descritos para os ensaios IgM e IgG específicos.

Tabela 5: Anticorpos monoclonais utilizados para a detecção de subclasses de IgG canina, por meio de ELISA, nos soros dos cães experimentalmente infectados por *N. caninum*.

Anticorpo monoclonal	Subclasse alvo	Diluição de uso
B6	IgG ₁	1:200
E5	IgG ₂	1:50
A3G4	IgG ₃	1:50
A5	IgG ₄	1:50

II.1.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos das classes IgA e IgE específicos à *N. caninum* nos cães experimentalmente infectados

Placas “Nunclon Delta Surface” foram sensibilizadas e bloqueadas conforme as descrições prévias. Os soros foram diluídos 1:50, e 100 µl da solução foi adicionado por cavidade, em duplicata, e incubados por 1 hora a 37°C. Após incubação das amostras de soro, as placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com 100 µl por cavidade das diluições ótimas dos conjugados marcados com HRPO, IgG de cabra anti-IgA e anti-IgE caninas (1:1000 e 1:500, respectivamente), por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes e a seguir, foi adicionado 100 µl por poço de solução de TMB, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. A reação foi interrompida com a adição de 100 µl de ácido sulfúrico 2M. As reações foram lidas em leitor de placas em comprimento de onda 450 nm, sendo obtidas DOs para cada amostra analisada. Os valores obtidos foram expressos em Índices ELISA, assim como descritos anteriormente neste capítulo.

II.1.6. Western blotting das amostras de soro dos cães experimentalmente infectados

Para se verificar o perfil de reatividade de anticorpos IgG específicos aos antígenos de *N. caninum*, os soros dos cães experimentalmente infectados foram submetidos à análise pelo WB. Para isto, 200 µg de AgNc, adicionado de tampão de amostra e submetido à fervura durante 5 minutos, foi aplicado em pente único em géis de poliacrilamida a 12%. Paralelamente ao AgNc, aplicou-se aos géis um padrão de peso molecular variando entre 6 kDa e 200 kDa. Em seguida, os géis foram submetidos à corrida eletroforética, com corrente elétrica constante em 20 mA, durante uma hora. Após a separação por eletroforese, os géis foram submetidos à transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm, utilizando um sistema semi-úmido tipo 'sanduíche', onde o gel permaneceu em contato direto com a membrana de nitrocelulose, sendo ambos envoltos em papéis de filtro umedecidos com tampão de transferência. A transferência ocorreu pela migração das proteínas do gel para a membrana por meio de cargas elétricas, fornecida por uma fonte, sob amperagem de 0,8 mA/cm² de membrana. Após a transferência, as membranas foram coradas com Vermelho de Ponceau, durante um minuto sob agitação, para se evidenciar os antígenos e padrões moleculares transferidos. As membranas foram então descoloridas com água destilada, secas à temperatura ambiente e cortada em tiras de 3 mm.

Para a realização da técnica de WB propriamente dita, as tiras de membranas foram submetidas ao bloqueio contra reatividades inespecíficas utilizando-se PBS-T contendo 5% de leite desnatado em pó, por 2 horas, à temperatura ambiente. Para a retirada do excesso de tampão de bloqueio, as tiras foram lavadas em PBS-T contendo 1% de leite desnatado. Em seguida, as tiras foram incubadas com os soros teste, diluídos em PBS-T contendo 1% de leite desnatado na diluição de 1:50, perfazendo um total de 500 µl por caneta, durante 18 horas a 4°C sob agitação. Após a incubação com os soros dos cães, as tiras foram lavadas com PBS-T por seis vezes, tendo cada lavagem 5 minutos, sob agitação. O próximo passo foi a adição do anticorpo secundário constituído por IgG de coelho anti-IgG canina conjugado com HRPO, na diluição de 1:5000 em PBS-T + 1% de leite desnatado, por duas horas, à temperatura ambiente e

sob agitação. Após novo ciclo de seis lavagens, a reação foi revelada por meio da adição de DAB com 0,02% de peróxido de hidrogênio, diluídos em TBS, sendo adicionados 500 µl por canaleta. A reação foi interrompida com água destilada após a visualização das bandas antigênicas, que foram posteriormente analisadas por meio de fotodocumentador, utilizando-se o software Kodak 1D.

II.2. RESULTADOS

II.2.1. Anticorpos IgM específicos

Quando os soros dos cães foram analisados pelo método de ELISA, detectou-se a presença de anticorpos IgM específicos a partir do 3^o dpi em ambos os animais do G1. A cinética apresentou alguns picos de reatividade ao AgNc, sendo que o animal 1A apresentou positividade em cinco dias isolados (3, 14, 35, 92 e 110), enquanto o cão 1B apresentou positividade inicial entre os dias 3 e 10 pós-infecção, se mostrando negativo por mais de 50 dias, quando voltou a alternar entre IE superiores e inferiores a 1,0 até os 190 dpi, novamente permanecendo não reagente até o fim do período experimental. É importante ressaltar que ambos os cães do G1 apresentaram baixa reatividade de anticorpos detectáveis pelo ELISA-IgM, sendo IE sempre inferiores a 1,3 (Figura 9A).

Em contrapartida, os animais do G2 se mostraram proporcionalmente mais reativos ao ELISA-IgM, com produção superior de anticorpos, o animal 2A apresentando pico com IE = 1,606 aos 100 dpi, enquanto o cão 2B apresentou um IE = 1,792 com 50 dpi. Além dos picos de anticorpos, os animais do G2 também apresentaram uma positividade sorológica mais constante que o G1, apesar de manter um perfil instável de produção de IgM. Ambos os animais se mostraram negativos ao fim do experimento, sendo que o animal 2A se mostrou soronegativo a partir dos 180 dpi, enquanto que o animal 2B deixou de apresentar reatividade no ensaio aos 190 dpi (Figura 9B).

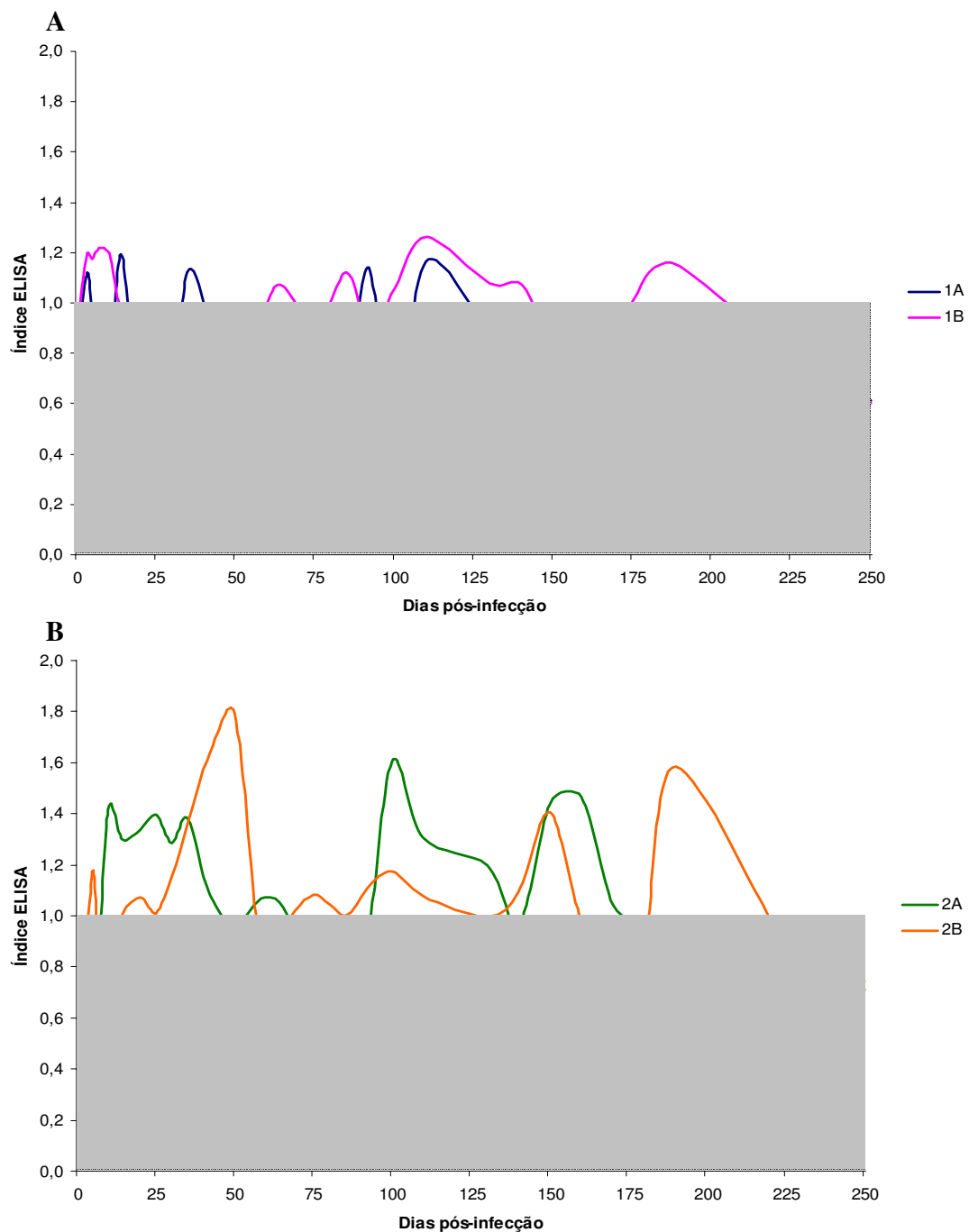


Figura 9: Cinética da detecção de anticorpos IgM específicos a *N. caninum* em amostras de soros dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B) por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA \geq 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

II.2.2. Anticorpos IgA séricos totais e específicos

A produção de IgA total nos animais do G1 manteve uma tendência à estabilidade durante o experimento, porém apresentou algumas variações significativas (Figura 10A). A maior parte destas flutuações de IgA não apresentaram correspondência às dosagens de IgA específicas (Figura 11A), com exceção do animal 1A, que apresentou picos nos dias 30 e 225 do experimento. Estes cães apresentaram soroconversão rápida (1A – 5 dpi; 1B – 3 dpi), porém instável, com positividade de IgA específica detectável até 42 dpi no animal 1B, seguido de um período de ausência de anticorpos detectáveis até o pico de produção máxima de anticorpos IgA específicos a *N. caninum*, que ocorreu entre 100 e 160 dpi. Houve também uma produção discreta de anticorpos dosados por ambos os ensaios por ambos os animais após os 180 dpi. Os índices encontrados no ELISA IgA específico foram relativamente baixos, sendo que o cão 1A apresentou produção máxima aos 110 dpi, com IE = 1,877; e IE = 1,768 no 130 dpi pelo 1B (Figura 11A).

Quanto aos animais do G2, observou-se um aumento na produção de IgA total em ambos os cães ao longo do período experimental, com maior intensidade após 130 dpi. Apesar de apresentar a mesma tendência, o animal 2B revelou uma maior variabilidade nas quantidades de IgA sérico detectadas (Figura 10B). Em relação ao ELISA IgA-específico, pode-se constatar que a infecção pelo protozoário causou um maior reflexo nos níveis de IgA total produzida em relação aos cães do G1. O ELISA IgA específico no G2 mostrou um mesmo perfil de reatividade, com cinco picos de produção, porém com valores até 60% maiores dos encontrados no G1. O primeiro pico, correspondente à soroconversão dos animais, ocorreu entre 3 e 58 dpi, com títulos mais baixos e perfil instável. Dos 100 aos 160 dpi, os animais, principalmente o 2A, apresentou novo pico de produção de IgA específica (IE = 2,707, 150 dpi). A produção máxima detectável de IgA contra *N. caninum* produzida no cão 2B ocorreu no terceiro pico, aos 225 dpi, com IE = 2,827 (Figura 11B).

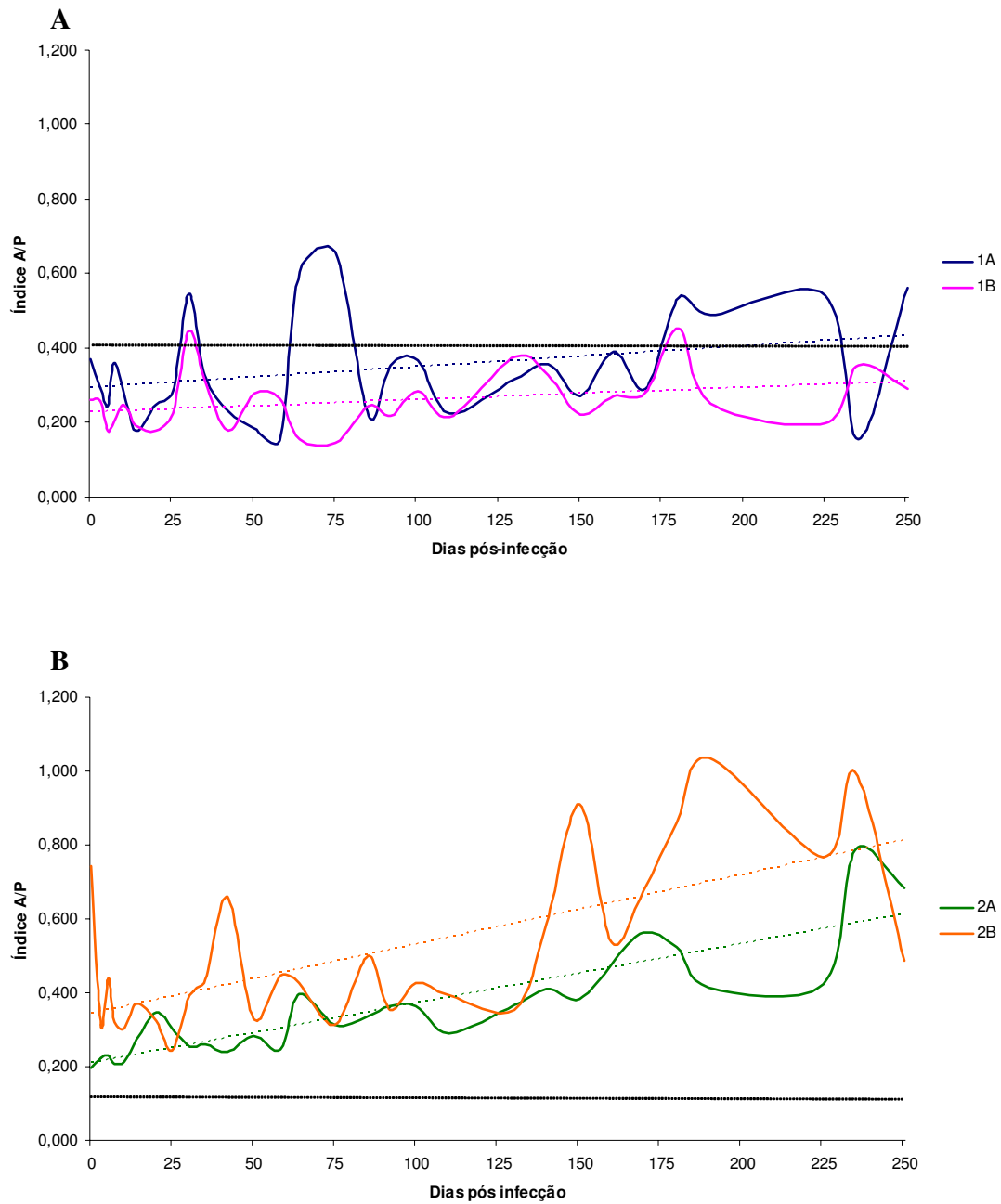


Figura 10: Cinética da detecção de anticorpos IgA séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. As linhas pontilhadas coloridas, adjacentes às curvas de anticorpos, representam a tendência linear da produção de IgA para cada animal. A média de reatividade dos animais controles de cada faixa etária está indicada pela linha pontilhada preta.

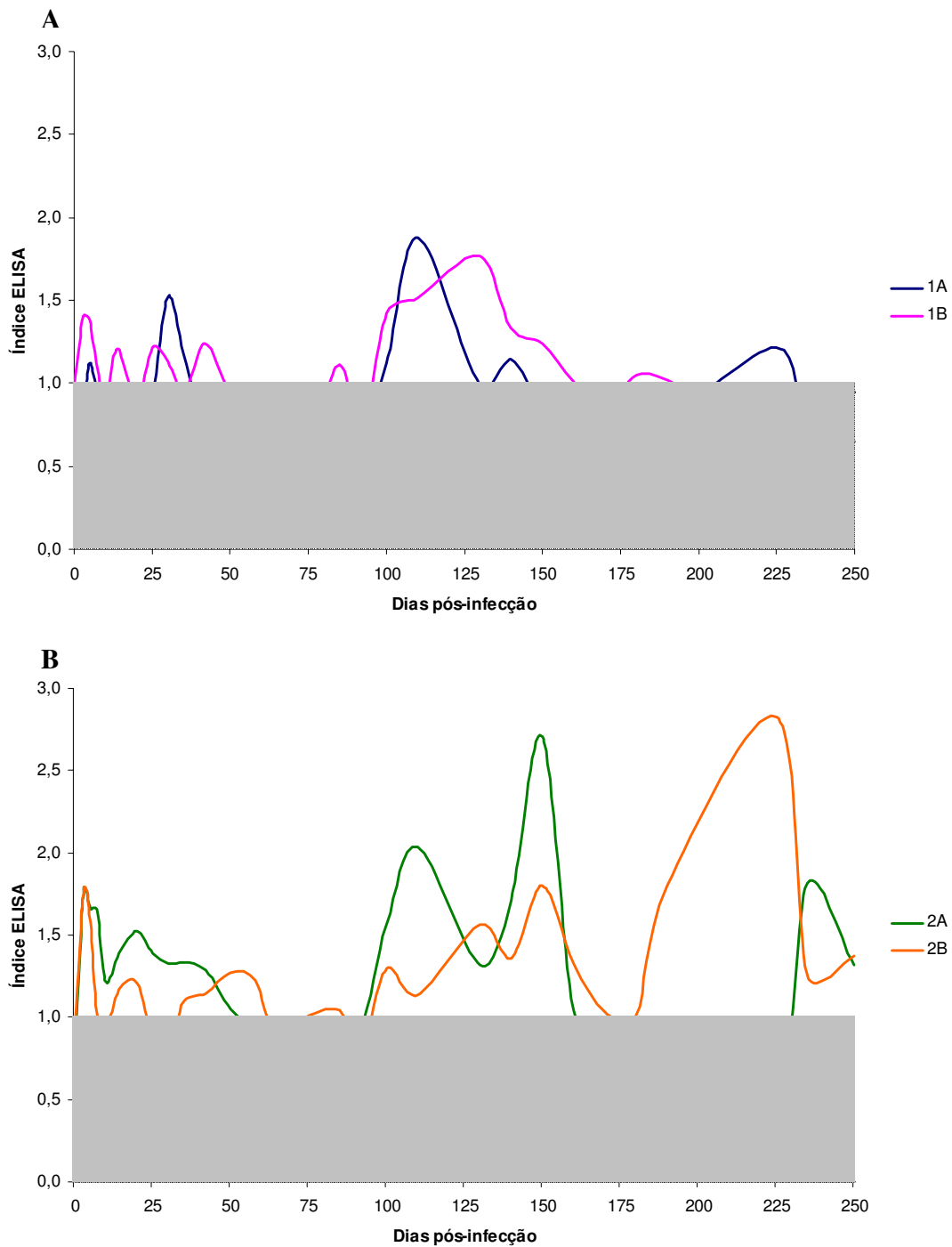


Figura 11: Cinética da detecção de anticorpos IgA específicos a *N. caninum* em amostras de soros dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA > 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

II.2.3. Anticorpos IgE séricos totais e específicos

A produção de anticorpos IgE mostrou um padrão muito diverso em ambos os grupos, tanto nas dosagens de IgE total como na IgE específica a *N. caninum*. Nos ensaios que dosaram a produção de anticorpos totais, pode-se observar que o grupo G1 revelou uma tendência estável com os animais apresentando valores A/P ao redor de 0,800 durante todo período experimental, com poucas e pequenas variações nos níveis de IgE, sendo estas mais relevantes aos 42 dpi. Este padrão não foi verificado nos cães do G2, que apresentaram uma baixa reatividade inicial (2A – A/P = 0,086; 2B - A/P = 0,120), porém com uma tendência de alta nas quantidades de IgE produzidas. Além disso, houve uma grande variabilidade nas quantidades de IgE produzidas pelos animais jovens, com diversos picos observados ao longo dos 250 dias de experimento, com taxas A/P ultrapassando a marca de 0,900, no animal 2B, aos 150 dpi (Figura 12).

Analisando-se os ELISAs IgE específicos anti-*N. caninum*, pode-se constatar um padrão inverso, com maior presença de anticorpos IgE produzidos pelos cães do G1 em relação ao G2 (Figura 13). Os animais do G1 apresentaram três picos nítidos de reatividade de IgE ao parasito, sendo o primeiro entre 42 e 64 dpi, o segundo entre 100 e 110 dpi e o terceiro, entre 170 e 180 dpi. O animal 1A apresentou produção detectável maior em relação ao 1B, com seu pico máximo de produção aos 42 dpi (IE = 1,917). Já o animal 1B apresentou sua produção máxima de IgE específica aos 180 dpi, com IE = 1,583. Apesar de o cão 2B apresentar valores semelhantes ao 1A em seu pico de produção de IgE contra *N. caninum* (IE = 1,875, 50 dpi), os níveis de reatividade de IgE no G2 se mostraram inferiores no geral. Houve uma similaridade nas datas de aparecimento de anticorpos entre os grupos, com picos aos 50 e 100 dpi. O animal 2A demonstrou uma reatividade inferior ao 2B, porém com padrão similar. Adicionalmente, quando se compararam os valores obtidos nos diferentes ensaios, pode-se constatar que a curva de anticorpos parasito-específicos não altera a quantidade de IgE total.

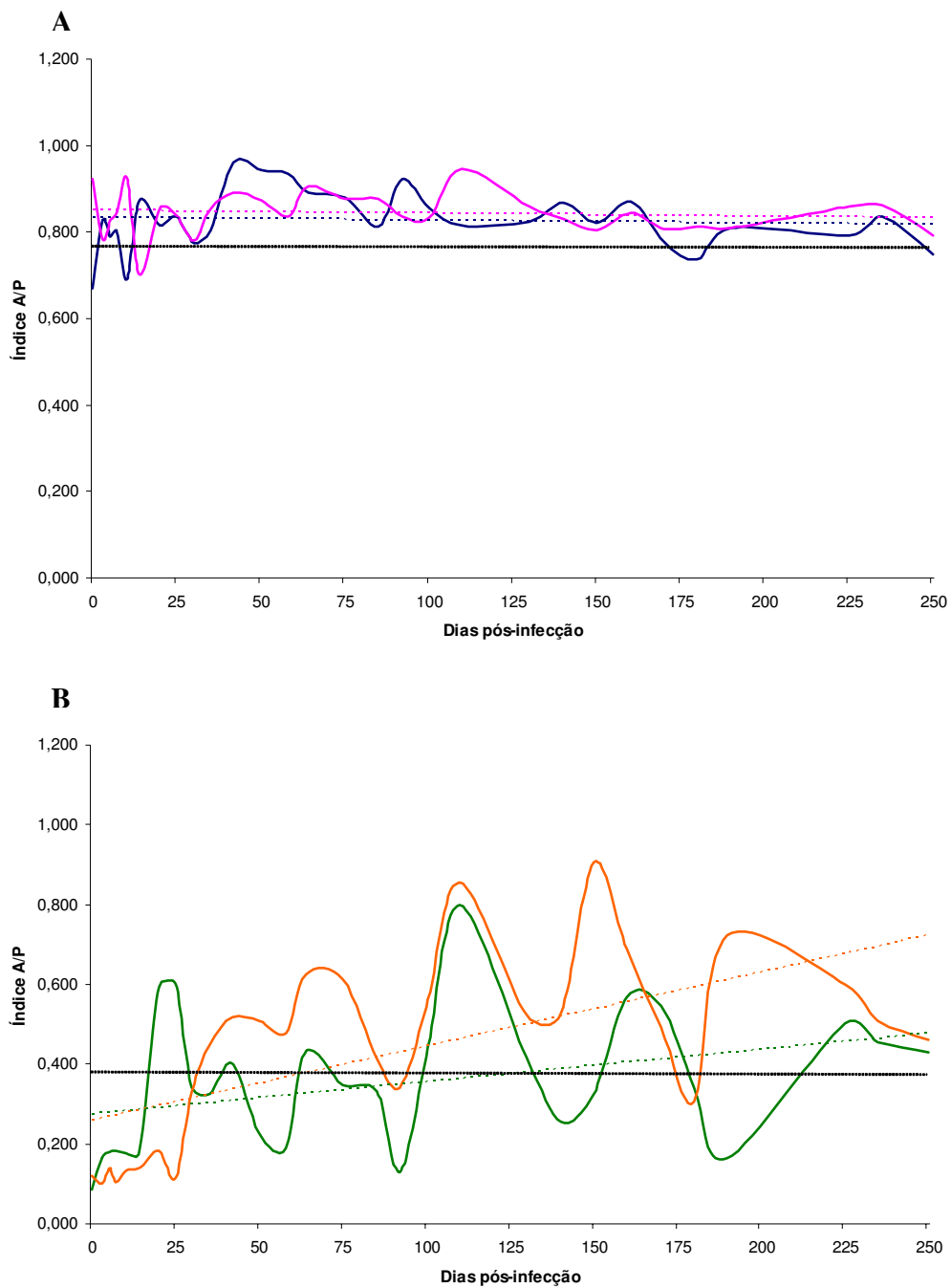


Figura 12: Cinética da detecção de anticorpos IgE séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. As linhas pontilhadas coloridas, adjacentes às curvas de anticorpos, representam a tendência linear da produção de IgE para cada animal. A média de reatividade dos animais controles de cada faixa etária está indicada pela linha pontilhada preta.

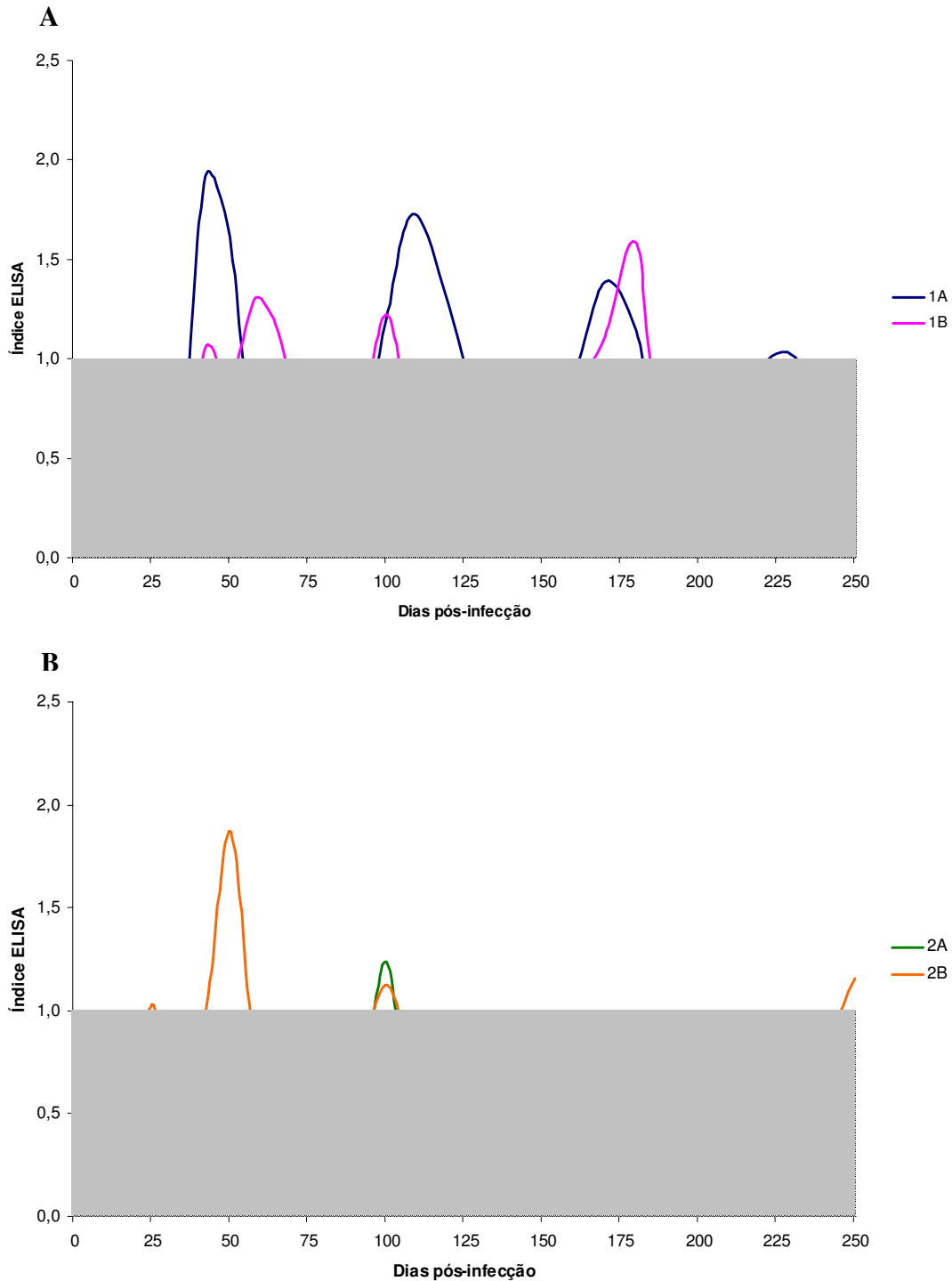


Figura 13: Cinética da detecção de anticorpos IgE específicos a *N. caninum* em amostras de soros dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA \geq 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

II.2.4. Anticorpos IgG totais e específicos

A cinética de produção total de anticorpos IgG revelou novamente uma maior tendência à estabilidade nos animais adultos e de aumento nos filhotes. Adicionalmente, os níveis de anticorpos dosados inicialmente no G1 eram, em média, mais elevados, porém os níveis tenderam a se igualarem ou serem até superados pelos animais do G2. Apesar da tendência de estabilidade, os cães do G1 apresentaram certa quantidade de variações nos primeiros 60 dias de infecção e entre os 140 e 170 dpi. De forma oposta aos animais adultos, os filhotes apresentaram instabilidade no perfil de produção de IgG. Fortes alternâncias nos níveis de anticorpos detectáveis foram observadas nos primeiros 70 dpi, e mais sutilmente entre os 130 e 180 dpi, de forma semelhante ao observado no G1 (Figura 14).

Quando anticorpos IgG específicos a *N. caninum* detectados por meio de ELISA foram analisados, observou-se que os grupos apresentaram reatividade inicial semelhante, com um rápido aparecimento de anticorpos. Porém, após os 100 dpi, os perfis observados por ambos os grupos se mostraram muito diferentes, com os cães do G2 produzindo títulos mais elevados de anticorpos, enquanto os cães do G1 se mostraram soronegativos. Os cães 1A e 1B soroconverteram aos 5 e 7 dpi, respectivamente. O animal 1A apresentou em seguida um padrão intermitente de positividade, sendo observado alguns momentos em que o animal reagia positivamente ao ensaio até os 100 dpi, não apresentando mais anticorpos detectáveis. O índice ELISA máximo alcançado por este animal foi de 1,275, aos 35 dpi. Já o animal 1B produziu um maior título de IgG específico ao parasito durante o período de experimentação. Após sua soroconversão aos 7 dpi, a quantidade de IgG mensurada pelo ensaio subiu de forma rápida, até seu pico máximo de produção aos 14 dpi (IE = 1,933). Logo após, os níveis de anticorpos começaram a declinar até os 50 dpi, quando apresentaram certa estabilidade com baixos níveis de IgG detectável até os 110 dpi, soronegativando posteriormente (Figura 15A).

Em relação aos animais pertencentes ao G2, constatou-se que o animal 2A apresentou uma maior produção de IgG específica ao parasito. Os primeiros anticorpos foram detectados aos 5 dpi e a produção permaneceu em patamares mais elevados até o 42^o dpi, quando decaíram para níveis próximos ao ponto de corte. Após os 100 dpi, o

animal voltou a apresentar níveis mais elevados de IgG, atingindo sua produção máxima aos 150 dpi (IE = 2,239). Após este pico, os níveis de anticorpos detectáveis decaíram de forma rápida e o animal apresentou resultados negativos no ensaio após os 190 dpi. O cão 2B mostrou uma cinética mais constante, com produção menor de anticorpos específicos. Após uma soroconversão rápida (3 dpi), o animal alternou períodos de negatividade e positividade até os 85 dpi, quando os níveis de IgG detectados aumentaram para seus patamares mais altos, entre 100 e 150 dpi, com pico máximo detectado de IE = 1,477 (150 dpi). Após este período, o animal voltou a apresentar níveis de IgG próximos ao ponto de corte da reação, até o fim do período experimental (Figura 15B).

Comparando os resultados do ensaio imunoenzimático àqueles obtidos pela RIFI, observa-se que o pico inicial de anticorpos IgG específicos produzidos pelo cão 1B é semelhante em ambos os ensaios, bem como os picos pós-100 dpi no G2 são comuns. Contudo, a produção inicial de anticorpos do cão 2A mensurada pelo ELISA não é detectada pela imunofluorescência. De forma inversa, o período onde os anticorpos inicialmente produzidos pelo animal 2B são detectados pela RIFI, corresponde a um período de soronegatividade do cão pelo ELISA. Corroborando com a discordância das técnicas, todos os animais apresentaram IgG específicas contra *N. caninum* por RIFI até o fim do experimento, enquanto que pelo ELISA, apenas o animal 2B ainda foi positivo no ensaio até os 250 dpi.

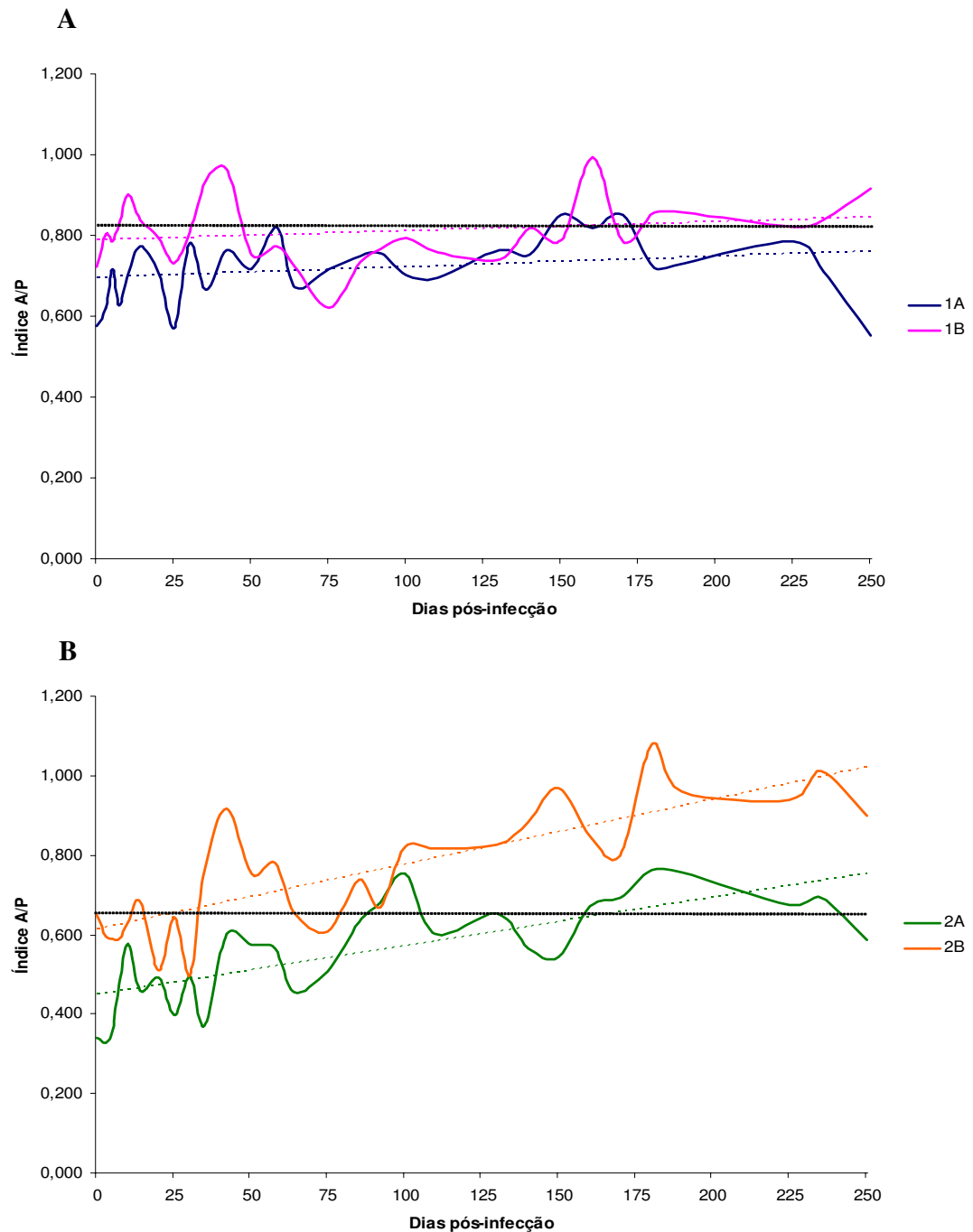


Figura 14: Cinética da detecção de anticorpos IgG séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. As linhas pontilhadas coloridas, adjacentes às curvas de anticorpos, representam a tendência linear da produção de IgG para cada animal. A média de reatividade dos animais controles de cada faixa etária está indicada pela linha pontilhada preta.

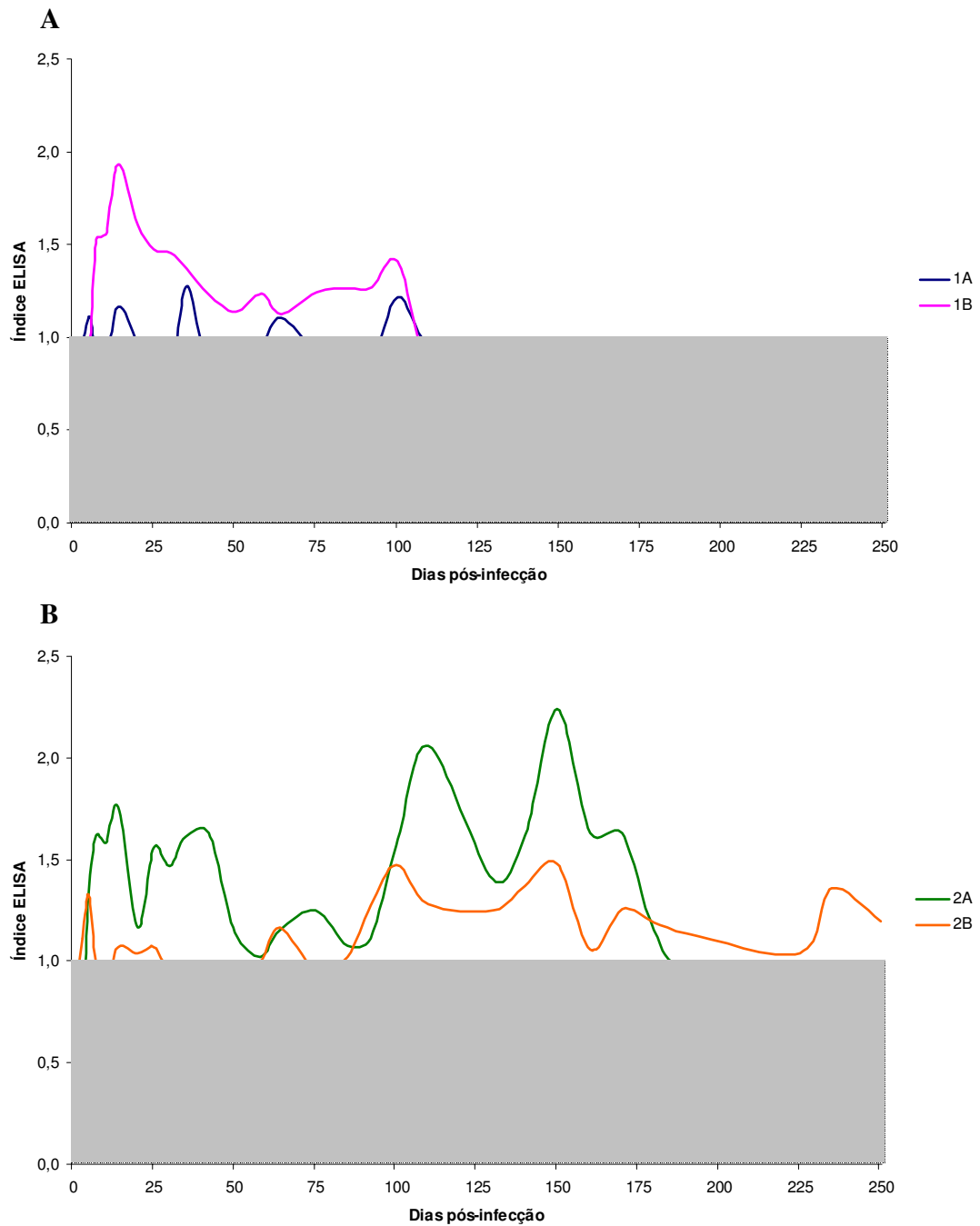


Figura 15: Cinética da detecção de anticorpos IgG específicos a *N. caninum* em amostras de soro dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA $>$ 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

II.2.5. Subclasses de IgG totais e específicas

Quando a produção de IgG foi analisada individualmente por meio de cada subclasse, pode-se constatar diferentes elementos que podem ser importantes na explicação dos perfis de produção de IgG detectada anteriormente. No perfil da cinética da subclasse IgG₁, pode-se constatar novamente uma tendência maior a estabilidade no G1 em relação ao G2, uma vez que os níveis de anticorpos apresentados no início do experimento foram semelhantes aos observados após 250 dias (Figura 16A). Em relação à produção de IgG₁ específica a *N. caninum*, constata-se que houve uma resposta significativa desta subclasse, principalmente pelo animal 1A. Este cão apresentou sua soroconversão aos 42 dpi, mantendo quantidades mais elevadas e constantes de anticorpos detectáveis até o fim do período experimental. Pode-se inferir também que alguns picos de produção de IgG₁ observados apresentaram reflexos diretos no ELISA-IgG, similar aos 100 dpi (IE = 3,290). Embora a cinética apresentada pelo animal 1B não tenha apresentado a mesma intensidade, seus perfis se mostraram semelhantes. Uma soroconversão inicial ocorreu dos 7 aos 25 dpi, de forma semelhante àquela apresentada pela RIFI-IgG e ELISA-IgG. O animal ainda produziu anticorpos desta subclasse entre os 58-85 dpi e 100-150 dpi, soronegativando posteriormente (Figura 17A).

No G2, o perfil de anticorpos de IgG₁ se mostrou muito instável inicialmente, o que pode ser observado no gráfico de anticorpos IgG séricos totais (Figura 16B). Primeiramente, os cães apresentavam níveis muito baixos de IgG₁ detectáveis, porém a produção de anticorpos subiu de forma rápida e manteve-se elevada durante o restante do experimento, com muitas oscilações. Uma destas oscilações foi nitidamente percebida no ensaio *N. caninum*-específico, quando se detectou uma altíssima produção de IgG₁ pelo animal 2A, aos 150 dpi (IE = 8,690). Porém, este foi um fato isolado, uma vez que os animais deste grupo apresentaram uma soroconversão tardia pelo ensaio (100 dpi), com baixos títulos de anticorpos produzidos até os 190 dpi (Figura 17B).

Em relação à subclasse IgG₂, observou-se uma tendência de alta da produção de anticorpos totais em ambos os grupos, sendo mais acentuada no G2 de forma concordante com os ensaios anteriormente descritos (Figura 18). Já o ensaio para IgG₂

específica apresentou uma grande instabilidade na reação com as amostras de soro ao ensaio, com alguns picos de reatividade, quando detectada. No G1, o cão 1A apresentou reatividade ao ensaio do 25º dpi em diante, com pico de produção máxima aos 42 dpi (IE = 2,153). Houve reatividade sérica em outros períodos esparsos, com maior importância após os 170 dpi, apresentando uma positividade constante do cão detectada até os 250 dpi. Quanto ao outro animal do grupo, pode-se observar uma menor reatividade ao ensaio, pois o cão 1B permaneceu a maior parte do tempo não-reactivo. Destaca-se sua soroconversão inicial, entre os dias 58 e 64 de infecção, a qual pode ter sido refletida no ELISA-IgG (Figura 19A).

A presença de anticorpos IgG₂ foi ainda menor no G2, sendo que o cão 2A apresentou apenas uma amostra acima do ponto de corte estabelecido (IE = 1,025, 50 dpi). Já o cão 2B revelou uma rápida soroconversão, apresentando seu pico de produção máxima logo aos 3 dpi (IE = 2,327). Posteriormente, entre 25-35 dpi, constatou-se uma produção de IgG₂ com perfil semelhante àquela observada pelo ensaio de imunofluorescência. Este animal voltou a reagir positivamente ao ensaio em outras três ocasiões (50-58 dpi; 85-92 dpi; 170-180 dpi), terminando o período experimental de forma positiva, com tendência de alta (Figura 19B).

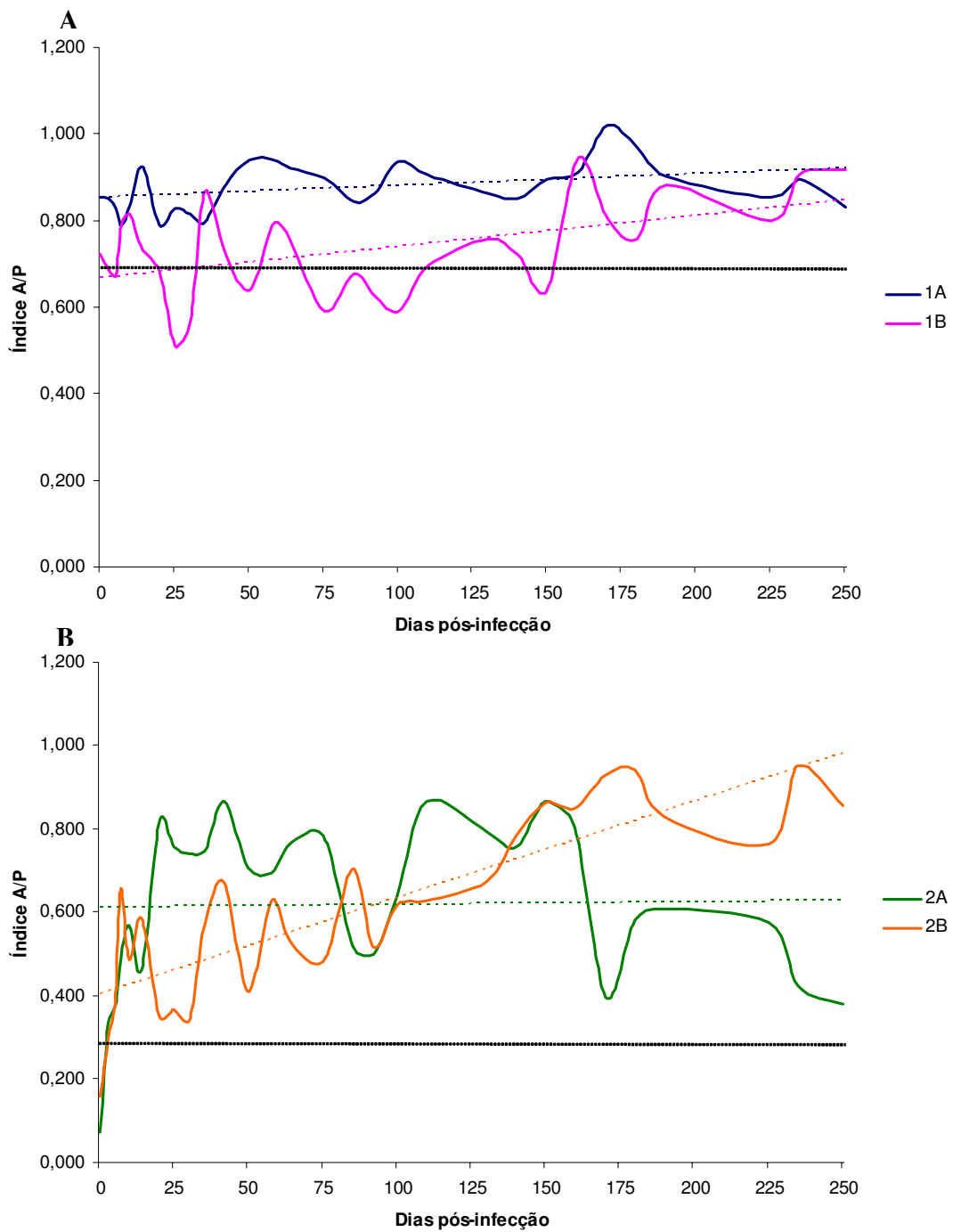


Figura 16: Cinética da detecção de anticorpos IgG₁ séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. As linhas pontilhadas coloridas, adjacentes às curvas de anticorpos, representam a tendência linear da produção de IgG₁ para cada animal. A média de reatividade dos animais controles de cada faixa etária está indicada pela linha pontilhada preta.

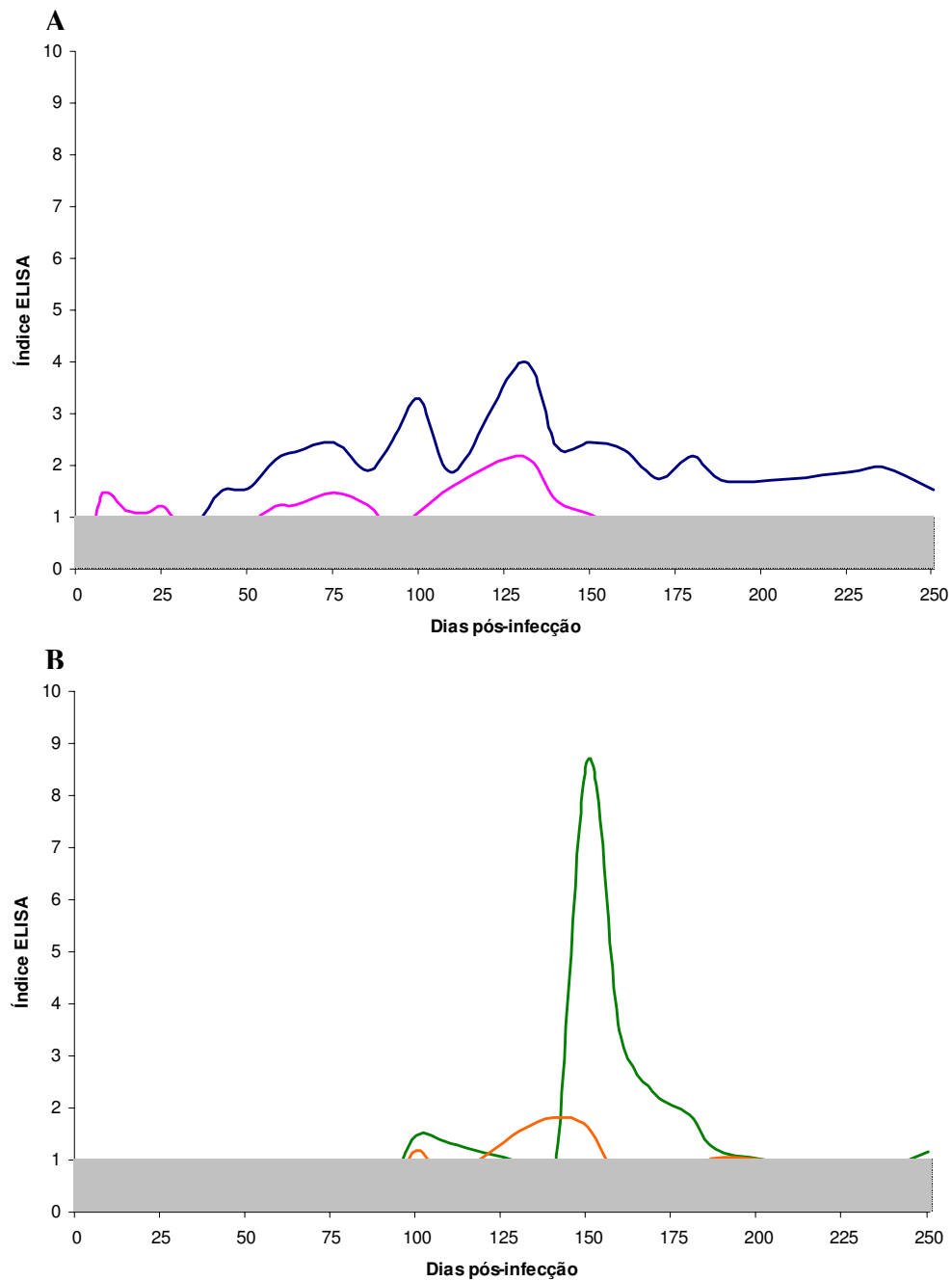


Figura 17: Cinética da detecção de anticorpos IgG₁ específicos a *N. caninum* em amostras de soro dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA > 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

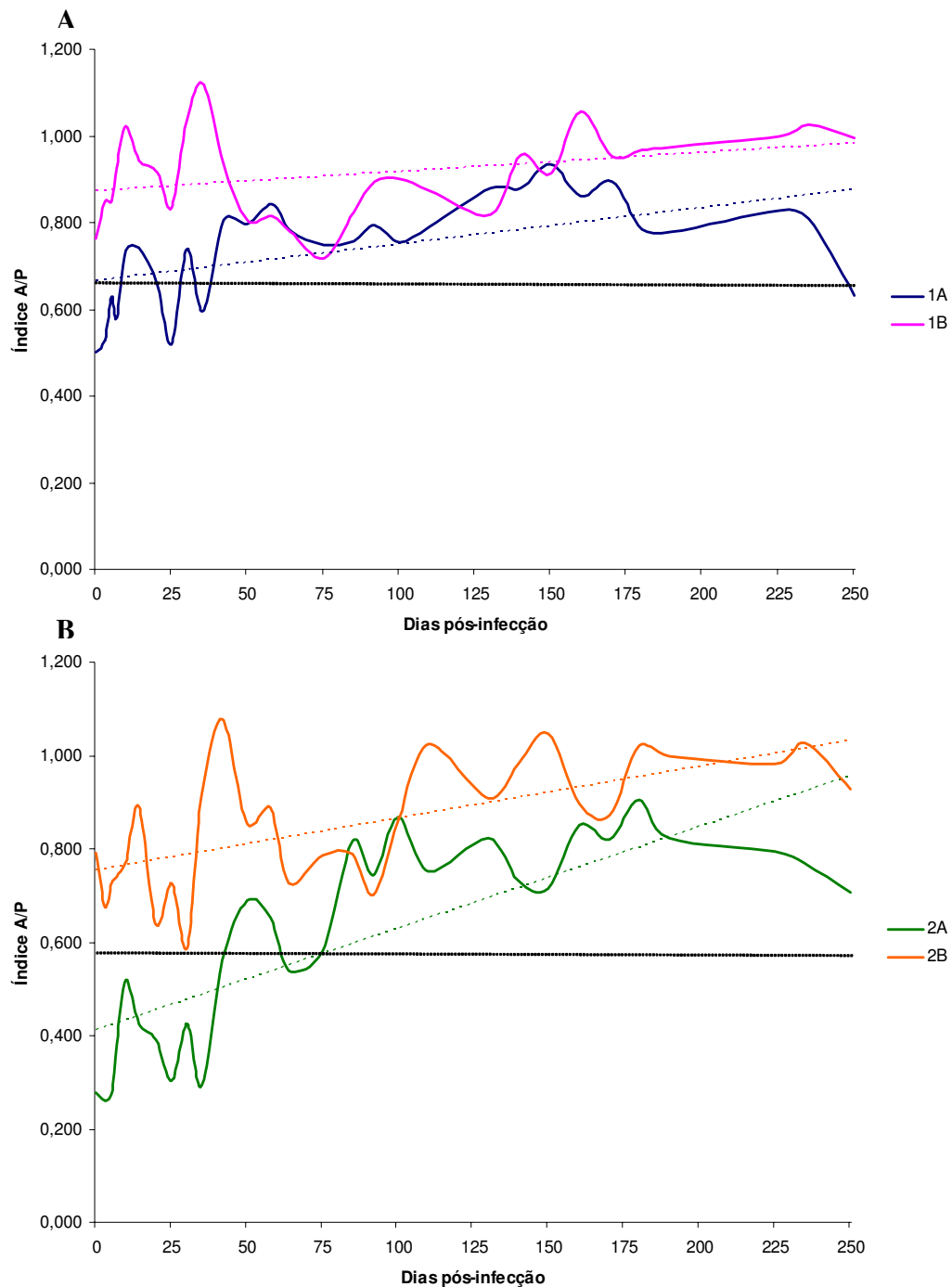


Figura 18: Cinética da detecção de anticorpos IgG₂ séricos totais produzidos pelos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. As linhas pontilhadas coloridas, adjacentes às curvas de anticorpos, representam a tendência linear da produção de IgG₂ para cada animal. A média de reatividade dos animais controles de cada faixa etária está indicada pela linha pontilhada preta.

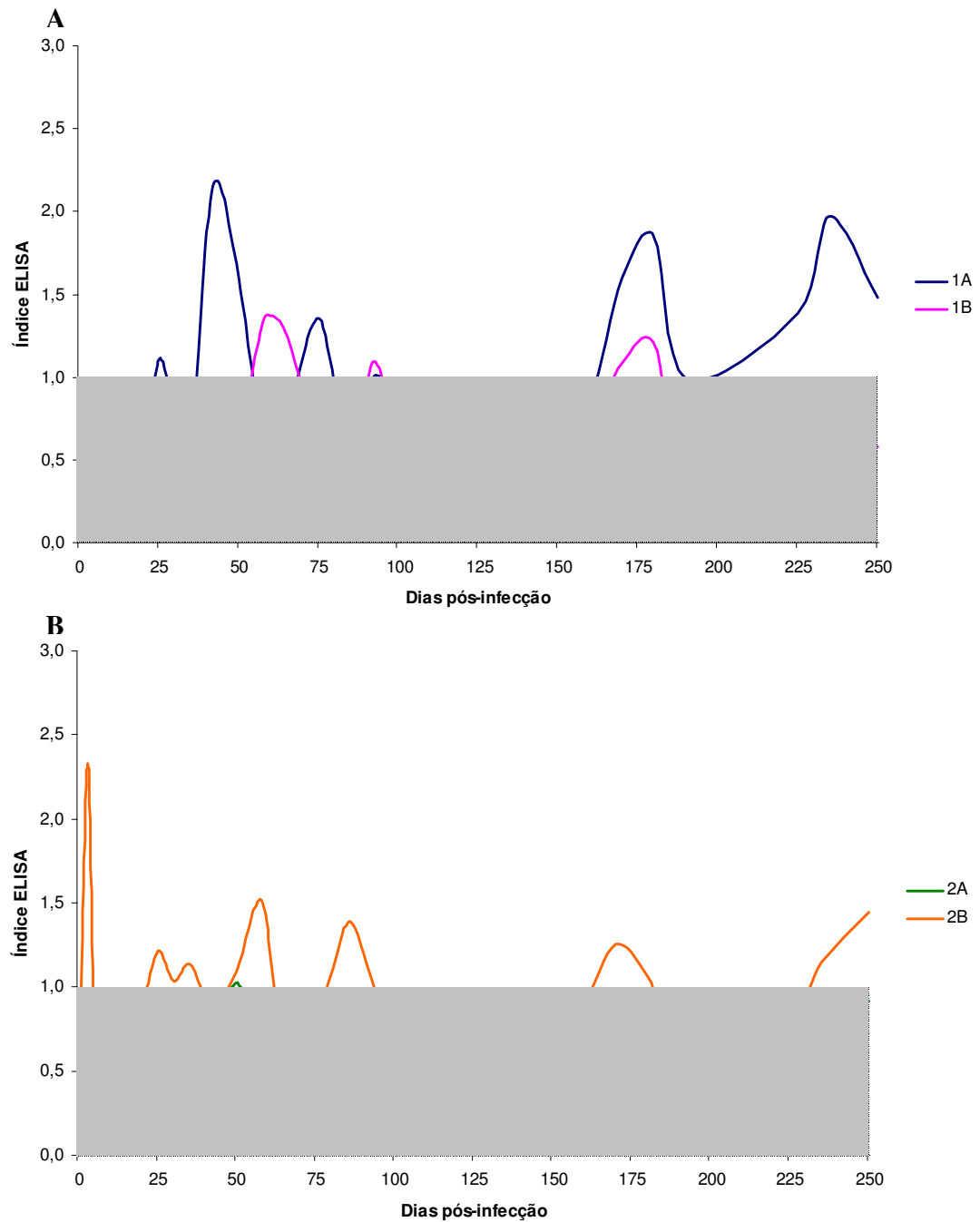


Figura 19: Cinética da detecção de anticorpos IgG₂ específicos a *N. caninum* em amostras de soro dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA > 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

A produção de IgG₃ específica a *N. caninum* mostrou características interessantes em ambos os grupos experimentais (Figura 20). No G1, apenas o animal 1B reagiu ao ensaio, sendo observado uma soroconversão aos 3 dpi em forma de pico, apresentando maiores títulos de anticorpos produzidas entre 3 e 7 dpi (IE = 2,688; 5 dpi). A cinética voltou a apresentar picos de menor intensidade (14-25 dpi; 35-75 dpi; 170-180 dpi), sendo que a titulação de anticorpos mensurada permaneceu ao redor do ponto de corte do ensaio durante quase todo o período experimental. De forma interessante, o cão 1A apresentou índices ELISA muito próximos de zero em todas as amostras analisadas. Foram observadas reatividades diferentes também entre os animais do G2, onde o cão 2A apresentou baixos índices de IgG₃ nos 60 dias iniciais de infecção e entre 110-130 dpi.

Já o animal 2B apresentou a reatividade mais forte a esta subclasse, dentre todos os animais utilizados no experimento. Seu período de soroconversão foi semelhante ao do outro animal do grupo, porém o título de anticorpo mensurado foi muito superior e prolongado, uma vez que o animal permaneceu positivo durante os 250 dpi. O maior índice encontrado nas amostras deste cão foi aos 50 dpi (IE = 6,053), mas vale a pena destacar uma forte queda nos níveis de anticorpos entre 58-100 dpi, quando a produção de IgG₃ voltou a índices elevados. Ressalta-se que o pico de anticorpos apresentado ao redor do 25º dpi possa também ser indicado como um dos prováveis responsáveis pelo pico de positividade apresentado por este animal na RIFI-IgG.

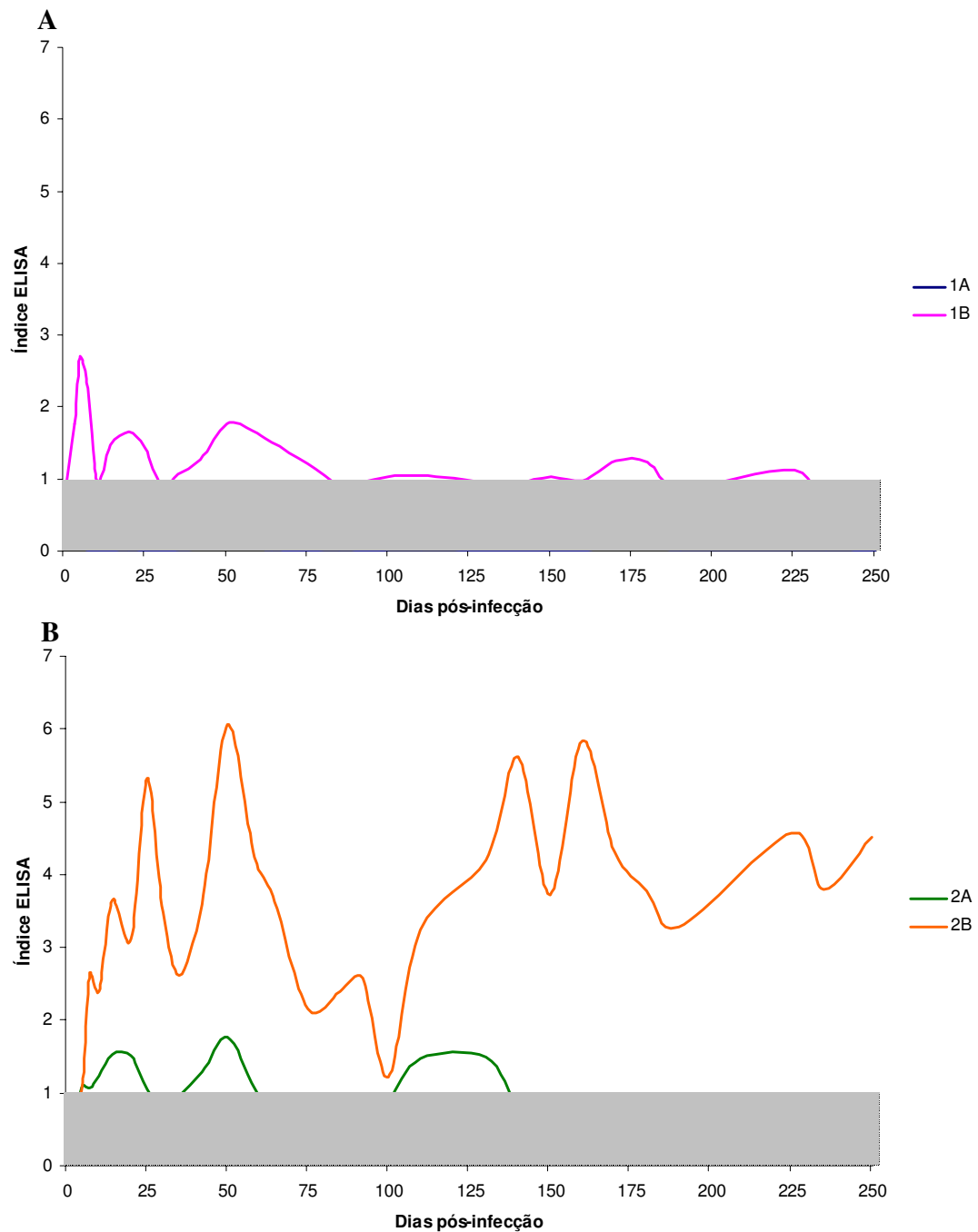


Figura 20: Cinética da detecção de anticorpos IgG₃ específicos a *N. caninum* em amostras de soro dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA > 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

Em relação à produção de IgG₄ específica a *N. caninum* pode-se notar diferenças marcantes entre ambos os grupos experimentais. No grupo constituído pelos animais adultos, a reatividade ao ensaio foi praticamente nula, em termos de amostras reativas, bem como em relação aos índices ELISA observados (Figura 21A). O animal 1A apresentou reatividade sorológica ao ensaio em apenas uma data de coleta (64 dpi) com índice ELISA igual a 1,108. Já o cão 1B apresentou anticorpos logo no 3º dpi (IE = 1,144), voltando a apresentar positividade no 20º dpi (IE = 1,064), não apresentando nova reatividade ao ensaio.

Já no grupo dos animais jovens, observou-se grande semelhança da cinética detectada para IgG₄ em relação ao perfil gerado pelo ensaio ELISA-IgG (Figura 21B). O cão 2A reagiu primeiramente ao ensaio no 3º dpi, voltando a se mostrar positivo entre 20-30 dpi. Porém, a maior produção da subclasse IgG₄ ocorreu entre 110 e 170 dpi, com índices ELISA superando o valor 4 (IE = 4,630, 140 dpi). O cão ainda apresentou outro pico de anticorpo, com menor intensidade entre 190 e 225 dpi, se mostrando negativo ao final do período experimental. Quanto ao animal 2B, pode-se observar o início de reatividade mais tardia em relação ao cão 2A, ocorrendo aos 25 dpi. O animal voltou a reagir positivamente ao ensaio entre 75-85 dpi, porém os índices mais elevados de produção de IgG₄ foram encontrados entre 130 e 190, com pico máximo aos 150 dpi (IE = 2,459). O animal terminou o experimento reagindo negativamente ao ensaio.

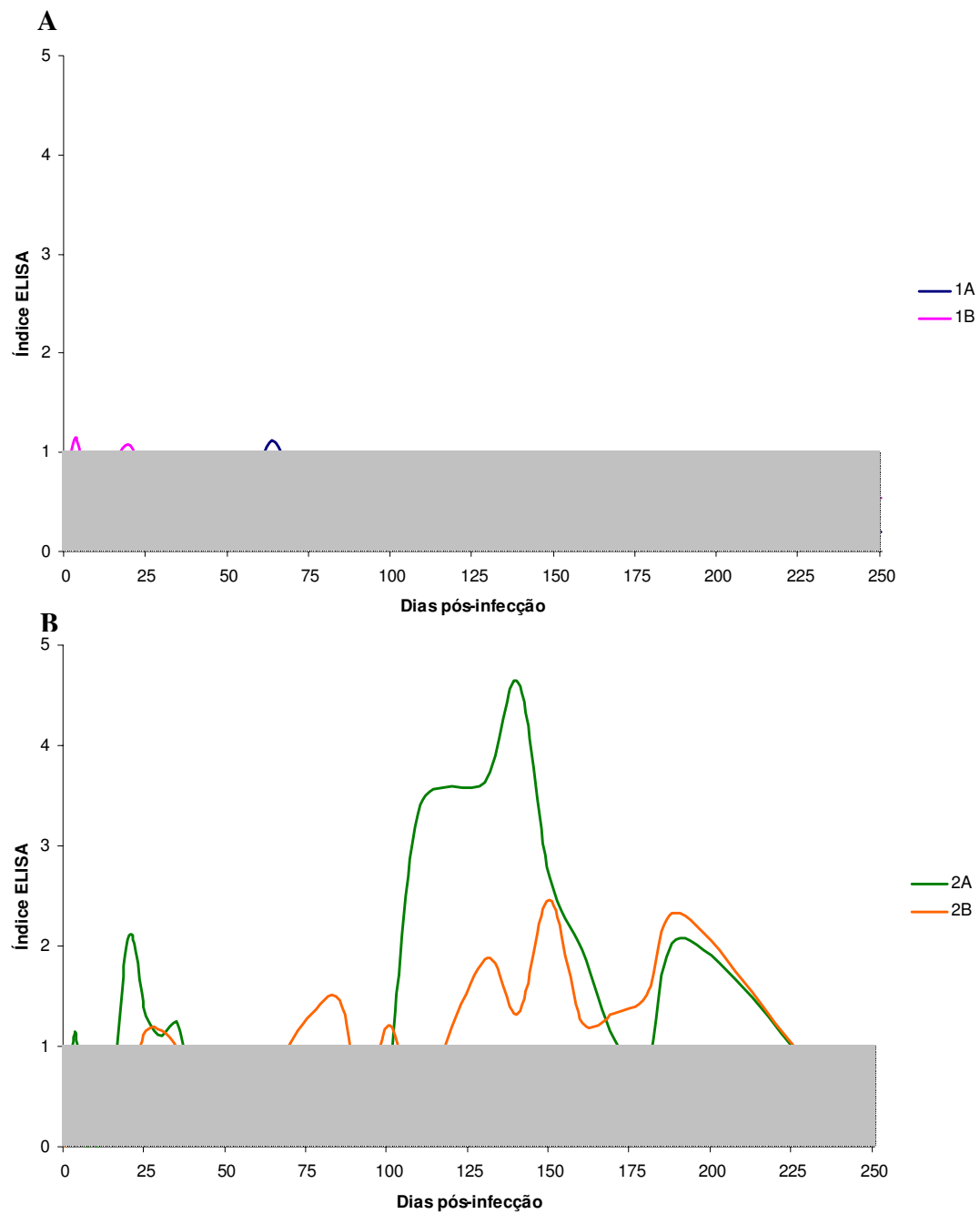


Figura 21: Cinética da detecção de anticorpos IgG₄ específicos a *N. caninum* e, amostras de soros dos cães dos grupos G1 (A) e G2 (B), por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA > 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

II.2.6. Reconhecimento antigênico por anticorpos IgG específicos

Observam-se perfis de reconhecimento antigênico muito diferentes entre os animais analisados por WB (Tabela 7). Primeiramente, constata-se que antígenos com pesos moleculares de 75 e 68 kDa foram reconhecidos por todos os animais do experimento, sendo que o reconhecimento da banda de 68 kDa foi imunodominante. As demais bandas antigênicas foram marcadas pelo WB realizados nos cães foram: 1A, 1B e 2B – 80 kDa; 1A, 2A e 2B – 35 kDa; 1B e 2B – 56 kDa; 1A – 64 kDa; 2A – 51 kDa; e 2B – 38 kDa. De modo geral, o G2 apresentou um reconhecimento mais prolongado do AgNc imobilizado na membrana de nitrocelulose. O animal 2B apresentou uma reatividade a um maior número de bandas, bem como reconheceu os antígenos por mais tempo, principalmente os de 38 e 35 kDa, apresentando reatividade desde o 5º dpi, juntamente com a soroconversão no ELISA-IgG, até o fim do experimento. As demais bandas antigênicas começaram a ser reconhecidas somente após os 140 dpi. Os demais animais apresentaram uma reatividade tardia ao ensaio, reconhecendo antígenos somente após os 35 dpi. Quanto ao outro animal do G2, o cão 2A apresentou uma menor reatividade em relação ao número de bandas reconhecidas, sendo a reatividade ao ensaio iniciada aos 42 dpi, com o reconhecimento da banda de 68 kDa, banda esta reconhecida até os 250 dpi. As demais bandas detectadas pelo ensaio apareceram após os 160 dpi e permaneceram presentes até o fim do experimento. Em relação aos animais do G1, ambos apresentaram uma marcação fraca às bandas antigênicas, porém com características diferentes. O cão 1A apresentou a primeira marcação no 35º dpi, reagindo às bandas de 68 e 64 kDa, antígenos estes reconhecidos até os 150 dpi. Entre os 92 e 110 dpi, este animal apresentou marcação em três bandas adicionais, com pesos moleculares estimados em 80, 75 e 35 kDa. Já o cão 1B foi o último animal a revelar reatividade aos antígenos parasitários, iniciando o reconhecimento apenas aos 92 dpi. Adicionalmente, a intensidade das bandas mostrou-se fraca, sendo que algumas só foram visualizadas com o uso do sistema de fotodocumentação. Desta forma, pode-se constatar que o animal demonstrou reatividade a quatro diferentes bandas do 92º ao 250º dpi, com exceção do antígeno de 80 kDa, que não foi visualizada com a amostra de 250 dpi.

II.3. Discussão

De um modo geral, os cães demonstraram baixas concentrações de anticorpos específicos detectados por todas as técnicas realizadas neste estudo, sendo alguns detectados de forma fugaz. Anticorpos IgM e IgG anti-*N. caninum* tornaram-se reativos tardiamente pelas RIFIs, porém demonstraram reatividade mais uniforme e prolongada quando comparado ao ELISA para as mesmas classes de anticorpos, onde estas foram detectadas precocemente. Os animais do G2 se mostraram mais reativos tanto para IgM como para IgG em ambos os ensaios. A produção de IgG₁ e IgA anti-*N. caninum* mostraram maior reatividade nos cães do G1 e G2, respectivamente, onde os níveis de IgA específicos se mostraram detectáveis em ambos os grupos, porém com um incremento importante pós-85 dpi. Já os níveis de IgG₁ anti-*N. caninum* se mostraram constantemente presentes no G1, porém praticamente ausentes no G2 durante o período experimental.

Anticorpos das classes IgG₂ e IgE específicos foram detectados de modo associado em picos ocasionais, com maior frequência e intensidade no G1. Analisando as concentrações de IgG₃ e IgG₄, notou-se maior reatividade dos animais do G2 em relação ao G1, porém a produção destes anticorpos foi marcada pela alta variabilidade entre os animais analisados. Por meio de WB, as proteínas do AgNc começaram a ser reconhecidas tardiamente por IgG produzidas pelo cães infectados, com exceção do cão 2B, cujo soro reagiu de forma positiva a proteínas de 35 e 38 kDa durante quase todo período experimental. A positividade a proteínas de baixo peso molecular, como as quais o soro do animal jovem se mostrou reagente, foi demonstrada de maneira fraca pelos demais animais, sendo a maior reatividade observada para proteínas com peso molecular acima de 68 kDa em todos os animais.

Em relação à proteção conferida pela imunidade humoral neste modelo de infecção, pode-se afirmar que a ativação de linfócitos B em hospedeiros infectados com protozoários se encontra envolvida em dois padrões distintos de mecanismos: proteção contra o patógeno ou evasão imune do microorganismo. A cinética da resposta imune humoral produzida pelos cães infectados oralmente neste experimento refletem a modulação negativa inicial demonstrada nos experimentos de fenotipagem da resposta

imune celular. A baixa produção de anticorpos com perfil Th1 (principalmente IgM e IgG, por meio das subclasses IgG₁, IgG₃ e IgG₄), e picos de produção de anticorpos com perfil Th2 (IgA, IgG₂ e IgE), demonstram um perfil misto de resposta imune frente ao protozoário. Tais resultados podem ser comparados a camundongos geneticamente deficientes de células CD4⁺ experimentalmente infectados com *T. gondii*, os quais se apresentaram susceptíveis a infecção ao protozoário principalmente pela ausência de subclasses de IgG relacionadas ao perfil Th1 de resposta (JOHNSON;SAYLES, 2002).

Na infecção por *N. caninum*, as células B apresentam importância vital para os animais, uma vez que camundongos geneticamente deficientes apresentam altas taxas de mortalidade pós-desafio com o parasito (EPERON et al., 1999; AMMANN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Entretanto, o papel dos anticorpos produzidos contra o parasito não está claro, uma vez que altas concentrações séricas de diferentes classes de anticorpos são incapazes de controlar a infecção (INNES et al., 2002). As diferentes classes de anticorpos apresentam características distintas quanto a sua produção e participação nas respostas imunes induzidas por agentes infecciosos. Na infecção por *N. caninum*, a transferência de anticorpos específicos a camundongos apresentando falhas de produção de IFN γ é capaz de reverter o quadro de susceptibilidade (TEIXEIRA et al., 2005). Neste sentido, as alterações nos níveis de anticorpos, relacionados aos diferentes padrões de imunidade, refletem diretamente o perfil de produção de citocinas durante a infecção por *N. caninum* em camundongos (HEMPHILL et al., 2006).

Enquanto anticorpos IgM específicos se mostram como importantes marcadores de infecção aguda em diversos modelos experimentais, por ser a primeira classe de anticorpos sintetizada, os anticorpos IgG são considerados duradouros e de importante papel na imunidade contra agentes intracelulares, participando de sua neutralização no ambiente extracelular (JANEWAY et al., 2005). A presença de anticorpos IgM e IgG anti-*N. caninum* são descritos em vários relatos contidos na literatura (DUBEY et al., 1991; MINEO et al., 2001;2006; BARTLEY et al., 2004; RETTINGER et al., 2004). Bovinos apresentam alta conversão sorológica frente ao desafio com o protozoário, conforme demonstrado no bezerro experimentalmente infectado neste estudo, porém variações individuais não refletem riscos de abortamento, sendo somente possível a

verificação do padrão de avidéz, que indica se o rebanho sofre com a transmissão vertical ou horizontal do parasito (INNES et al., 2002; MINEO et al., 2006). Em cães, diversos trabalhos apresentam falha na produção de IgG anti-*N. caninum* após infecção primária, sendo que a soroconversão pode variar de 3 semanas a mais de 400 dias (GONDIM et al., 2002; McALLISTER et al., 1998; SCHARES et al., 2001). Quanto as suas subclasses, poucos grupos de pesquisa possuem os anticorpos monoclonais para sua detecção, limitando o número de informações disponíveis. Estima-se que as subclasses IgG₁, IgG₃ e IgG₄ sejam reflexos de um padrão Th1 de resposta celular, enquanto que IgG₂ seja o representante do padrão Th2, divergindo assim dos camundongos, que apresentam tendência inversa em relação a IgG₁ e IgG₂ (MAZZA et al., 1994). O perfil de produção das subclasses de IgG na infecção por *L. chagasi* em cães demonstra que todas se mostram presentes durante todo o período de análise (aproximadamente 500 dias), entretanto, aquelas com perfil Th1 são mais predominantes (QUINNELL et al., 2003).

A produção de IgA está correlacionada à estimulação antigênica do MALT, sendo assim um importante marcador da infecção oral por diversos microorganismos, como demonstrado neste trabalho, com modelos de infecção de cães por meio de carnivorismo. Em camundongos, maiores concentrações séricas e intestinais são observados em animais infectados com taquizoítas pela via gástrica em detrimento as vias parenterais comumente utilizadas (TEIXEIRA et al., 2007). Contudo, a produção de IgA sérica anti-*N. caninum* pode ser detectada através da infecção transplacentária, conforme demonstrado em fetos de primatas não-humanos abortados devido à infecção experimental pelo parasito (BARR et al., 1994). Além disso, bovinos naturalmente infectados pelo protozoário produzem sIgA contra isomerase protéica dissulfídica, encontrada em antígenos excretados-secretados de *N. caninum*, configurando este como um alvo potencial para tentativas de quimioterapia contra a infecção (LIAO et al., 2006). Quanto à IgE, seu papel durante a infecção por *N. caninum* ainda é obscuro. Sabe-se que bovinos apresentam esta classe de anticorpos contra o protozoário (SHIN et al., 2005), porém a cinética de sua produção nestes animais não é conhecida. Como demonstramos nos cães infectados deste experimento, a presença de IgE específica se mostra fugaz e sem valor de diagnóstico. De forma contrária, a detecção de IgE anti-*T.*

gondii é apontada como um dos métodos mais precisos de diagnóstico da infecção aguda humana (KODYM et al., 2007).

As informações contidas neste trabalho indicam as dificuldades encontradas no sorodiagnóstico da infecção por *N. caninum* em cães. Técnicas sorológicas com ampla utilização em outros modelos de infecção no próprio cão se mostram discordantes quanto à positividade das amostras de cães sabidamente infectados pelo protozoário. As médias das concentrações de anticorpos detectados se mostraram baixas na maioria dos ensaios realizados, e muito tardios quando realizados por meio de RIFI e WB. Os resultados obtidos neste trabalho discordam totalmente de afirmações prévias, em que se considerou a RIFI como técnica de referência para o diagnóstico da infecção em cães (BJÖRKMAN;UGGLA, 1999). Observa-se que o ELISA se mostrou mais sensível para a detecção dos isotipos anti-*N. caninum* específicos, principalmente na fase aguda da infecção. Nesta linha, HECKEROTH e TENTER (2007) demonstraram um fraco reconhecimento antigênico de cães infectados por via transplacentária, sendo que os filhotes acometidos pela doença clínica apresentavam as menores reatividades no ensaio de WB de duas dimensões. Contrariamente, o reconhecimento antigênico em bovinos se mostra abundante, além de várias classes de anticorpos reagirem de forma sinérgica aos mesmos antígenos (SHIN et al., 2004;2005), o que facilita a busca por alvos antigênicos.

Em relação às técnicas de ELISA, o uso de AgNc como agente sensibilizador deve ser interpretado de forma crítica. Homologias entre antígenos de alto peso molecular de parasitos do mesmo filo resultam em reatividade sorológica cruzada (SILVA et al., 2007). Deste modo, os pontos de corte dos ensaios imunoenzimáticos baseados em antígenos solúveis devem ser padronizados com o intuito de processar amostras de rotina, utilizando soros sabidamente negativos e positivos para os diferentes protozoários. Além disso, pode-se constatar que a detecção de IgG é comprometida em animais jovens, uma vez que a produção específica deste isotipo é principalmente limitada às subclasses IgG₃ e IgG₄, de baixas concentrações séricas. Diferentemente, todas as subclasses de IgG foram detectadas de forma abundante em soros de cães infectados por *L. chagasi*, utilizando ensaios imunoenzimáticos com os mesmos anticorpos monoclonais (QUINNELL et al., 2003). Estas constatações podem

elucidar parcialmente a ausência de reatividade de soros de canídeos em ensaios utilizando Proteína A como conjugado, a qual pode estar relacionada às subclasses de IgG induzidas durante a infecção por *N. caninum* nestes animais, diferentemente do que se observa para *T. gondii*, onde o uso do conjugado de afinidade se mostrou mais eficaz em comparação aos anticorpos homólogos e heterólogos (SILVA et al., 2005). A busca por anticorpos das classes IgM e IgA podem auxiliar de forma importante o diagnóstico de infecções recentes por *N. caninum*, porém o uso destes ensaios concomitantemente seria ideal. Para se aperfeiçoar a detecção de anticorpos IgM na infecção canina por *T. gondii*, ensaios baseados em sistema de captura e utilizando conjugados anti-IgM humana foram desenvolvidos e se mostraram mais eficazes do que as técnicas convencionais (SILVA et al., 2002).

CAPÍTULO III

Fenotipagem de linfócitos T de sangue periférico e células dos linfonodos poplíteos de cães inoculados com tecidos infectados por *N. caninum*

III.1. MATERIAL E MÉTODOS

III.1.1. Imunofenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de linfonodos poplíteos por citometria de fluxo

III.1.1.1. Obtenção do antígeno solúvel de taquizoítas de N. caninum

O AgNc foi preparado a partir de taquizoítas derivados de cultivo celular. Os taquizoítas coletados foram lavados 2 vezes em PBS, por centrifugação a 600 x g, durante 10 minutos. O sedimento de parasitos foi ressuspenso em 1 ml de PBS estéril e submetido a 10 ciclos de congelamento a -80 °C e descongelamento em banho-maria a 37 °C. Logo após a suspensão foi centrifugada a 15000 x g durante 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína determinada pelo kit "BCA Protein Assay". O AgNc foi então armazenado em freezer -80°C, em alíquotas de 100 µl até o momento do uso.

III.1.1.2. Estimulação de células de linfonodos poplíteos in vitro

Os linfonodos poplíteos dos cães do G1 e G2, além dos dois animais adultos controles, foram retirados por meio de ato cirúrgico aos 30 dpi, sendo os animais mantidos em analgesia e em condições assépticas. Após a excisão, uma parte dos linfonodos foi macerado em PBS estéril e centrifugado por 10 minutos, 600 x g, a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10 ml de PBS estéril, e submetido à nova lavagem. A separação dos linfócitos foi realizada por meio de gradiente de densidade com Histopaque 1077, na proporção de 1:1 com PBS estéril, sendo centrifugados a 400 x g, por 30 minutos, a 4°C. A fração contendo os linfócitos foi retirada e aproximadamente 1 x 10⁶ células foram adicionados nos poços de uma placa de cultivo celular, que continham meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e submetidos a três tratamentos distintos: 1.) sem estímulo exógeno (Meio – controle negativo); 2.) estimulados com ConA (2,5 µg/ml), uma lectina que se apresenta como potente mitógeno de células T (controle positivo); e 3.) com adição de AgNc (25 µg/ml), para se observar as respostas antígeno-específicas. Os linfócitos foram cultivados por 72 horas, a 37 °C, com injeção constante de 5% de CO₂.

III.1.1.3. Determinação das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico e linfonodos poplíteos

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência direta para a tipificação e quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em sangue total e nos linfócitos extraídos dos linfonodos, por meio de ensaios de citometria de fluxo. Para a determinação sanguínea, duas alíquotas de 100µl de sangue periférico por animal foram colhidas com EDTA nos dias 0, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 100, 140 e 200 dpi, sendo colocadas em tubos próprios para citometria de fluxo, logo após a colheita. Quanto aos linfócitos cultivados *in vitro*, 1x10⁶ células/amostras/estímulo em duplicata foram lavadas duas vezes com PBS, para retirada do meio de cultura, e ressuspendidas em 100µl de PBS estéril. Uma das alíquotas foi incubada com 1µl do reagente comercial que consiste em dois anticorpos monoclonais: IgG2a de rato anti-CD4 canino (FITC) e IgG1 de rato anti-CD8 canino (PE). A outra alíquota serviu como controle isotípico negativo da reação, com a finalidade de eliminar fluorescências inespecíficas no momento da leitura. Os anticorpos monoclonais utilizados para esta finalidade foram IgG2a de rato anti-hapteno de dinitrofenil (FITC) e IgG1 de rato anti-hapteno de dinitrofenil (PE). A incubação dos anticorpos foi realizada durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras de sangue foram submetidas à lise de hemácias utilizando-se 2ml do tampão “FACS Lysing Solution” na diluição de uso, por 4 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após verificação da lise das hemácias, adicionou-se 2ml de PBS e centrifugou-se os tubos a 300 x g por 10 minutos a 4°C. As amostras advindas do cultivo celular não tiveram a necessidade de serem submetidas à hemólise. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o botão de células ressuspendido em 2 ml de PBS, para novo ciclo de centrifugação. O protocolo de lavagem das células marcadas foi realizado por quatro vezes para todos os ensaios, com o intuito de eliminar anticorpos não ligados. Após as lavagens, o botão de células foi ressuspendido em 300µl de PBS adicionado de 1% de formaldeído, para a conservação da reação até o momento de sua leitura, que foi realizada até 72 horas para que se obtenham resultados fidedignos. As preparações celulares foram analisadas em citômetro de fluxo (10.000 eventos por amostra). A seleção das subpopulações celulares encontradas nas diferentes amostras analisadas foi possível por meio de protocolos de aquisição pré-estabelecidos (BYRNE

et al., 2000). Brevemente, as células analisadas foram dispostas em um gráfico de tamanho por granulosidade, onde os linfócitos foram selecionados (Figura 22A), sendo possível assim analisar a marcação específica pelos fluorocromos FITC e PE, por meio do número de células marcadas em relação ao total adquirido (Porcentagem – Figura 22B) ou através da mediana do número de marcações fluorescentes por célula (Expressão – Figura 22C). Para se obter valores que associassem a porcentagem de células marcadas com a expressão dos marcadores analisados, foi estabelecido o Índice de produção de CD4⁺ e CD8⁺, onde se multiplicou os valores de porcentagem e expressão de cada amostra analisada. A análise das amostras foi realizada por meio de software e expressas por meio de média dos valores obtidos para cada grupo. As populações de células foram compensadas a fim de evitar a interferência do canal de fluorescência FITC no canal de fluorescência PE e vice-versa.

III.1.1.4. Índices de normalidade calculados para a porcentagem, expressão e Índice de produção de células T CD4⁺ e CD8⁺

A porcentagem, expressão e Índice de produção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes na circulação sanguínea de animais não infectados foram determinados com a intenção de se estabelecer faixas de normalidade para os parâmetros analisados. Com este objetivo, foram realizadas 20 leituras dos grupos controles adultos e de filhotes. No grupo dos animais adultos controles, foram feitas 10 reações de citometria para cada animal, com amostras colhidas em datas diferentes. Quanto aos filhotes controles, realizaram-se duas reações em dias diferentes, de cada um dos 10 animais disponíveis. Com os valores obtidos em cada grupo, realizou-se uma média das 20 leituras para cada parâmetro, e obteve-se o desvio padrão. A faixa de normalidade foi estabelecida pelo intervalo entre a adição e subtração de um desvio padrão sobre a média obtida (Tabela 7).

III.1.2. Imunofenotipagem de células contidas em linfonodos poplíteos por imunoistoquímica

Cortes parafinados dos linfonodos poplíteos de cada animal foram submetidos à incubação com um painel de anticorpos monoclonais, com o intuito de se observar o

perfil de imunomarcaco de células positivas para CD3, CD79, CD163, MHC de classe II, iNOS, TGF β_1 e para as imunoglobulinas IgG $_1$, IgG $_2$, IgM, IgA e IgE. O protocolo utilizado para estas reaces foi semelhante a aquele empregado para a deteco de parasitos nos tecidos do bezerro e ovos embrionados infectados por *N. caninum* (conforme descrito no capítulo anterior). Como controles negativos da reaco, foram utilizados os linfonodos poplíteos dos cães controles adultos. Os resultados foram obtidos pela leitura das lâminas utilizando-se microscópio óptico com uma objetiva contendo um retículo quadriculado, conforme previamente descrito (CASTRO et al., 2004). Os valores foram expressos pela média da contagem de cinco campos aleatórios por lâmina para cada anticorpo primário utilizado, por grupo de animais analisados. A média de células marcadas por grupo foi então multiplicada pelo valor 30,86, correspondente ao cálculo de correo do retículo, sendo assim possível expressar os valores em células marcadas por milímetros cúbicos. Exceo feita para a marcao por CD79, em que se atribuiu escores para as marcaes levando-se em conta a intensidade de marcao.

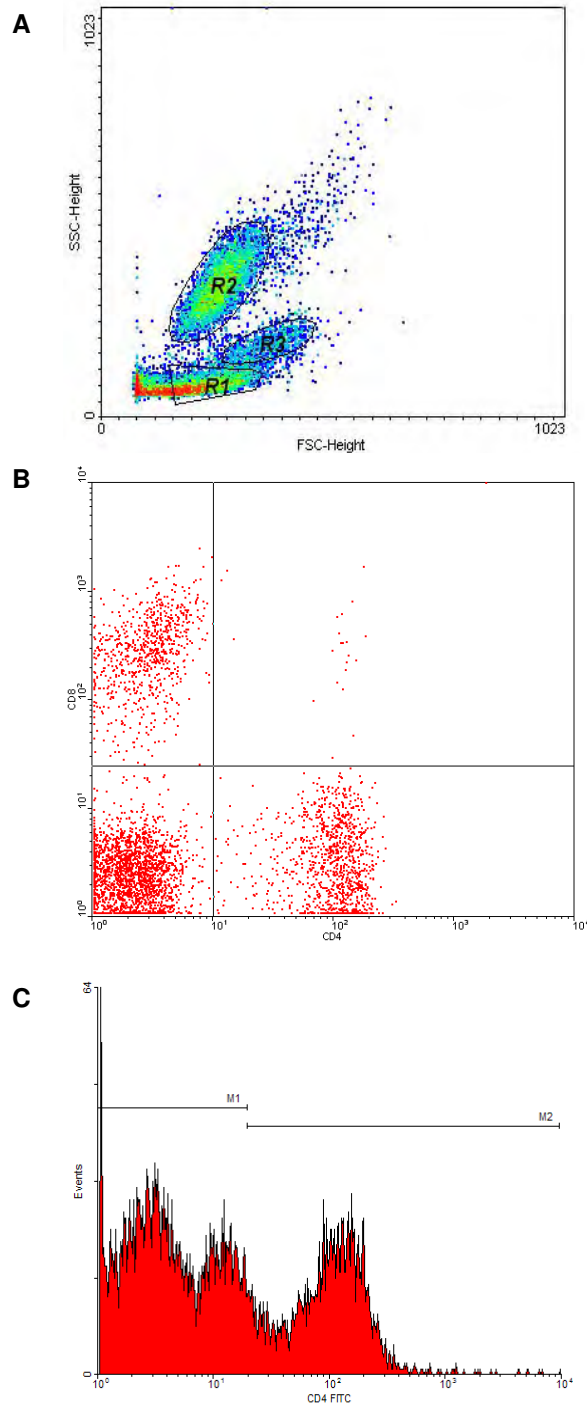


Figura 22: Demonstração da análise de amostras de PBMC no aparelho de citometria de fluxo. Primeiramente, analisada por meio de um gráfico de tamanho por granulosidade das células (A), onde R1 são linfócitos, R2 são neutrófilos e R3 monócitos. A partir da seleção de R1, podem-se analisar as amostras pelo cálculo de porcentagem (B) ou intensidade (C) de marcação.

Tabela 7: Faixas de normalidade para porcentagem, expressão e Índice de produção de CD4+ e CD8+ calculados a partir de amostras de PBMC de animais não infectados.

Parâmetro	Célula T	Adultos			Filhotes		
		Média	DP	Intervalo	Média	DP	Intervalo
Porcentagem	CD4	27,57	8,42	19,15 – 35,98	16,77	8,17	8,60 – 24,94
	CD8	13,35	5,14	8,21 – 18,49	11,73	6,39	5,34 – 18,12
Expressão	CD4	36,76	7,09	29,67 – 43,85	42,76	16,37	26,39 – 59,13
	CD8	34,24	10,23	24,01 – 44,47	59,16	22,50	36,66 – 81,66
Índice de produção ($\times 10^3$)	CD4	1,014	0,060	0,954 – 1,074	0,717	0,134	0,583 – 0,851
	CD8	0,457	0,053	0,404 – 0,510	0,694	0,144	0,550 – 0,838

III.2. RESULTADOS

III.2.1. Imunofenotipagem de linfócitos T por citometria de fluxo

Analisou-se a percentagem de linfócitos com a presença de marcadores CD4 e CD8 nos linfonodos poplíteos, além da proliferação destes linfócitos frente a estímulos (Figura 23A). Pode-se constatar que a porcentagem de linfócitos CD4⁺/CD8⁻ nos linfonodos dos cães pertencentes ao G2 se mostrou maior em relação ao G1, enquanto que as quantidades de células CD4⁻/CD8⁺ foi ligeiramente superior no grupo dos animais adultos. Ambos os grupos apresentaram uma elevação digna de nota nas contagens de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ quando comparados aos animais controles. Quando as células foram analisadas frente a estímulos, observa-se uma fraca proliferação positiva dos linfócitos CD4⁺ de ambos os grupos quando estimuladas com AgNc.

Quanto à expressão de moléculas de CD4 e CD8 (Figura 23B), notou-se uma uniformidade no número de células CD4⁺ e CD8⁺ nas amostras dos cães do G1 e G2, porém constatou-se novamente que ambos os grupos apresentavam quantidades de marcadores bastante elevados quando comparados aos animais controles. Células submetidas a diferentes estímulos não apresentaram grandes diferenças de expressão dos marcadores analisados, com exceção das células CD8⁺ submetidas à incubação com ConA, as quais apresentaram 2,5 vezes mais moléculas de CD8 em relação àquelas cultivadas sem estímulos exógenos. Os dados fornecidos pelo índice de produção de ambos marcadores (Figura 23C) ressaltaram as diferenças previamente descritas demonstrando que os cães do G2 produziram maiores quantidades de CD4, enquanto que os animais pertencentes ao G1 apresentaram maior produção de moléculas de CD8, além de confirmar menores volumes de ambos marcadores em células advindas de animais não infectados.

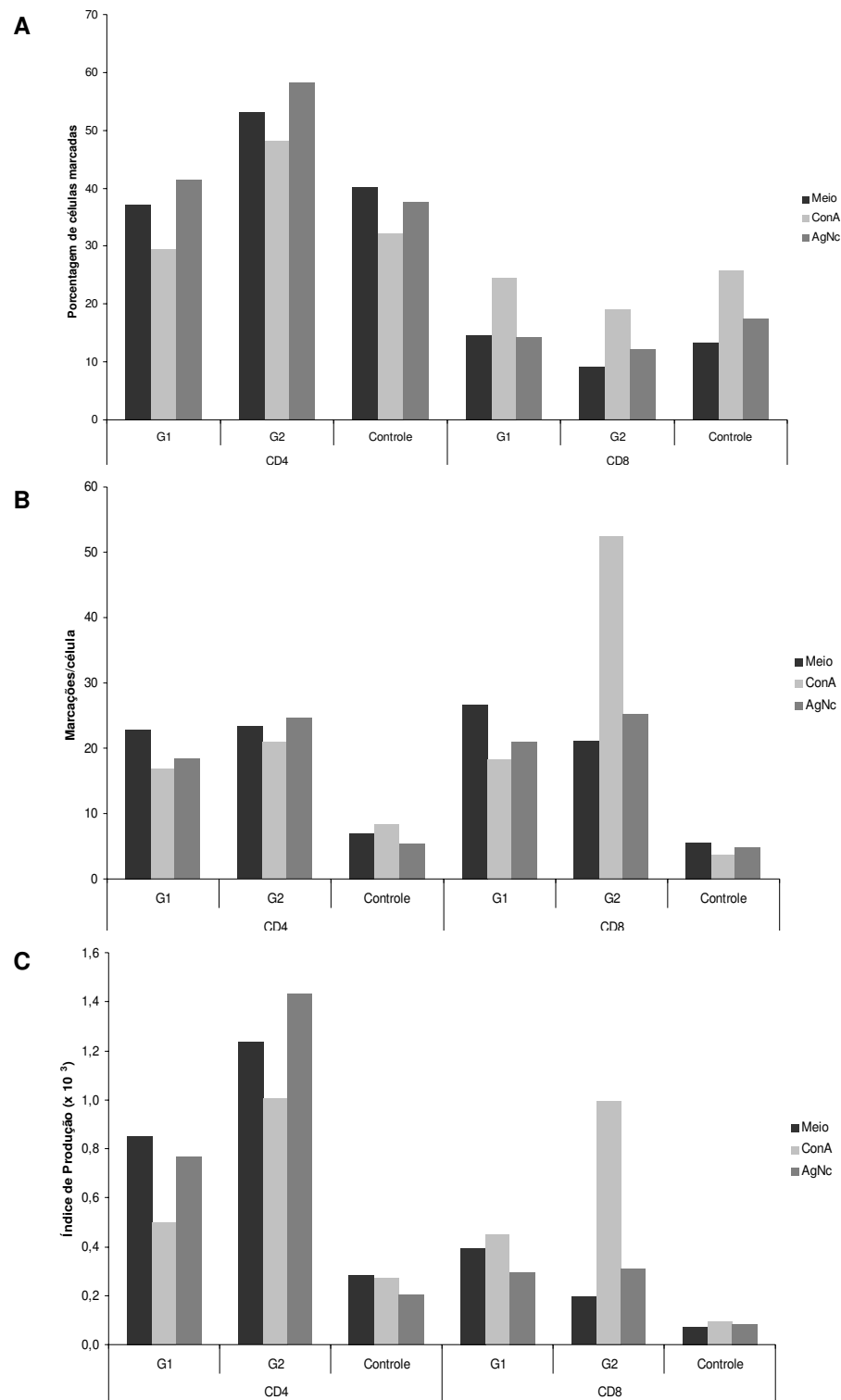


Figura 23: Porcentagem (A), expressão (B) e Índice de produção (C) de CD4 e CD8 em células advindas de linfonodos poplíteos dos cães do G1, G2 e controles frente à estimulação com meio de cultura, ConA e AgNc.

A reação de citometria de fluxo para a fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ sanguíneos revelou uma variação importante dentre os grupos na quantificação de cada um dos fenótipos de linfócitos circulantes. Enquanto os animais do G1 apresentaram algumas variações positivas, pode-se observar que os cães do G2 apresentaram um maior aumento das contagens de células T CD4⁺ (Figura 24A). Este aumento foi mais acentuado dentro dos primeiros 20 dias de infecção, porém as contagens mantiveram sua tendência de alta durante todo o período experimental, mantendo-se acima da faixa de normalidade estipulada. É importante ressaltar que ambos os grupos apresentaram altas nas porcentagens de marcação para CD4 entre 60 e 120 dpi. Em relação à expressão de CD4, pode-se observar que os dois grupos de cães infectados apresentaram oscilações durante o período experimental, sendo observadas quedas nas quantidades de marcadores nos dias 7 e 60 dpi, este último sendo seguido de picos de expressão em ambos os grupos (Figura 24B). Estes resultados puderam ser melhores visualizados pela associação dos parâmetros, observando-se que as quantidades de CD4 produzidas foram maiores no grupo G2, porém evidenciou-se que os animais apresentaram um forte decréscimo na produção deste marcador especialmente aos 7 dpi (Figura 24C). Por meio do índice de produção de CD4 pode-se observar adicionalmente que houve um forte aumento nos níveis desta molécula a partir dos 60 dpi e que os animais do G2 apresentaram maiores quantidades deste marcador linfocitário.

As cinéticas da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ circulantes (Figura 25A) revelaram que os animais do G1 apresentaram um aumento nas contagens durante os primeiros 30 dpi em relação aos cães do G2, apesar de se manterem dentro da faixa de normalidade estabelecida. Foi observado também que todos os animais analisados apresentaram quedas no número de células marcadas entre 30 e 60 dpi e posterior elevação nas contagens entre 60 e 140 dpi. Quando as amostras obtidas dos cães do G1 e G2 foram submetidas à análise de expressão deste marcador, observou-se que ambos os grupos apresentaram fortes quedas na quantidade de marcadores por células nos dias 7 e 60 dpi, de forma semelhante à descrita para CD4 (Figura 25B). Também de forma semelhante, observou-se um pico de expressão de CD8 após os 60 dpi. Adicionalmente, foi constatado que os animais do G1 apresentaram maiores quantidade

de CD8 expressos, quando comparados ao G2, fato este que se demonstrou mais evidente quando a produção desta molécula foi avaliada (Figura 25C). Notou-se que os animais do G2 sofreram uma forte redução de produção de CD8 nas primeiras semanas de experimentação, com os menores níveis sendo observados novamente aos 60 dpi, quando ambos os grupos demonstraram um forte aumento de produção desta molécula, sendo que o G1 demonstrou níveis mais elevados durante os 250 dias de análise.

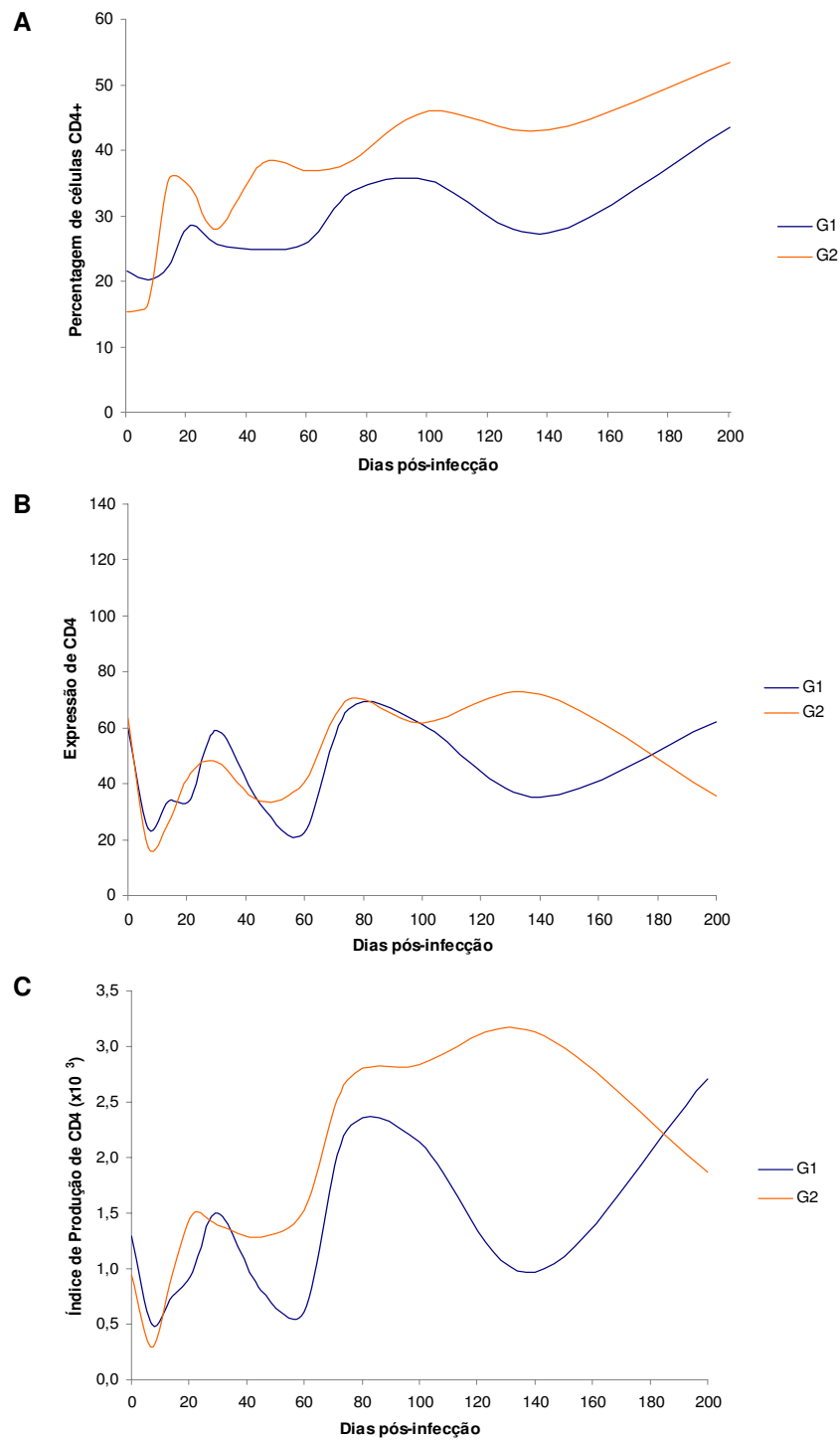


Figura 24: Cinética da porcentagem (A), expressão (B) e índice de produção (C) de células T CD4+ em PBMC dos cães pertencentes ao G1 e G2.

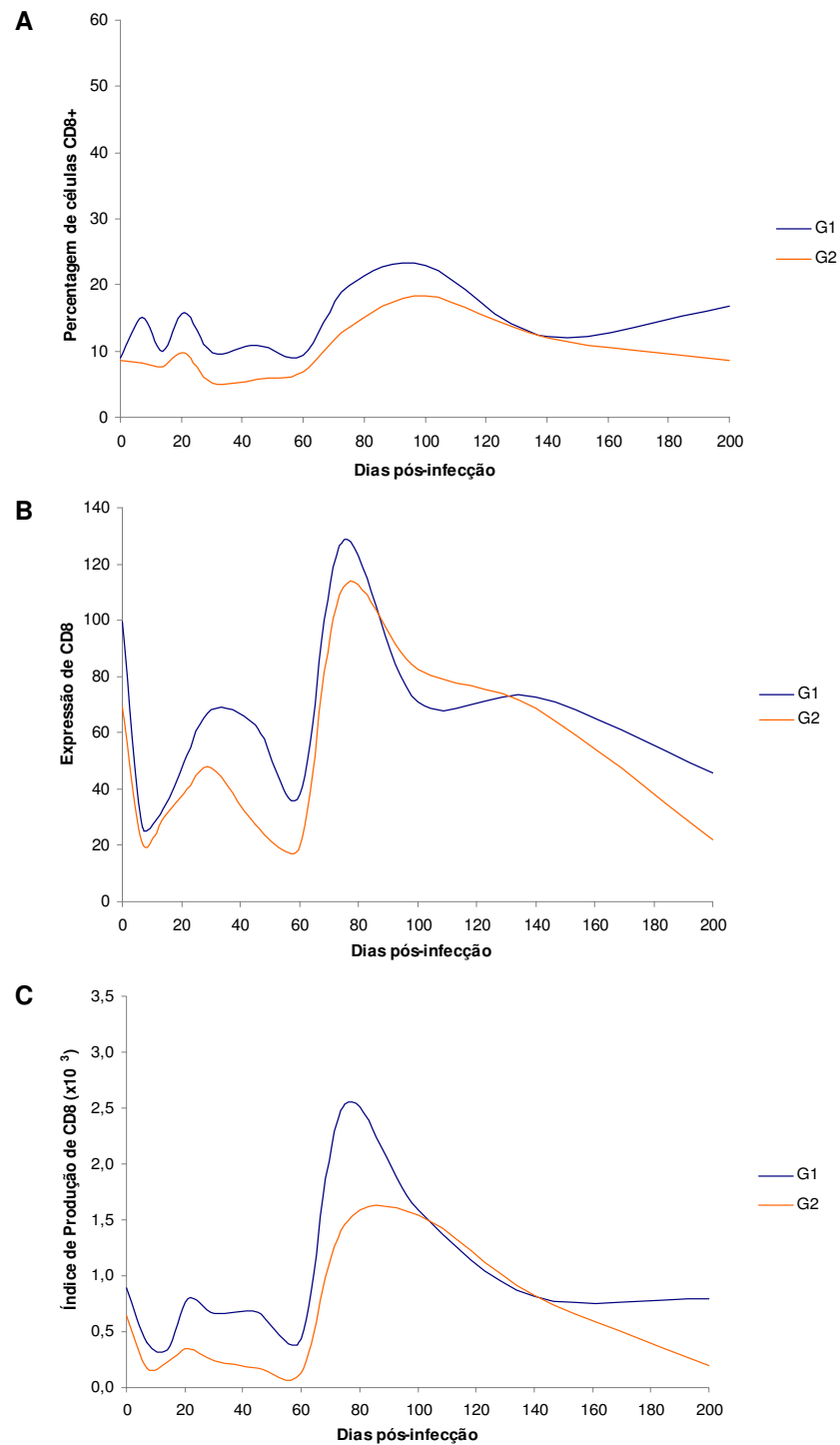


Figura 25: Cinética da porcentagem (A), expressão (B) e índice de produção (C) de células T CD8+ em PBMC dos cães pertencentes ao G1 e G2

III.2.2. Imunofenotipagem por imunoistoquímica

Através de ensaios de imunoistoquímica nos linfonodos poplíteos excisados dos cães dos grupos G1 e G2, observou-se que a intensidade das alterações foi maior nos linfonodos dos animais jovens, sendo que os valores obtidos para os animais adultos se mostraram sempre próximos aos dos animais controles. As contagens de CD3 revelam que as quantidades de linfócitos T permaneceram inalteradas nos animais infectados, quando comparados aos animais controles do experimento (Figura 26). Contudo, o número de células positivas para MHC de classe II nos linfonodos dos animais do G1 e, principalmente, G2 apresentaram-se inferior ao dos animais não infectados, apesar da marcação das células dos animais jovens ter se mostrado mais intensa do que a dos demais grupos (Figura 27). Diferentemente, os linfonodos dos cães do G2 demonstraram uma maior imunomarcação para CD163 e iNOS, enquanto que os animais do G1 demonstraram uma menor imunomarcação em relação aos controles. De forma interessante, observou-se um maior número de células imunomarcadas para $TGF\beta_1$ no G1, ao passo que os demais animais analisados neste experimento apresentaram contagens semelhantes.

Quando os linfonodos foram observados frente à imunomarcação para linfócitos B e diversas classes de anticorpos, observou-se que não houve diferenças entre as quantidades de células positivas para CD79, marcador de células B, em todos os animais analisados (dados não mostrados). Em relação aos anticorpos, constatou-se novamente que as maiores diferenças foram encontradas para o G2, que demonstraram maiores quantidades de células marcadas para IgA, porém se mostraram menos reativos para IgM e IgG₁, quando comparados aos animais controles e do G1. Os níveis de IgG₂ e IgE se mostraram estáveis em todos os grupos de cães analisados (Figura 28).

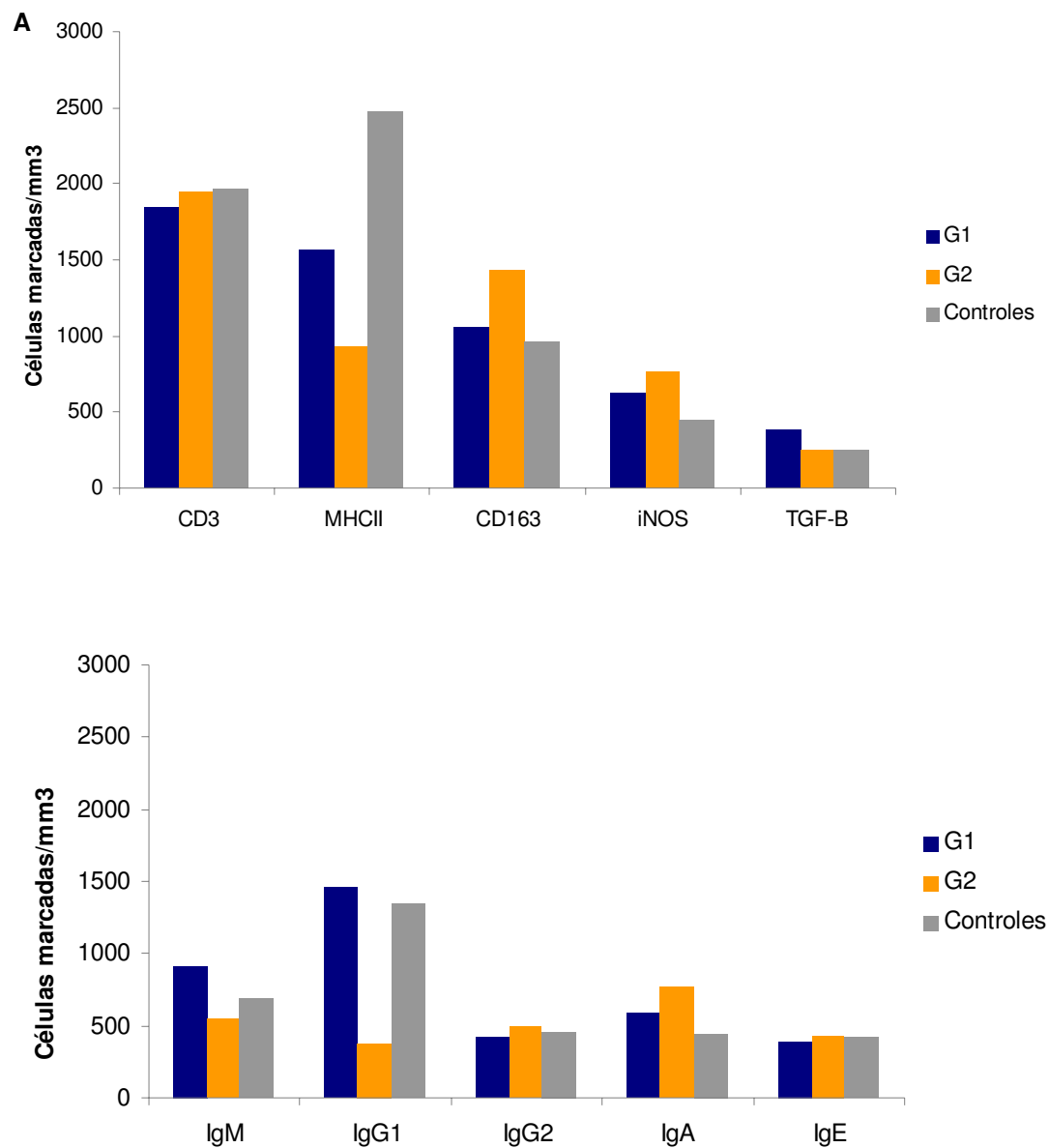


Figura 26: Contagens de marcadores celulares (A) e anticorpos (B) associados à membrana, revelados por imunistoquímica em cortes de linfonodos poplíteos dos animais pertencentes ao G1, G2 e controles. (A)

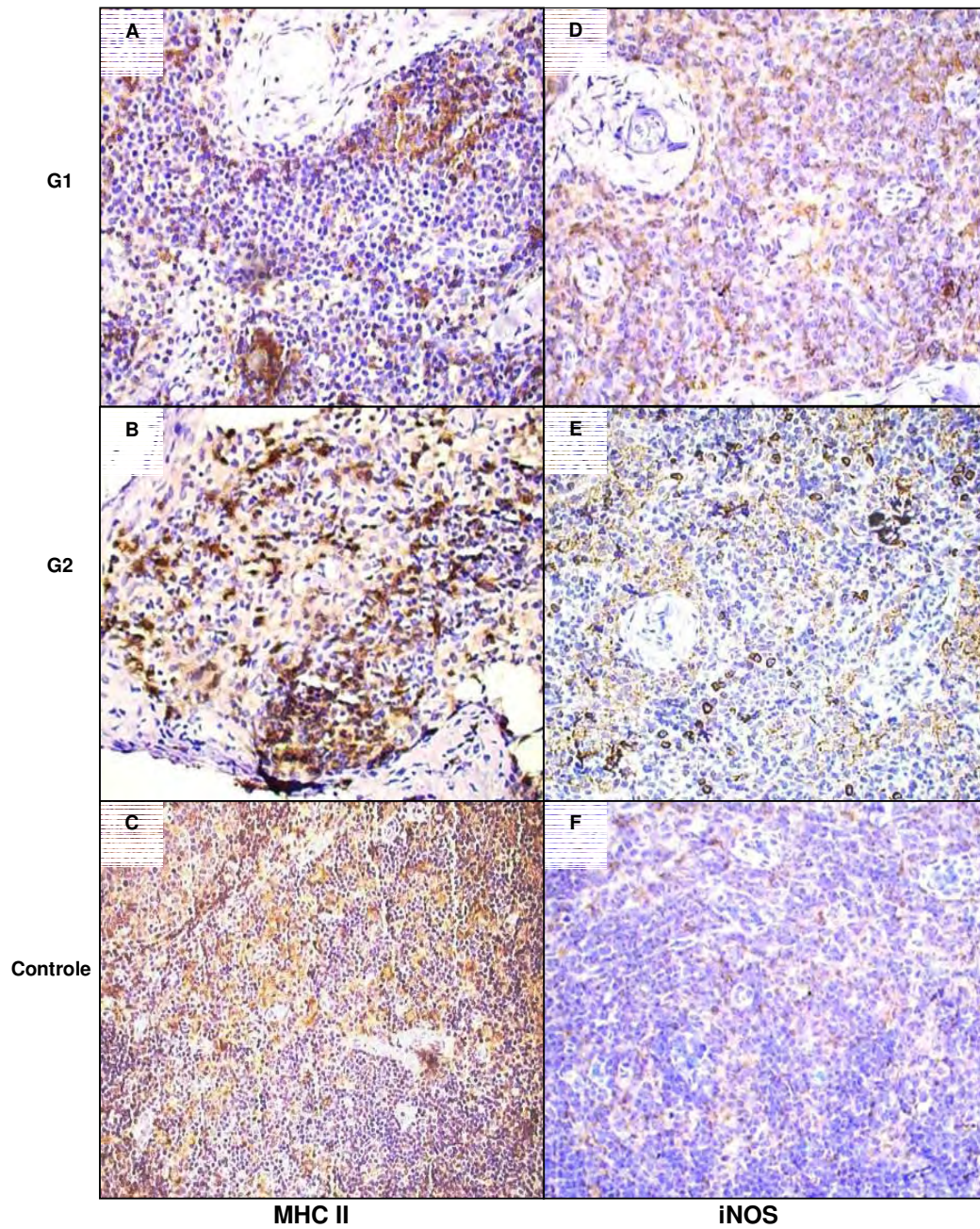


Figura 27: Fotos de ensaios imunoistoquímicos em linfonodos poplíteos de cães infectados experimentalmente com *N. caninum*. MHC de classe II (G1 – A, 200x; G2 – B, 400x; Controles – C, 100x), iNOS (G1 – D, 200x; G2 – E, 200x; Controles – F, 200x).

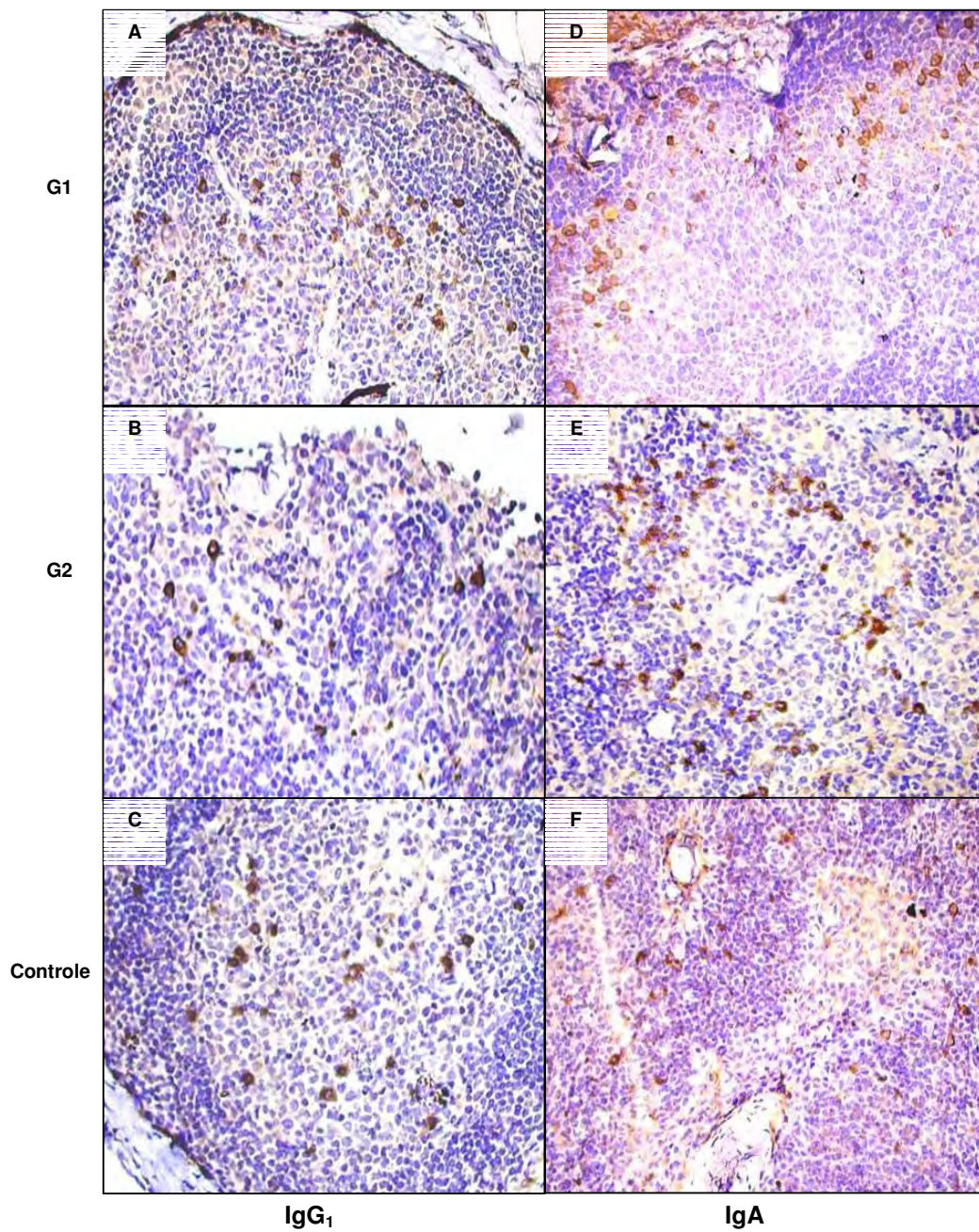


Figura 28: Fotos de ensaios imunoistoquímicos em linfonodos poplíteos de cães infectados experimentalmente com *N. caninum*. IgG₁ (G1 – A, 200x; G2 – B, 200x; Controles – C, 200x) e IgA (G1 – D, 200x; G2 – E, 200x; Controles – F, 100x).

III.3. Discussão

Primeiramente, linfócitos T de sangue periférico, bem como células advindas de linfonodo poplíteo excisados aos 30 dpi, foram imunofenotipados por meio de reações de citometria de fluxo e imunistoquímica. Quantidades totais de moléculas de CD8 produzidas declinaram de forma significativa nos animais jovens neste período, observando-se também uma queda nos níveis de células T CD4⁺ (em todos os cães) e CD8⁺ (animais adultos) aos 7 e 60 dpi, obtidas a partir de PBMC. Após os 60 dpi, ambos os fenótipos de células T apresentam um salto em porcentagem e de expressão, apresentando picos entre 75 e 90 dpi, com conseqüente retorno aos níveis pré-infecção no fim do experimento. Observou-se de forma concomitante nos linfonodos poplíteos analisados aos 30 dpi que as quantidades de células CD4⁺ (G1 e G2) e CD8⁺ (G1) se encontravam elevadas em relação aos animais controles. Outro achado interessante foi a redução substancial no número de células MHC de classe II positivas nos linfonodos poplíteos dos animais infectados, em relação aos controles, durante a fase aguda da infecção. A maior expressão desta molécula por célula foi identificada no G2, embora os animais deste grupo tenham apresentado as menores quantidades de células positivas para MHC de classe II. Os cães deste grupo apresentaram também um aumento nas contagens de células positivas para marcadores de macrófagos (CD-163) e iNOS em relação aos demais grupos de animais analisados. Enquanto os números de linfócitos T se mostraram semelhantes em todos os grupos, a expressão de TGFβ₁ se mostrou sutilmente elevada no G1 aos 30 dpi, em células do linfonodo poplíteo.

Linfócitos T CD4⁺, ou células T auxiliaadoras, são responsáveis pela regulação da resposta imune. Após a invasão do organismo do hospedeiro por agentes infecciosos, células apresentadoras de antígenos - como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B - apresentam o antígeno exógeno aos linfócitos T CD4⁺ por meio de moléculas de MHC de classe II, evento este responsável pelo início da resposta imune adaptativa. O padrão de resposta estimulado pela apresentação antigênica é dependente do patógeno. Agentes intracelulares, como *N. caninum*, induzem uma resposta do tipo Th1, ao passo que organismos extracelulares estimulam a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens em células tipo Th2. A ativação destas células irá levar a uma

estimulação de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B, os quais serão responsivos a antígenos microbianos (TIZARD, 1998). Por sua vez, linfócitos T CD8⁺, ou linfócitos T citotóxicos, são células que têm a função primordial de vigilância imune. Quando células somáticas apresentam disfunções, danos ou apresentam-se infectadas por microorganismos intracelulares, estas apresentam peptídeos antigênicos específicos ligados a moléculas de MHC de classe I, que vão ser reconhecidos por células T CD8⁺. Assim que as modificações no MHC de classe I das células somáticas são detectadas, os linfócitos T CD8⁺ induzem apoptose destas, por meio de fragmentação do DNA da célula alvos promovido pela liberação de proteínas citotóxicas contidas em seus grânulos líticos (JANEWAY et al., 2005).

A resposta imune mediada por células é de extrema importância para o controle da infecção por *N. caninum*, bem como para outros protozoários do filo Apicomplexa (INNES et al., 2005; HEMPHILL et al., 2006). Especificamente, a importância das células T CD4⁺ na imunidade a *N. caninum* foi demonstrada em diversos relatos envolvendo bovinos e camundongos (TANAKA et al., 2000; STASKA et al., 2003; QUINN et al., 2004). Camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-CD4 demonstraram 100% de mortalidade quando desafiados com *N. caninum* (TANAKA, et al., 2000), sendo que esta linhagem celular, conjuntamente com a alta expressão de MHC de classe II, estão envolvidos diretamente nos mecanismos imunes relacionados à resistência do hospedeiro frente à infecção pelo protozoário. Muito da importância das células CD4⁺ na resistência às infecções por protozoários é dependente de moléculas de MHC de classe II. Esta sinergia pode ser observada em experimentos utilizando animais geneticamente deficientes de IFN γ , que possuem apresentação antigênica deficitária pela ausência de MHC de classe II, o que por sua vez leva uma baixa proliferação de linfócitos T e aumento da susceptibilidade dos animais frente à infecção (NISHIKAWA et al., 2001a). Na infecção por *T. gondii*, camundongos geneticamente deficientes de MHC de classe II demonstraram susceptibilidade ao protozoário, semelhante à encontrada em ensaios utilizando animais infectados depletados de células CD4⁺ (DENKERS et al., 1996). Antagonicamente, camundongos geneticamente deficientes de MHC classe I previamente imunizados com cepa atenuada, se mostraram resistentes ao desafio com taquizoítas de *T. gondii* (DENKERS et al., 1993).

Experimentos *in vitro* demonstraram que durante o processo de invasão celular, *T. gondii* regula de forma negativa a expressão de MHC de classe II, bem como impede o aumento de expressão de MHC de classe I por macrófagos (LUDER et al., 1998).

Macrófagos ativados apresentam marcadores de superfície regulados de forma positiva, como o MHC de classe II. Esta ativação é promovida por células T CD4+ efectoras, por meio de receptores de membranas e produção de citocinas. Em respostas com perfil Th1, a ativação de macrófagos promove a eliminação de patógenos intracelulares, porém estes necessitam regulação rigorosa para prevenir danos teciduais (JANEWAY et al., 2005). Na infecção por *N. caninum*, a eliminação dos estágios intracelulares do parasito é realizada por vias efectoras dependentes de L-arginina, as quais são visualizadas por meio da ativação de macrófagos e conseqüente produção de óxido nítrico (TANAKA et al., 2000). Por outro lado, o parasito desenvolveu mecanismos de evasão que são desencadeados por níveis crescentes deste reativo de oxigênio, transformando-se de taquizoítas para bradizoítas após a adição de óxido nítrico exógeno *in vitro* (VONLAUFEN et al., 2002; RISCO-CASTILLO et al., 2004). TGF β é uma citocina regulatória, que atua diretamente na proliferação de células inflamatórias, inibindo a sua expansão (JANEWAY et al., 2005). A presença desta citocina está relacionada à diminuição de imunopatologias neurológicas na infecção por *T. gondii* por atuar decisivamente na regulação da resposta imune dos animais infectados, inibindo a produção excessiva de IFN γ e óxido nítrico (ROZENFELD et al., 2005). O papel desta citocina durante a infecção por *N. caninum* não está definido, porém tem sido demonstrada uma forte presença de TGF β nos tecidos placentários de bovinos (ENTRICAN, 2003). Assim, estima-se que TGF β seja um dos fatores que auxiliem a multiplicação e invasão dos parasitos nos tecidos fetais, por inibir a ação de células com potencial inflamatório (INNES et al., 2005).

Outros alvos de imunomarcção nos linfonodos poplíteos dos animais experimentalmente infectados por *N. caninum* foram os linfócitos B e as diferentes classes de anticorpos associados a membranas das células. De forma geral, a quantidade de linfócitos B (CD79) não apresentou diferenças entre os diferentes grupos analisados, demonstrando uma baixa ativação deste fenótipo de linfócitos frente ao desafio por *N. caninum*. Do mesmo modo, as contagens de células expressando IgM,

IgG₂ e IgE não diferiram estatisticamente, porém variações significativas foram demonstradas nas mensurações das células imunomarcadas por IgG₁ e IgA no G2. Os cães do G2 apresentaram maiores proporções de células IgA+, embora uma redução significativa tenha sido detectada nos números de células IgG₁+, em relação ao G1 e controles. Estudos relacionados à imunomarcção em linfonodos de animais infectados por *N. caninum* não foram encontrados na literatura. Os linfonodos poplíteos, escolhidos como alvo da análise por imunistoquímica, espelham a imunidade sistêmica dos animais, em detrimento aos linfonodos mesentéricos, por exemplo, que refletem de forma mais clara um padrão de imunidade do compartimento intestinal frente a agentes de ação local. Sabe-se que a infecção por *N. caninum* utiliza como via de entrada no organismo de seus hospedeiros o trato gastrintestinal, porém, se distribui via corrente sanguínea e drenagem linfática por todos os órgãos dos animais (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

CAPÍTULO IV

Perfil da expressão de mRNA para a produção de citocinas durante a fase aguda da infecção experimental por N. caninum em cães jovens inoculados pela via oral

IV.1. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1.1. Animais utilizados

Para a visualização do perfil da expressão de citocinas em cães jovens após a ingestão de ovos embrionados infectados por *N. caninum*, utilizou-se os cães pertencentes ao G3 e 5 animais controles filhotes.

IV.1.2. Detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* no soro dos animais infectados

Com a intenção de se confirmar a soropositividade dos cães do G3 inoculados experimentalmente com ovos embrionados, realizou-se um ELISA das amostras de soro para se contrapor aos fracos resultados obtidos pela RIFI. O protocolo utilizado foi o mesmo daquele realizado para a detecção de anticorpos IgG nos animais do G1 e G2 descrito no terceiro capítulo.

IV.1.3. Detecção da expressão de mRNA para citocinas em cães experimentalmente infectados, por meio de Real time RT-PCR

IV.1.3.1. Obtenção das amostras de PBMC e estimulação das células in vitro

Obteve-se sangue venoso dos cães utilizados neste experimento por meio de punção das veias jugulares, onde se utilizou como anti-coagulante solução de Alsever estéril (v:v), sendo retirado 3 ml de sangue por animal. Os cães foram amostrados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 45, 60, 75 e 90 pós-infecção. Após a retirada das alíquotas de sangue, as seringas foram envolvidas em papel-toalha embebido em álcool 70% para se manter a esterilidade das amostras. Mantendo a assepsia do material, as amostras foram processadas para a separação de leucócitos e cultivadas com diferentes estímulos, conforme descrição anterior (Capítulo II). Contudo, o tempo de cultivo utilizado neste experimento foi de 6 horas, período este estabelecido após ensaios de padronização utilizando-se 6, 12 e 24 horas de incubação. O período de incubação de 6 horas foi escolhido, pois demonstrou maior homogeneidade e conservação do mRNA. Posteriormente, as células foram colhidas com a adição de 2 ml de PBS estéril a 4°C, para auxiliar na remoção de células aderidas nas placas de poliestireno. As amostras

passaram então por três ciclos de centrifugação, com a remoção do sobrenadante e adição de 10 ml de PBS estéril em cada etapa, com o objetivo de se eliminar resíduos de meio de cultura. Após as lavagens, as amostras foram ressuspensas em 1 ml de Trizol, adicionadas em microtubos plásticos e conservadas a -80°C até o momento da extração.

IV.1.3.2. Extração de RNA total

Para realizar a extração do RNA total das amostras de PBMC cultivadas, utilizou-se um kit de extração com algumas adaptações para a retirada do Trizol. De forma breve, as amostras foram descongeladas em gelo e adicionou-se 200 μl de clorofórmio PA, homogeneizou-se a solução gentilmente com pipetador automático, sendo as amostras posteriormente incubadas por quinze minutos, à temperatura ambiente, com homogeneizações manuais a cada três minutos. Em seguida, as amostras foram adicionadas em microtubos plásticos “Phase Lock Gel Heavy” de 2 ml e submetidas à centrifugação a 14.000 RPM, por cinco minutos, para realizar a separação das fases. Após a separação, a fase límpida foi retirada e adicionada em mini-colunas, onde se prosseguiu o restante do protocolo de extração do kit, a partir da etapa de adição de etanol 95%. Outra alteração realizada no protocolo original foi a eluição final das amostras em 50 μl de água livre de DNase/RNase, fornecida pelo fabricante, para se obter amostras de maior concentração de RNA total, ao invés de realizar a eluição em 100 μl , conforme instruções do fabricante. Após a extração, 3 μl das amostras foram adicionadas a 597 μl de água bidestilada estéril para a dosagem do RNA obtido em biofotometro, utilizando comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). Para se analisar a presença de contaminantes nas amostras, como DNA e proteínas, realizou-se também análise diferencial das amostras com a relação entre as leituras em comprimento de onda de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$), onde valores entre 1,5 e 2,0 são considerados ideais.

IV.1.3.3. Real time RT-PCR

Para se observar o perfil da expressão de citocinas pelos cães infectados, realizou-se ensaios baseados em sondas tipo Taqman. Primeiramente, as seqüências de mRNA para cada citocina alvo foram cruzadas com o genoma do cão, identificando

assim as junções exon-exon. Uma vez identificadas, seqüências parciais de até 300 bases foram encaminhadas para o desenho dos oligonucleotídeos e sondas respectivos, por meio de “Assay by Design”. As seqüências dos oligonucleotídeos e sondas sintetizadas podem ser encontradas na Tabela 8. Utilizou-se para a reação de “Real time RT-PCR” placas de 96 cavidades, onde foram adicionados 50 ng do RNA das amostras teste diluídos em 5 µl, 12,5 µl de Master mix, 0,625 µl de enzima Multiscribe e mix inibidor de RNase, 5,625 µl de água bi-destilada estéril e 1,25 µl dos oligonucleotídeos e sondas desejados por reação de 25 µl. Todas as amostras analisadas foram observadas em paralelo com ensaios sem a adição de RNA e quanto à expressão do gene normalizador G3PDH e em duplicata. Após a pipetagem dos diferentes reagentes, as placas foram seladas e submetidas a um ciclo inicial de transcrição reversa a 48°C por 30 minutos, uma segunda etapa para inativação das enzimas utilizadas durante o RT-PCR e início da amplificação do cDNA à 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos que compreendiam a desnaturação (95 °C por 10 segundos) e amplificação (60 °C por 1 minuto). Os resultados foram expressos de acordo com a TC média individual, obtidos a partir de software específico (Figura 29).

IV.1.3.4. Análise dos dados obtidos por meio do Real time RT-PCR

Os resultados obtidos pela amplificação das amostras de RNA extraídas de PBMC dos cães infectados foram analisadas por meio da normalização dos resultados das amplificações obtidas com as quantidades de mRNA das amostras teste, conforme descrito por PFAFFL (2001). Para isto, utilizou-se do Índice de expressão, onde foi descontado os valores do TC do gene constituinte G3PDH daqueles obtidos para cada citocina analisada. Para o cálculo, utilizou-se da seguinte fórmula: $2^{-(TC_{AMOSTRA} - TC_{G3PDH})}$.

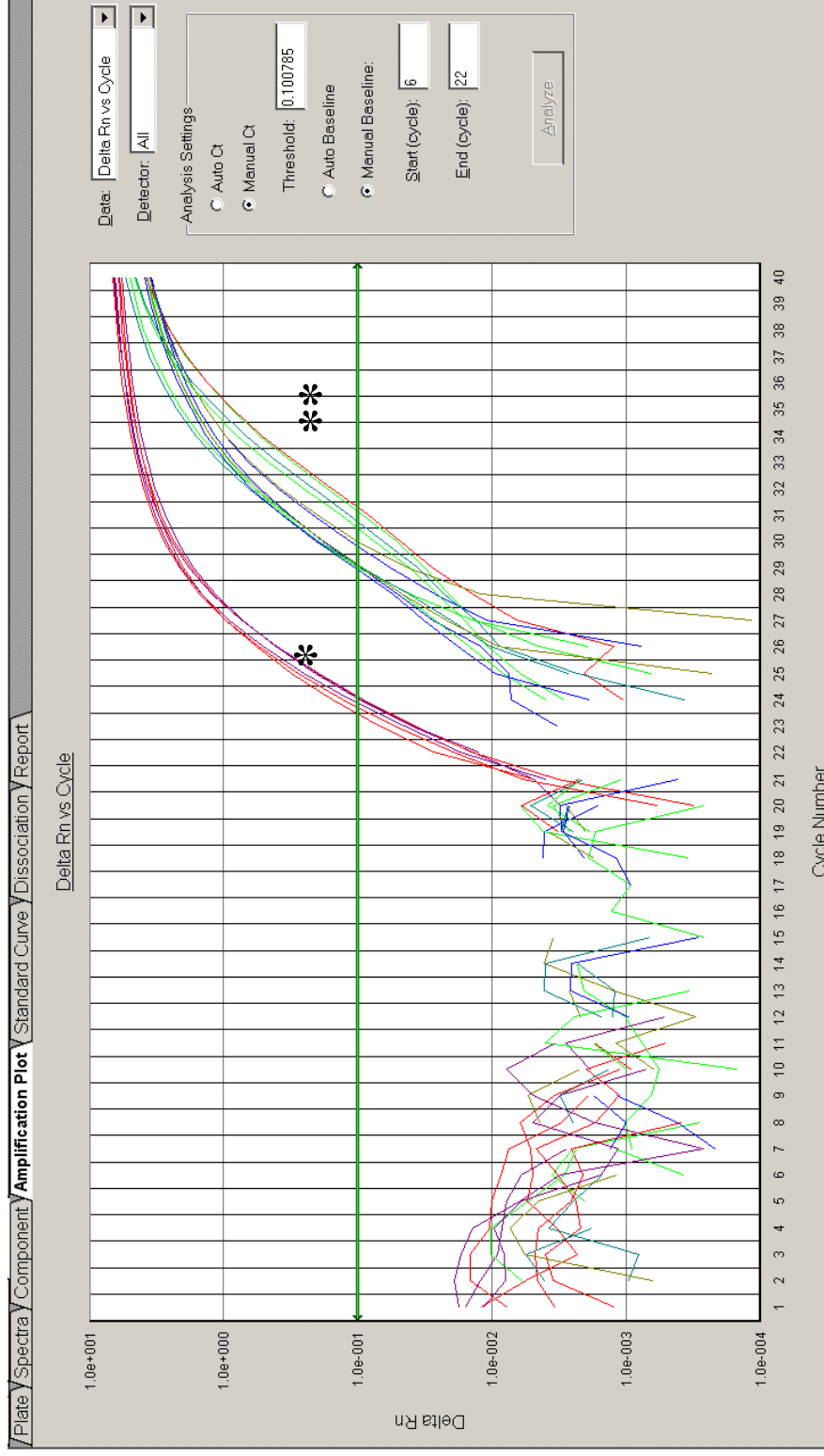


Figura 29: Demonstração de uma curva de amplificação das amostras obtidas a partir de PBMC de cães infectados por *N. caninum*, por meio de Real time RT-PCR, amplificadas para gene normalizador (*) e oito citocinas diferentes (**).

Tabela 8: Oligonucleotídeos e sondas utilizadas para a detecção de amostras de mRNA codificando citocinas e gene normalizador advindas de cães experimentalmente infectados por *N. caninum*.

Gene	Código	Oligonucleotídeos			Sonda
		Genbank	Forward	Reverse	
<i>G3PDH</i>	NW_879563	CGTGAACCATGAGAAGTATGACAAC	GCTAGAGGAGCCAAAGCAGTTG	CAGGAGGCATTGCTG	
<i>IFNγ</i>	AF126247	AGGGAGGACTTCCTTAAGCTGATT	GCGCTGGACCTGCAGA	TCGTTCACAGGAATTTG	
<i>IL-2</i>	D30710	CTCTCCAGGATGCTCACATTTAAGT	CTTCTGCTAGACATTGAAGGTGTG	CAAGAAGGCCACAGAATT	
<i>IL-4</i>	AF187322	GCTGACTGTCAAGGACGCTCT	AGCTCTGCAGAAGATTCCTTATCG	ACTGCTCCAAGAAGACACA	
<i>IL-6</i>	NM_0010033 01	CAGGACCCAGCTATGAACTC	GTAGGAAAGCAGTAGCCATCAG	CTCCACAAGCGCCTTC	
<i>IL-10</i>	U33843	GCCTTCGGGAGGGTGAA	CCCGGTCAGCAGTATGTTGTC	CTTGTCCCTTCATTTGAAAGAA	
<i>IL-12 p40</i>	AF091134	GGTGGCTGACGGCAATCA	GTGTCACTGCTCCACATGTCA	AAGTAGCAGAGGCTTCTC	
<i>TGFβ_1</i>	L34956	ACCCGGGTGCTAATGGT	TGGGACTTTTCTTGACTTTTCTCAT	AAAACACCAACAAAATCT	
<i>TNFα</i>	S74068	CCTCCAATAATCAGCCCTCTTG	TGAGCTACTGGCTTGTCACTTG	CCAGACAGTCAAATCAT	

IV.2. RESULTADOS

Na detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* pelo ELISA, nas amostras de soro dos cães pertencentes ao G3, todos os animais apresentaram soroconversão, apesar dos baixos níveis de anticorpos detectáveis (Figura 30). Pode-se constatar que dois cães (3B e 3D) apresentaram soroconversão inicial dentro dos primeiros 30 dpi, voltando a soronegativarem após este período, porém apresentando amostras positivas no decorrer do experimento. Quanto aos animais 3A e 3C, ambos apresentaram soroconversão tardia, porém com níveis detectáveis durante todo o restante do período experimental, com exceção do animal 3C, que se mostrou negativo aos 60 dpi. De forma interessante, todos os animais demonstraram queda nos níveis de anticorpos nesta data, seguidos de um aumento nas titulações de IgG detectáveis.

De forma geral, pode-se observar que o perfil da expressão de citocinas nos cães experimentalmente infectados alternou entre os padrões Th1 e Th2 durante o período da análise proposta, período este que compreendia a ausência de reatividade de linfócitos T, baixa soroconversão e diminuição da expressão de MHC de classe II em cães do G1 e G2, conforme previamente descrito. Os picos de expressão de citocinas tipo Th2, predominantes nas primeiras semanas de infecção, coincidiram com momentos de ausência de expressão de citocinas com padrão Th1, as quais foram expressas de forma mais consistente após os 60 dpi. Nesta data, conjuntamente com o 7^o dpi, pode-se observar que todas as citocinas pró-inflamatórias (com exceção feita ao TNF α , cujas quedas foram observadas aos 14 e 60 dpi) apresentaram seus menores níveis de expressão, enquanto que IL-10 e TGF β ₁ (7 dpi) e IL-4 (60 dpi) apresentavam seus picos de expressão detectáveis.

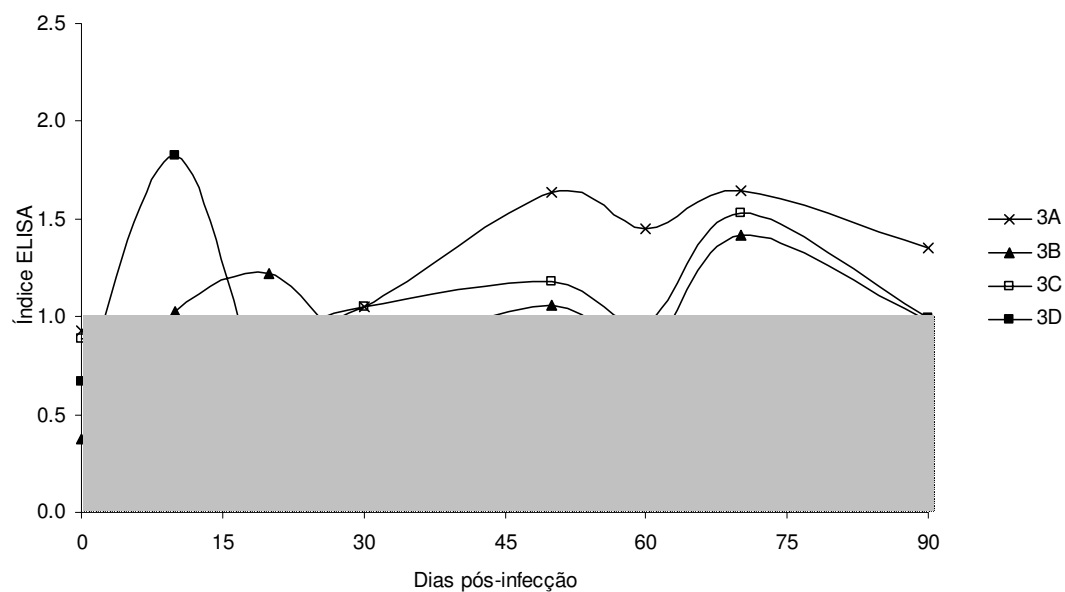


Figura 30: Cinética da detecção de anticorpos IgG específicos a *N. caninum* em amostras de soros dos cães do grupo G3 por meio de ELISA. São consideradas positivas as amostras que obtiveram reatividade maior ou igual ao ponto de corte da reação (Índice ELISA > 1). A faixa cinza indica a zona de negatividade do teste.

Individualmente, pode-se observar que a cinética de expressão de IFN γ apresentou queda nos níveis detectáveis de mRNA após a primeira semana de infecção, seguido por um pico de produção aos 21 dpi, retornando a níveis iniciais, permanecendo praticamente inalterados até os 45 dpi. Aos 60 dpi, uma nova queda foi observada na expressão de IFN γ , sendo acompanhada de um forte aumento na expressão desta citocina até o fim do período experimental (Figura 31A). Quando as células foram estimuladas com ConA, pode-se observar um perfil semelhante de produção de IFN γ , porém com níveis detectáveis bem mais elevados. Vale ressaltar que a estimulação não foi capaz de reverter a queda de produção observada nos dias sete e 60 dpi (Figura 31B). De forma complementar, a expressão desta citocina frente à estimulação com AgNc se mostrou inalterada quando comparada às células sem estímulo exógeno (Figura 31C).

Quanto a IL-2, observou-se um intenso pico único de expressão desta citocina aos 45 dpi (Figura 32A), diferentemente do observado quando o PBMC foi estimulado com ConA e AgNc, os quais demonstraram pico de produção aos 14 dpi (Figuras 32B e 32C). As células estimuladas apresentaram quedas nas expressões detectáveis aos sete e 60 dpi, conforme descrito para IFN γ . A expressão de IL-4 também apresentou pico único nas células não estimuladas, aos 60 dpi (Figura 33A). Porém, a adição de estímulos levou a uma cinética irregular de expressão em células tratadas com ConA (Figura 33B) e a uma supressão da sinalização quando tratadas com AgNc (Figura 33C). A expressão de IL-6 começa a se mostrar significativa após o 21^o dpi em todos os experimentos realizados, apresentando altos níveis após os 30 dpi (Figuras 34). É importante ressaltar que os níveis detectados sofreram uma queda aos 60 dpi, de forma coincidente à expressão de outros genes de citocinas com padrão Th1. Além disso, a adição de AgNc às células leva a uma redução na expressão desta citocina aos 45 dpi, fato não observado nos demais tratamentos, que expressaram quantidades semelhantes de mRNA durante o período de observação.

Os níveis de expressão de IL-10 nos animais infectados se mostraram baixos, quando comparados às demais citocinas analisadas (Figura 35A). Contudo a análise da cinética de IL-10 revela um aumento da expressão na fase inicial da infecção, seguida de uma queda após os 30 dpi. Pode-se observar ao final do experimento que os

animais demonstraram uma tendência à elevação da expressão de IL-10, correlacionada ao aumento IFN γ . Quando analisando o PBMC tratado, pode-se observar um perfil semelhante aquele descrito para IL-4, onde a adição de ConA tornou a cinética irregular (Figura 35B) e o tratamento com AgNc apresentou uma supressão da sinalização para a produção desta citocina (Figura 35C). A cinética obtida para a expressão de IL-12 p40 se mostrou muito semelhante à obtida para IFN γ , com queda aos sete dpi, pico aos 21 dpi, redução a níveis mínimos aos 60 dpi, seguidos de uma forte elevação na expressão (Figura 36A). O tratamento destas células também levou a uma cinética semelhante de expressão àquela observada em células cultivadas sem estímulos exógenos (Figuras 36B e C). A cinética observada para a expressão das citocinas TGF β_1 (Figura 37) e TNF α (Figura 38) se mostraram praticamente inalteradas com os diferentes tratamentos. TGF β_1 apresentou seu pico de expressão aos sete dpi, voltando a demonstrar alterações em seus níveis aos 60 dpi, enquanto que TNF α apresentou altos níveis de expressão durante todo o período experimental, com exceção dos dias 14 e 60 dpi.

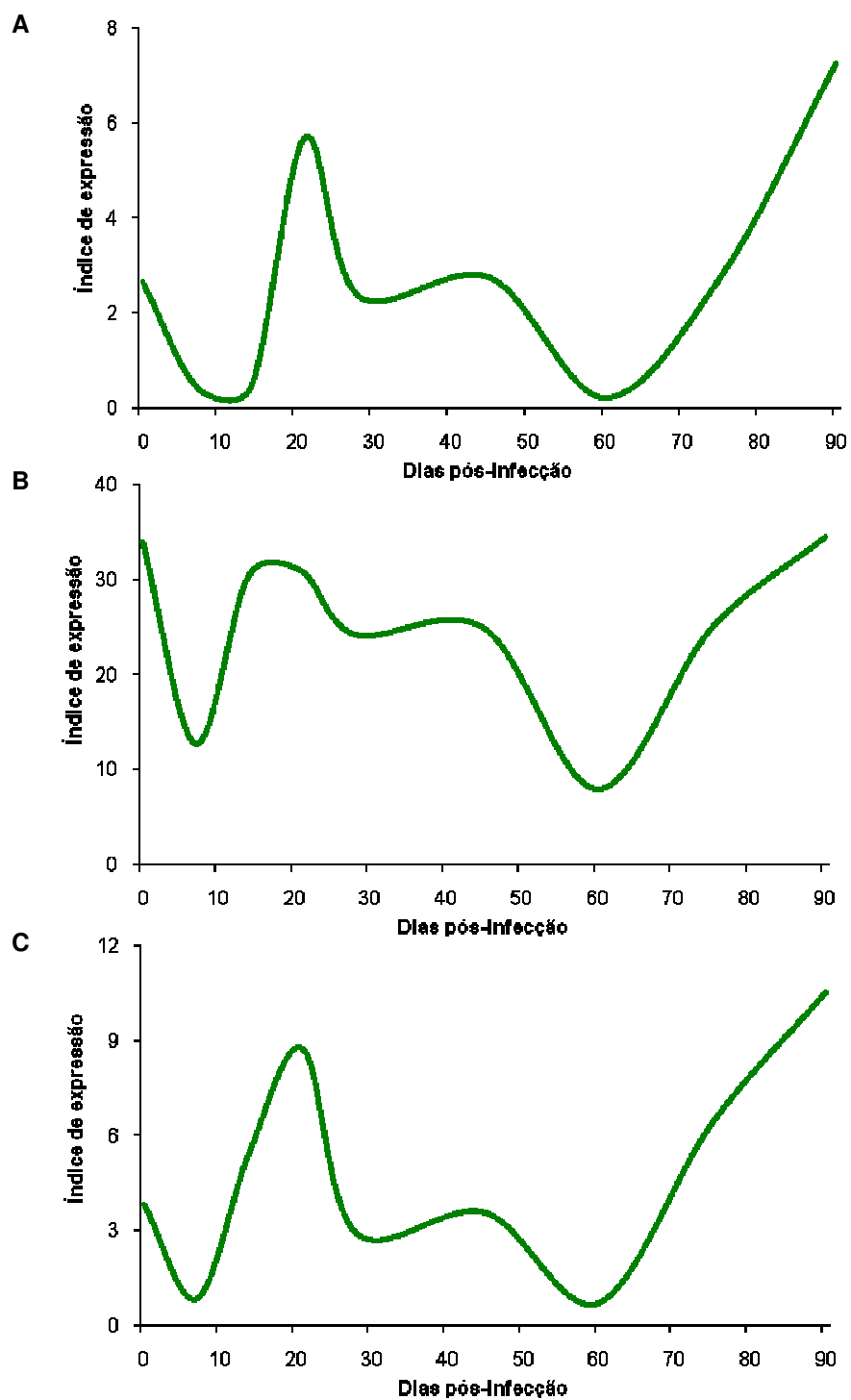


Figura 31: Expressão de mRNA codificando IFN γ em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

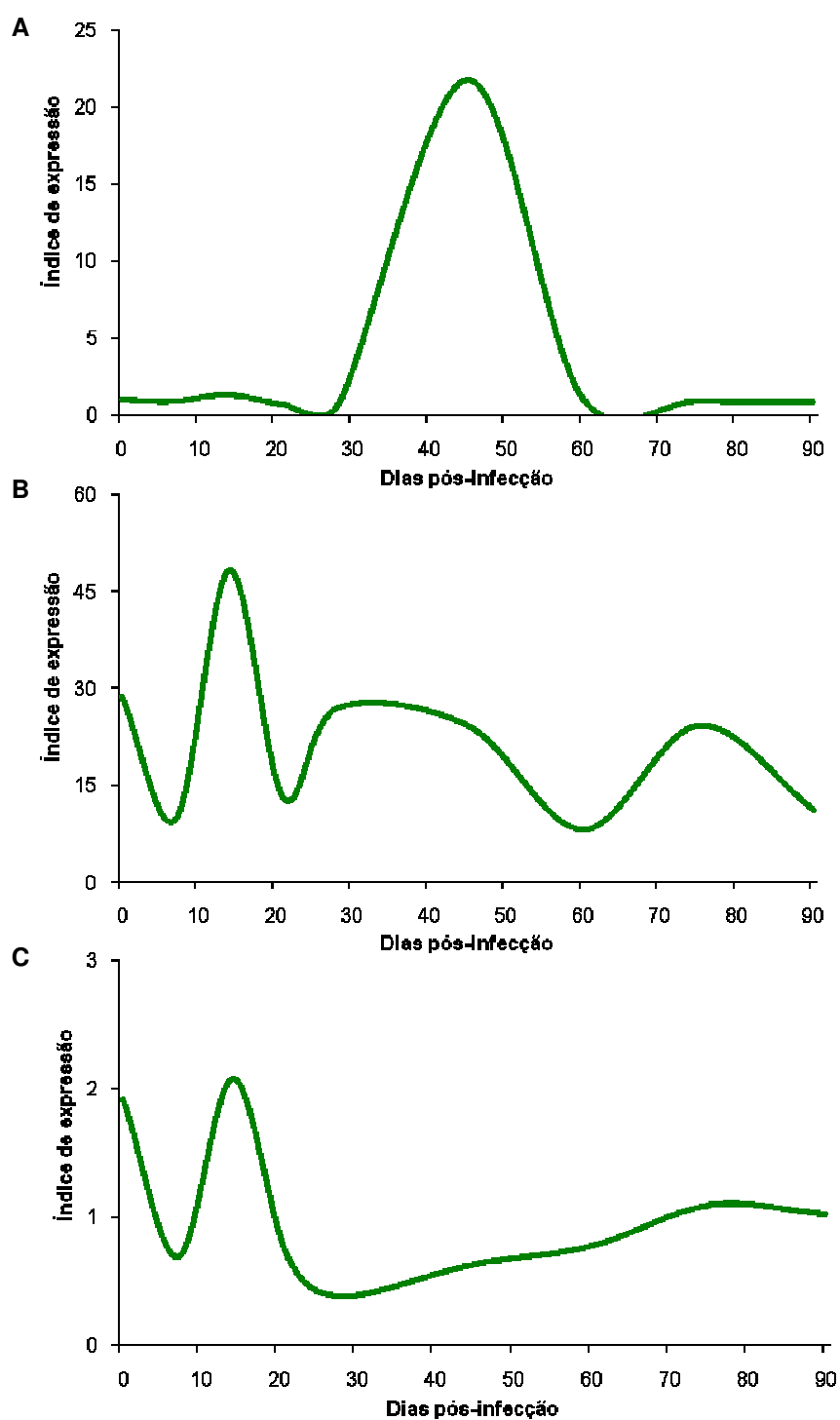


Figura 32: Expressão de mRNA codificando IL-2 em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

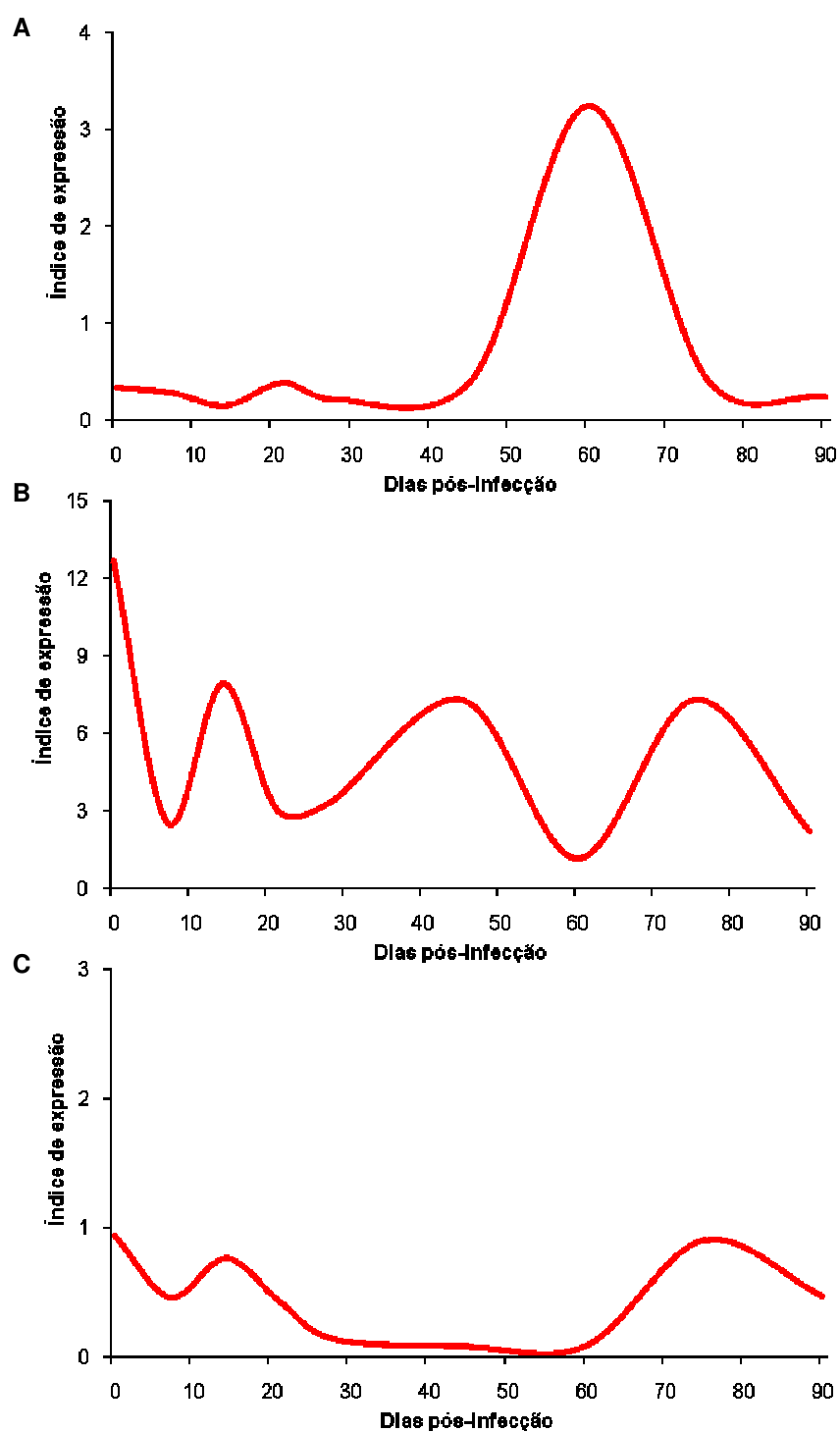


Figura 33: Expressão de mRNA codificando IL-4 em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

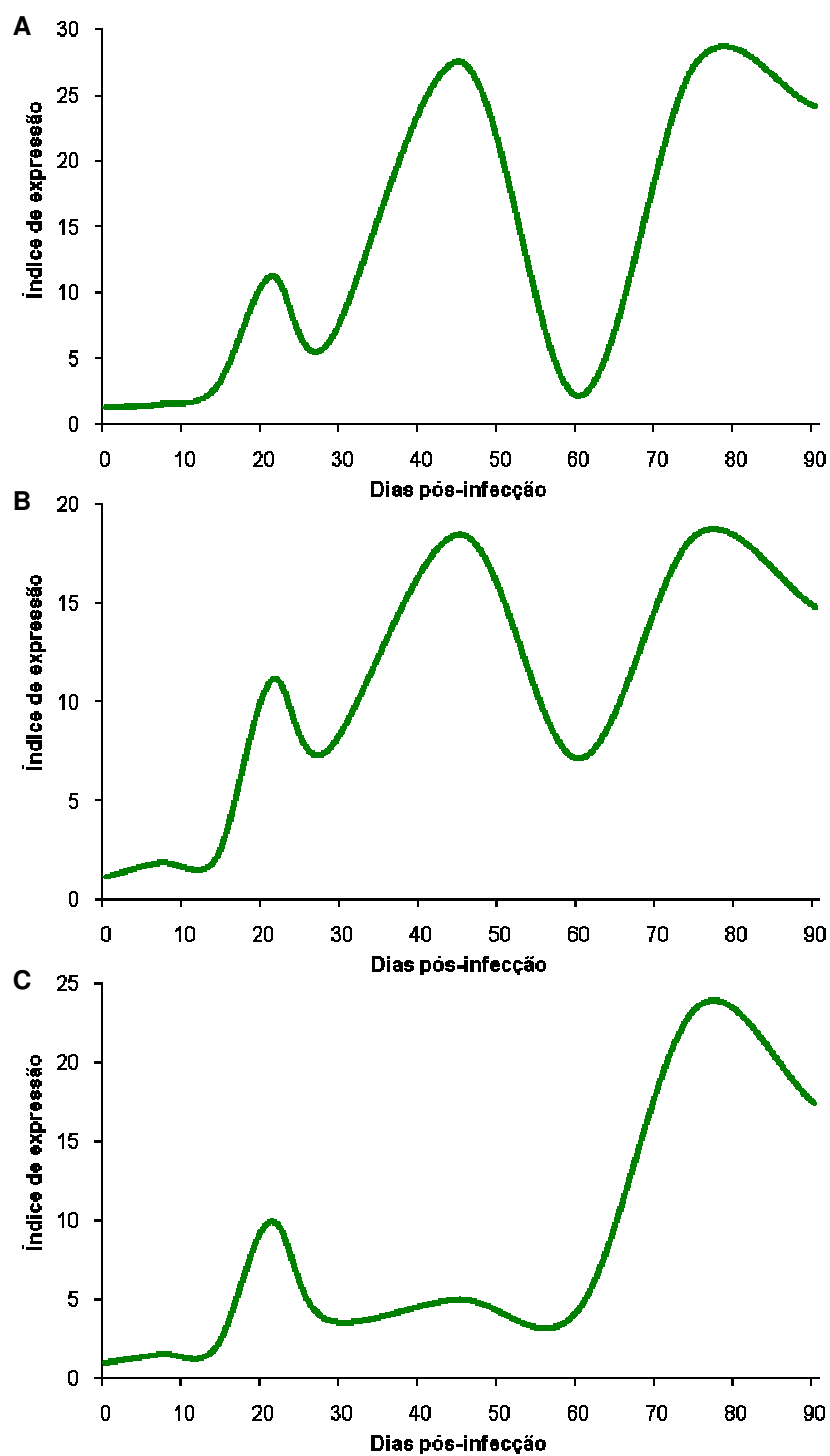


Figura 34: Expressão de mRNA codificando IL-6 em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

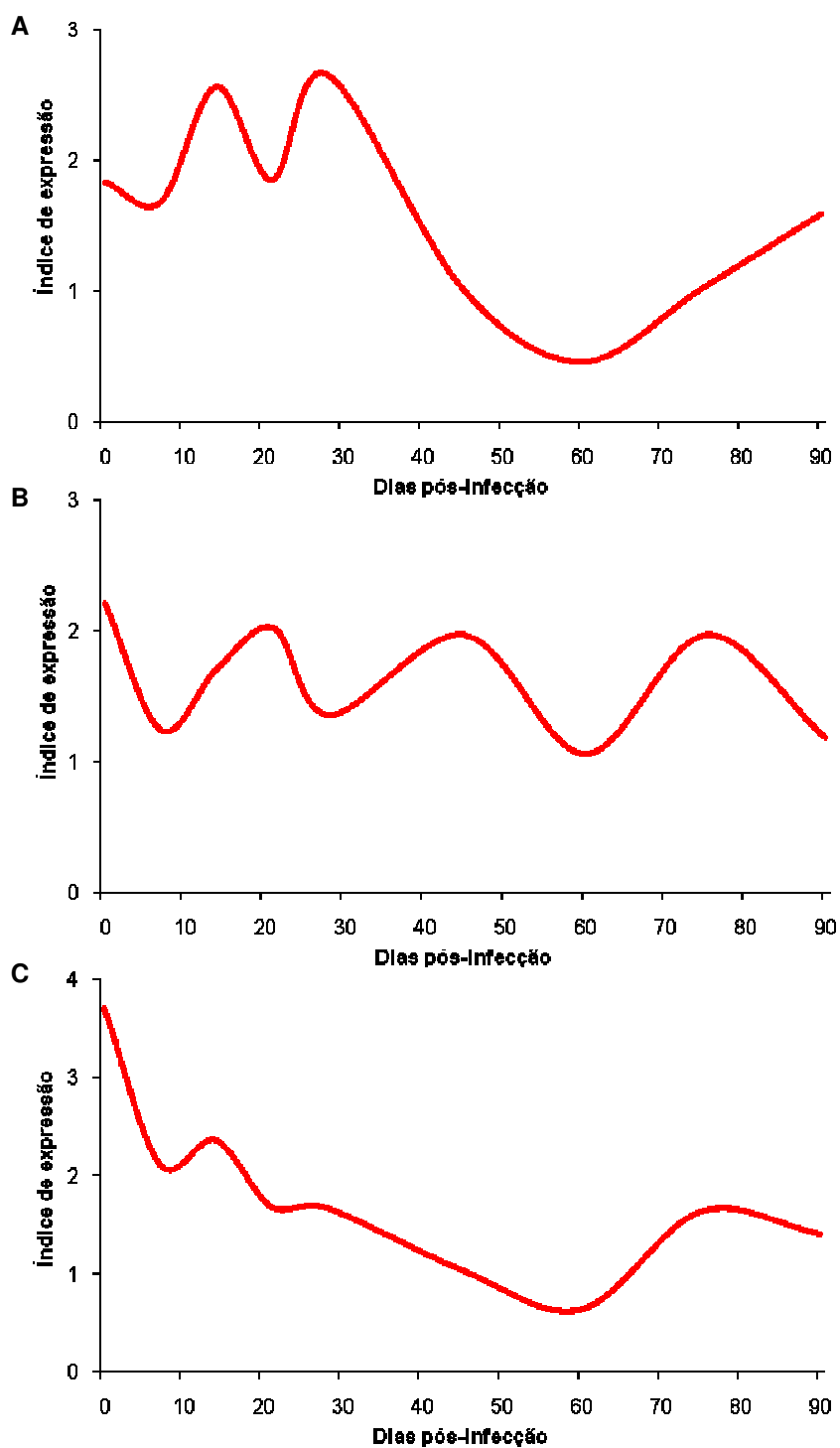


Figura 35: Expressão de mRNA codificando IL-10 em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

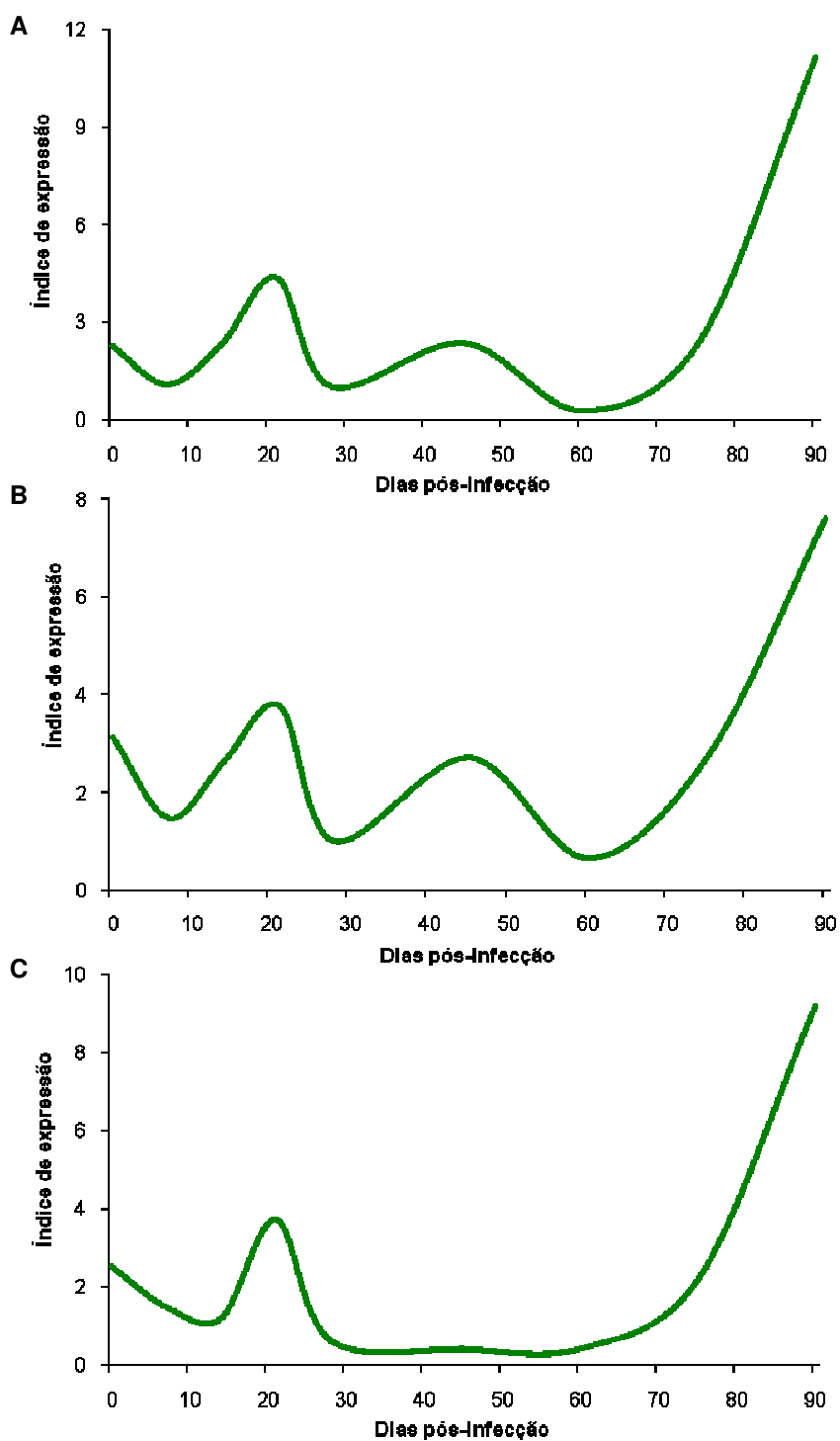


Figura 36: Expressão de mRNA codificando IL-12 p40 em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

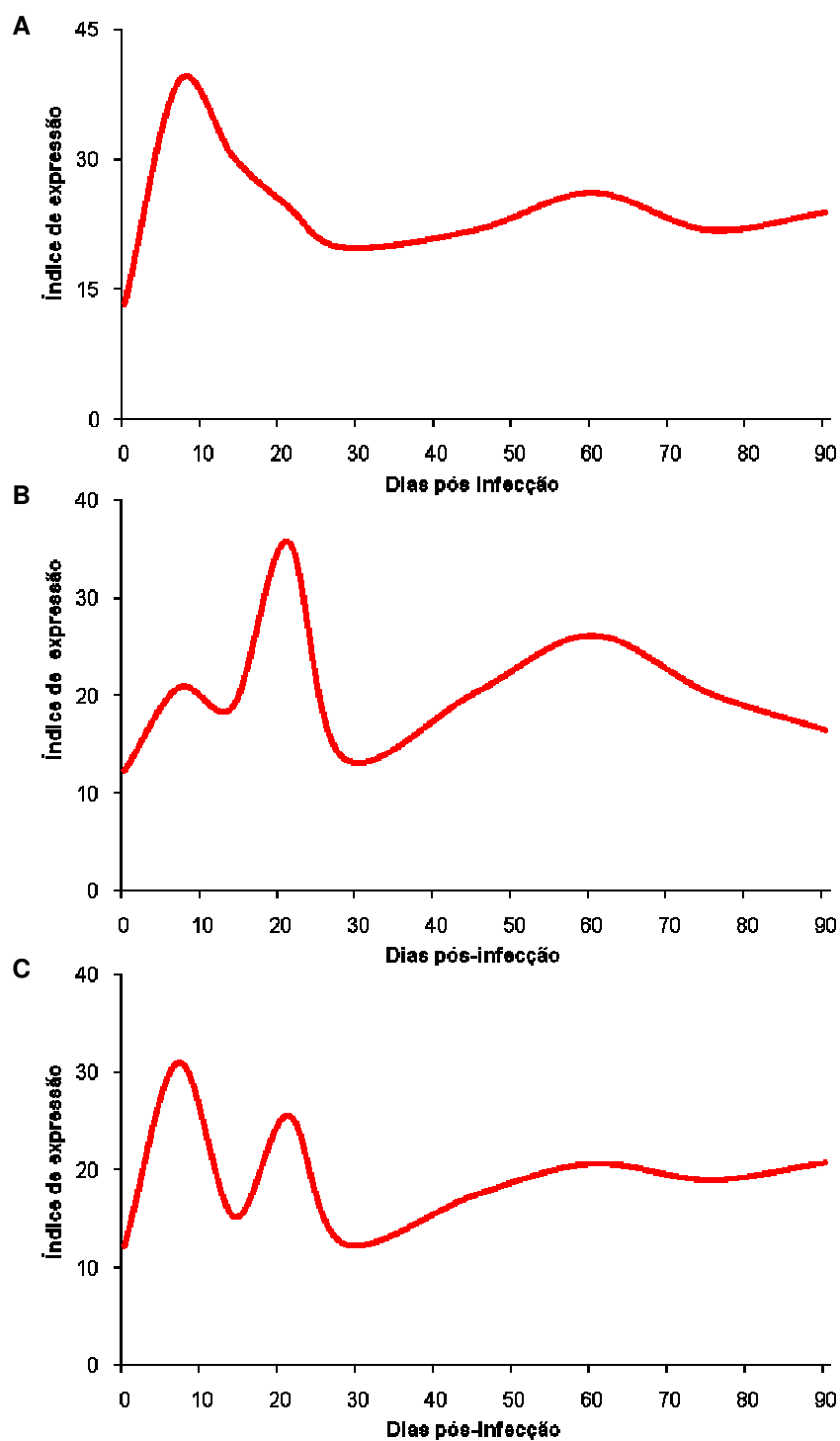


Figura 37: Expressão de mRNA codificando $TGF\beta_1$ em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

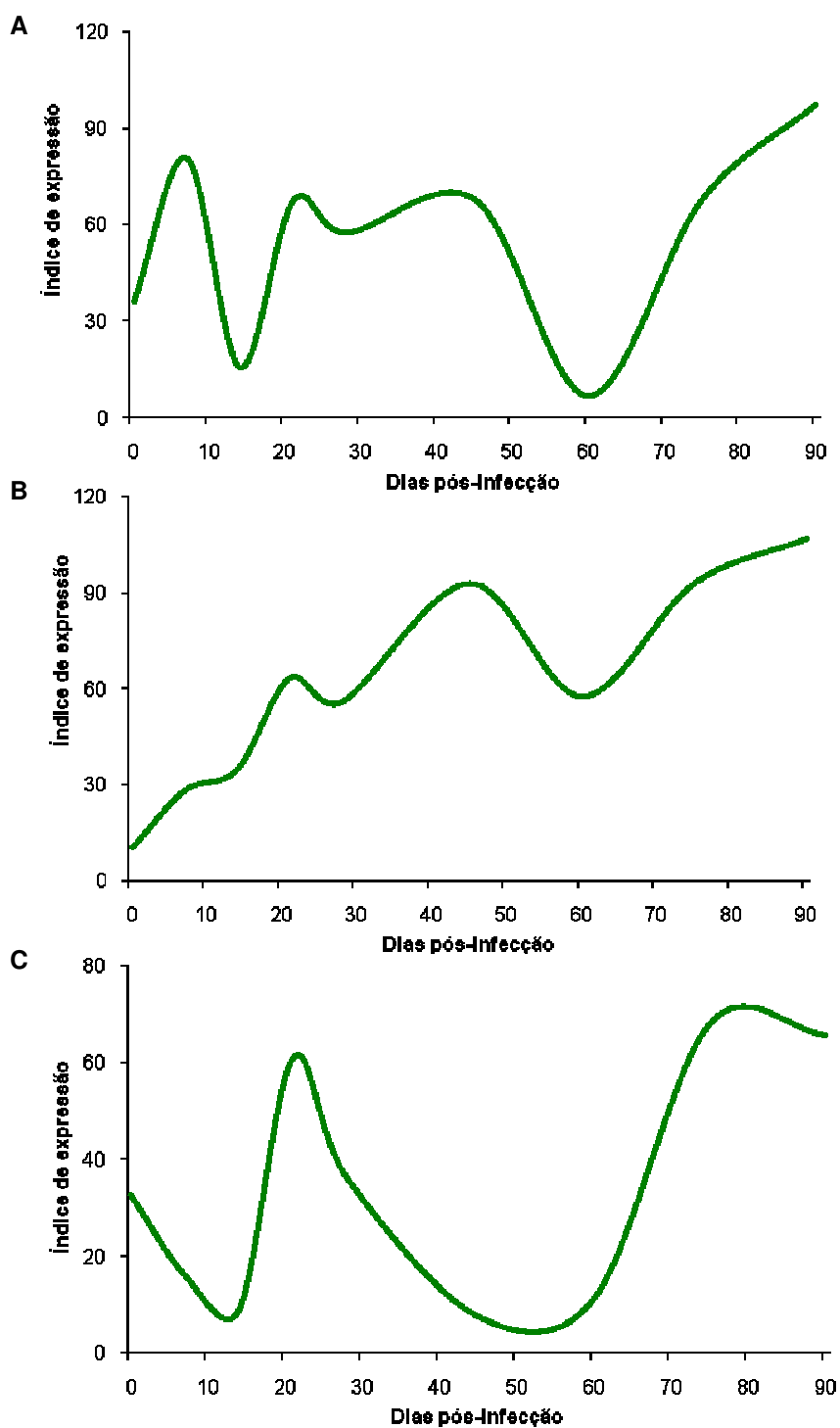


Figura 38: Expressão de mRNA codificando TNF α em PBMC de cães infectados experimentalmente com *N. caninum* pela via oral, cultivados sem estímulo exógeno (A), com estimulação por ConA (B) ou AgNc (C).

IV.3. Discussão

A infecção experimental do G3, utilizando ovos embrionados como inóculo, demonstrou uma fraca expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , IL-2, IL-6 e IL-12 durante os primeiros 15 dias de infecção. Simultaneamente, a expressão de TGF β_1 se mostrou mais elevada durante o mesmo período. A alternância entre os padrões de resposta Th1 e Th2 pode ser visualizada de forma mais clara aos 7 e 60 dpi, onde podem-se observar as menores expressões das citocinas pró-inflamatórias IFN γ , TNF α (14 e 60 dpi), IL-2, IL-6 e IL-12, enquanto que suas antagonistas apresentavam picos de expressão (TGF β_1 – 7 e 60 dpi; IL-4 – 60 dpi). Apesar de muito baixos, os níveis de expressão de IL-10 acompanharam as variações do IFN γ , um conhecido antagonista. De forma complementar aos baixos níveis de citocinas de padrão Th1 expressos pelos cães, constatou-se que até o potencial de expressão de mRNA codificando estas citocinas foi reduzido, já que mesmo as células tratadas com ConA demonstraram quedas importantes de rendimento. O perfil da expressão de citocinas se altera radicalmente pós-60 dpi, quando são observados os picos de produção de IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-12.

Citocinas pró-inflamatórias são consideradas chave na imunidade efetiva ao *N. caninum* e outros protozoários (KASPER;KHAN, 1998; INNES et al., 2005; KLEVAR et al., 2007). Entre estas, IFN γ e IL-12 são as maiores responsáveis pela resistência dos hospedeiros frente à infecção por *N. caninum* (BAZLER et al., 1999; INNES et al., 2002; BOTELHO et al., 2007). IFN γ é uma citocina chave na resposta imune com padrão Th1, uma vez que atua na ativação de macrófagos, aumento da expressão de MHC de classe II e outros componentes necessários para a apresentação antigênica, mudança de perfil de imunoglobulinas, além de suprimir a expansão clonal de células tipo Th2 (JANEWAY et al., 2005). Quanto a IL-12, suas funções principais estão relacionadas às células apresentadoras de antígenos, que sinalizam, após o primeiro contato com o patógeno, a síntese de IFN γ por meio de células efectoras (KAGAN;MEDZHITOV, 2006). Por sua vez, a síntese de TNF α por linfócitos T, células NK e macrófagos auxiliam na inibição da replicação parasitária nos diferentes tecidos, porém com menor eficácia quando comparado com IFN γ (YAMANE et al., 2000).

Em relação a IL-2, esta citocina é indispensável na diferenciação e expansão clonal de linfócitos T, o qual só apresentou variações positivas tardiamente nos cães infectados com ovos embrionados. IL-2 se mostra presente normalmente após o contato de células T CD4+ com o complexo antígeno/MHC de classe II, induzindo a proliferação celular. Para a produção desta citocina, a presença da co-estimulação dos linfócitos com CD28 é essencial, uma vez que esta molécula estabiliza o mRNA expresso para sua produção, modificando a instabilidade natural dos mRNAs que codificam citocinas. A estabilização do mRNA de IL-2 leva a um aumento de 20 a 30 vezes na síntese da citocina (JANEWAY et al., 2005). Não existem relatos na literatura indicando a participação de IL-2 na infecção por *N. caninum*, contudo sabe-se que o desafio com *T. gondii* induz imunossupressão de camundongos após 7 dias de infecção, devido a uma regulação negativa da síntese desta citocina (HAQUE et al., 1994; KHAN et al., 1995). Além disso, modelos *in vitro* demonstram uma redução na expressão de IL-2 e seu receptor, associada com uma queda de proliferação de linfócitos T após a infecção com o parasito, sendo estes eventos relacionados a um aumento da síntese de IL-10 (HAQUE et al., 1995). Já IL-6, um potente indutor de respostas inflamatórias e um dos principais agentes participantes na indução de quadros febris, participa efetivamente da proliferação de linfócitos Th-17, os quais estão envolvidos em quadros de auto-imunidade e inflamação excessiva. Estima-se que os quadros de imunopatologia decorrentes da infecção por *T. gondii* tenham participação crucial desta linhagem celular (GADDI;YAP, 2007).

No modelo estudado, demonstra-se que a modulação da resposta imune dos cães é dependente principalmente de TGFβ₁ e secundariamente de IL-10. IL-10, um potente supressor de funções macrofágicas, já foi demonstrado em diversas oportunidades como responsável por estados imunossupressivos em animais infectados por diversos protozoários (HAQUE et al., 1995; BODAS et al., 2006; KELLER et al., 2006; LANG et al., 2006; WU et al., 2007), sendo também relatado em infecções por *N. caninum* (KHAN et al., 1997; EPERON et al., 1999; PINHEIRO et al., 2006). Em gatos experimentalmente infectados com *T. gondii*, a presença de níveis elevados de expressão de IL-10 é um dos fatores determinantes para o sucesso da infecção pelo protozoário, uma vez que suprime as respostas via células com fenótipo Th1 (LEVY et

al., 2004). Quanto a IL-4, sabe-se que esta citocina é um dos maiores responsáveis pela alternância de perfil Th1/Th2 durante diferentes infecções, principalmente por suprimir respostas com padrão Th1 por meio da produção de anticorpos IgE e subclasses de IgG com perfil Th2 (JANEWAY et al., 2005). O aumento desta citocina durante a infecção por *N. caninum* tem sido frequentemente relacionado à transmissão transplacentária em bovinos e camundongos (QUINN et al., 2004; INNES et al., 2005; KANO et al., 2005).

Nos abortos bovinos decorrentes da (re-)infecção por *N. caninum*, fortes respostas pró-inflamatórias mediadas por IL-2, IL-12, TNF α e IFN γ , conseqüentes à expansão clonal de células T CD4 $^{+}$ auxiliaadoras e citotóxicas, levam à rejeição do feto (RAGHUPATHY, 1997; INNES et al., 2002; STASKA et al., 2003). Em uma gestação normal, o sistema imune das fêmeas passa por uma imunomodulação fisiológica, envolvendo a alta produção de citocinas regulatórias de padrão Th2, como TGF β , IL-4, IL-5 e IL-10, produzidas na interface materno-fetal por trofoblastos, com o intuito de neutralizar os efeitos promovidos pelas citocinas de padrão Th1 (ENTRICAN et al., 2001; INNES et al., 2002). A alta concentração local de certos hormônios gestacionais, como a progesterona e prostaglandina E $_2$, levam a produção de citocinas por linfócitos T para o fenótipo Th2, mesmo em células apresentando padrão Th1 estabelecido (PICCINNI et al., 1995; KALINSKI, et al., 1997). As células binucleadas trofoblásticas bovinas podem desempenhar um papel importante na criação deste microambiente propício à infecção transplacentária por *N. caninum*, uma vez que migram entre as porções maternas e fetais da placenta, produzem grandes quantidades de progesterona e taquizoítas apresentam rápida multiplicação em cultivo primário destas células (MACHADO et al., no prelo).

3. DISCUSSÃO GERAL

Os dados até aqui discutidos sugerem uma modulação da resposta imune dos cães durante a fase aguda da infecção pelo parasito (Figura 39). A diferença encontrada, em relação ao modelo de fêmeas gestantes, é que esta imunomodulação aparentemente não é dependente de fatores fisiológicos, como àqueles decorrentes da gestação, mas sim causada pelo próprio *N. caninum*. O padrão de cinética de células CD4⁺ e CD8⁺, bem como a queda de expressão de MHC classe II nos linfonodos poplíteos, indicaram ausência ou baixa resposta celular induzida pelo parasito nos primeiros 60 dpi. KLEVAR e colaboradores (2007) observaram uma anergia inicial em relação ao aumento de células com fenótipos CD4⁺ e CD8⁺, bem como um decréscimo nas contagens de células NK, durante a fase aguda da infecção em camundongos. Aparentemente a diferença entre os modelos se refere ao período de duração da fase aguda da infecção, provavelmente devido à realização da reprodução sexuada do *N. caninum*.

Nos diferentes grupos experimentais analisados, pode-se observar que o período compreendido pós-60 dpi corresponde precisamente ao período de expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, demonstrando que realmente os cães apresentam alternâncias de perfil de resposta imune durante a fase aguda na infecção oral por *N. caninum*, e que quantidades significativas de células efetoras e citocinas pró-inflamatórias só se elevam após 2 meses de infecção. Da mesma maneira, picos de produção de IgG₂ e, principalmente, IgE específicos ao parasito foram detectados após períodos de queda na produção de marcadores CD4⁺ e CD8⁺ e correspondente expressão de citocinas pró-inflamatórias. Tal padrão de produção de anticorpos foi observado após a imunização de camundongos com lisado de taquizoítas (LUNDÉN et al., 2002, TEIXEIRA et al., 2005), enquanto que a presença de anticorpos com este perfil pode estar relacionada à eliminação precoce de parasitos em camundongos vacinados com NcSRS2 recombinante (NISHIKAWA et al., 2001b).

Apesar da importância da resposta imune mediada por células para o controle de uma infecção, o envolvimento exacerbado de linfócitos com padrão Th1 pode levar o hospedeiro a desenvolver imunopatologias (JANEWAY et al., 2005). A infecção por *N.*

caninum em camundongos geralmente apresenta um baixo nível de comprometimento clínico dos animais, porém a transferência de células T CD4+ e CD8+ ativadas para camundongos desafiados com o protozoário precipitam o aparecimento de sinais neurológicos (SPENCER et al., 2005). Este trabalho mostrou condições propícias para que células com perfil Th-17 entrem em expansão clonal na infecção subclínica canina. Em camundongos, sabe-se que células T regulatórias, linfócitos importantes no controle de inflamações excessivas, participam de forma ativa da infecção (TEIXEIRA et al., 2006). Sendo assim, o envolvimento da exacerbação de respostas inflamatórias em casos de neosporose clínica canina deve ser alvo de estudos futuros. Uma opção para modelos de doença clínica em cão poderia ser a infecção de embriões de galinha. Dentre os pintos originados de ovos infectados, 50% apresentaram sintomatologia clínica como perda de coordenação motora, movimentos circulares e ataxia de membros (FURUTA et al., encaminhado para publicação).

A fase aguda da infecção oral por *N. caninum* em cães é marcada pela eliminação de oocistos, os quais são detectados nas fezes durante os primeiros 30-40 dias de infecção (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2002; FURUTA et al., encaminhado para publicação). Os resultados aqui obtidos sugerem que o parasito induz um padrão de imunidade tipo Th2 nos cães durante o período em que o *N. caninum* realiza sua merogonia. De forma semelhante, a infecção por *Eimeria papilata* induz uma imunossupressão inicial no intestino de camundongos, mediada principalmente por citocinas com padrão Th2 (SCHITO et al., 1998), fato observado também na infecção de galinhas por *E. maxima*, onde o início da infecção é marcado por uma dualidade de padrão de respostas, com aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, queda de contagens de células CD4+ e CD8+, além de uma queda na expressão de IFN γ (HONG et al., 2006).

Diferentemente do período de liberação inicial de oocistos relatada na literatura, há uma escassez de informações na literatura sobre o comportamento do parasito no cão pós-30 dpi. Sabe-se que cães que apresentaram liberação de oocistos podem voltar a eliminar as formas sexuadas do parasito após alguns meses da primo-infecção, sendo re-infectados ou não (McGARRY et al., 2003; GONDIM et al., 2005). Até mesmo durante este período inicial, não há informações sobre a localização intestinal ou quais

formas estão envolvidas em seu ciclo sexuado. Estudos sobre o comportamento do parasito em seus hospedeiros definitivos são necessários para se elucidar os eventos relacionados à infecção oral de cães por *N. caninum*. Adicionalmente, estudos sobre infecções simultâneas podem esclarecer possíveis sinergias entre *N. caninum* e outros agentes patogênicos. A interação de *T. gondii* com FIV gera uma redução da expressão das citocinas IL-2, IL-6, IL-12 e IFN γ em gatos co-infectados, porém o desafio somente com *T. gondii* leva a um aumento das citocinas pró-inflamatórias, enquanto que os gatos FIV+/*T. gondii* – apresentavam baixos níveis de IL-2 e IL-12 (LEVY et al., 2004). Estes dados sugerem que FIV seja um agente primário, enquanto que *T. gondii* demonstre um perfil potencializador e oportunista. Os dados descritos neste trabalho indicam que *N. caninum* se assemelhe mais a um agente primário nos cães, por modular a resposta do seu hospedeiro definitivo como a *Eimeria* spp durante a fase de reprodução sexuada, enquanto que o *T. gondii* demonstra um perfil inverso (HONG et al., 2006; LEVY et al., 2004; SCHITO et al., 1998).

Fatores imunes que poderiam justificar a maior resistência de cães adultos à infecção por *N. caninum*, tendo como base a eliminação de oocistos como fator de susceptibilidade (GONDIM et al., 2005), também foram indicados neste estudo. Foi identificado que a própria ontogenia do sistema imunológico pode ser a origem desta susceptibilidade, uma vez que todos os ensaios utilizados para mensurar a presença de anticorpos totais, não específicos ao parasito, se encontraram em baixos níveis nos cães jovens, apresentando elevação gradual no decorrer do experimento. Em contrapartida, a concentração sérica dos mesmos isotipos mostrou-se mais constante nos animais adultos durante os 250 dias analisados. O incremento nas concentrações de diferentes isotipos com o decorrer da idade no cão tem perfil semelhante a aquele observado para outras espécies de mamíferos, como o homem (PASTORET et al., 1998). Neste aspecto, a diferença mais marcante entre as faixas etárias analisadas se mostra na produção de IgG₁. Esta subclasse responde por 46% da IgG produzida em animais saudáveis e é um importante marcador de respostas imunes do tipo Th1 (MAZZA et al., 1994). Outros fatores que podem influenciar na susceptibilidade dos animais jovens são a menor porcentagem e expressão de moléculas de CD8 em linfócitos T, os quais demonstram níveis muito baixos durante os primeiros 60 dpi nos

animais jovens, bem como uma maior queda na expressão de MHC de classe II detectada no linfonodo poplíteo durante a fase aguda da infecção.

Com base nos resultados obtidos por este trabalho e a avaliação de resultados presentes na literatura científica disponível, podemos afirmar que *N. caninum* induz uma imunossupressão dos cães durante a fase aguda da infecção, uma vez que vários parâmetros responsáveis pela resistência de hospedeiros frente ao próprio parasito, bem como outros modelos de protozoários, se encontram diminuídos nos primeiros dois meses de infecção. Apesar dos animais não apresentarem sinais clínicos decorrentes da infecção experimental por *N. caninum*, o parasito foi capaz de se reproduzir sexuadamente em seus hospedeiros definitivos. Pode-se inferir que esta baixa virulência apresentada por *N. caninum* frente ao cão, no que se refere à indução da doença clínica, se deva ao fato do parasito ter co-evoluído com seu hospedeiro definitivo durante milhões de anos. Em comparação ao *T. gondii*, *N. caninum* se demonstra menos virulento, e uma das explicações plausíveis para este fato é seu maior período de adaptação aos seus hospedeiros desde a separação de ambas as espécies de um parente evolutivo comum (SU et al., 2003). Todos os modelos de parasitismo estão sujeitos à pressão seletiva por parte dos agentes, bem como dos hospedeiros. Estas pressões seletivas são responsáveis por uma queda na virulência dos parasitos que tendem a co-existir com seus hospedeiros. Pode-se constatar neste trabalho que a interação entre hospedeiros e parasitos não apresentou características deletérias para ambos. Porém, a produção de oocistos em cães por *N. caninum* induz altas perdas econômicas na bovinocultura (TREES et al., 1999). Sendo assim, faz-se necessário o controle da transmissão horizontal do parasito aos bovinos e sugere-se que a produção de vacinas seja destinada aos cães, uma vez que são os maiores responsáveis pela disseminação do agente. Com este intuito, é necessário que se desenvolvam terapias capazes de eliminar o poder de evasão do parasito sobre seu hospedeiro definitivo, quebrando assim a dormência das respostas imunes do tipo Th1 durante a fase aguda da infecção de cães por *N. caninum*.

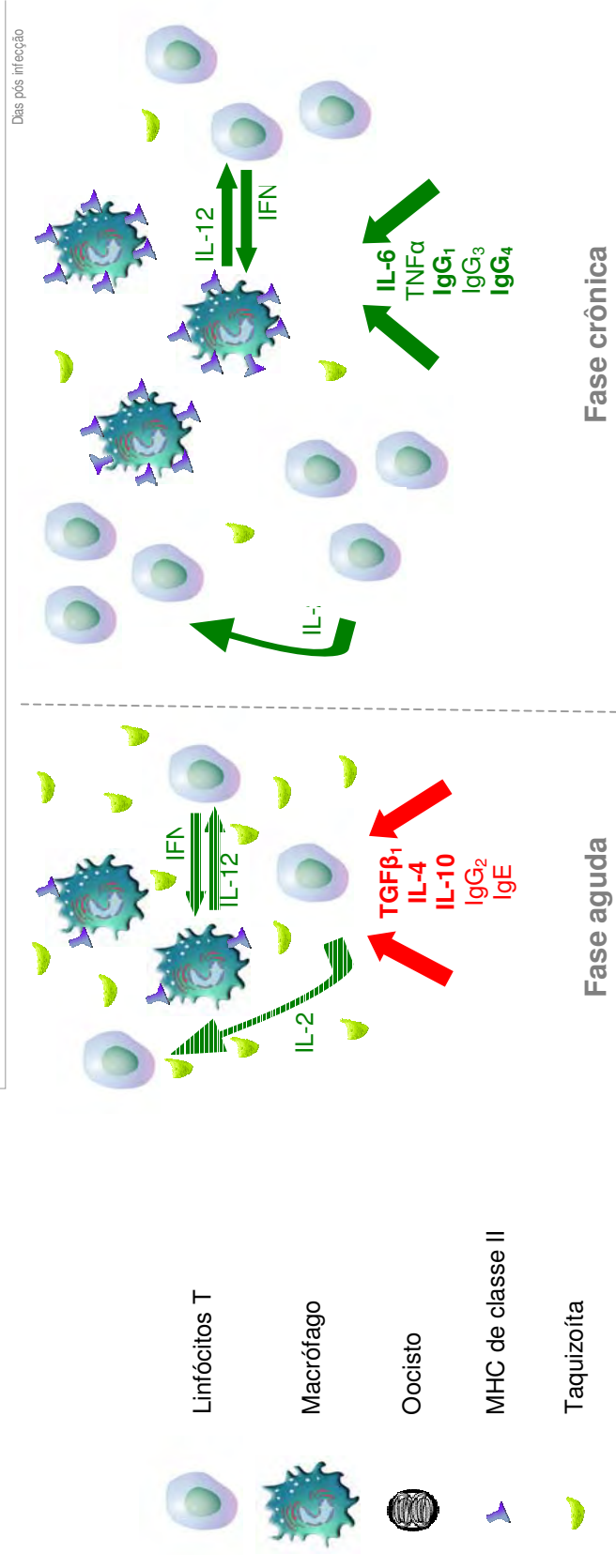
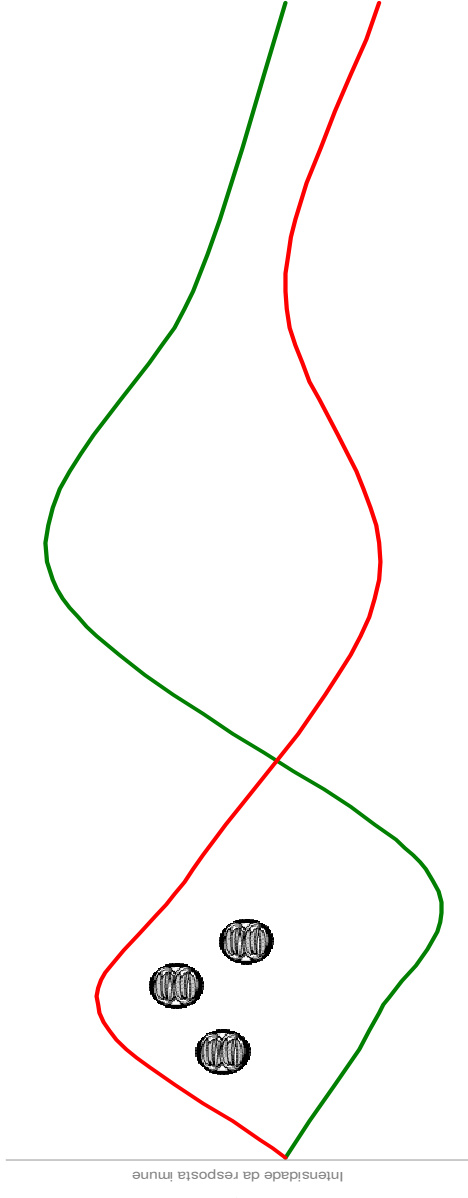
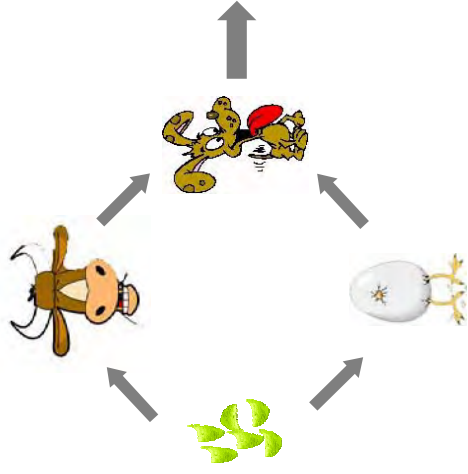


Figura 39: Proposta para os eventos desencadeados pela infecção oral por *N. caninum* em cães, com base nos dados obtidos com este trabalho. Após a ingestão de tecidos experimentalmente infectados, cães apresentam uma redução drástica no padrão de resposta Th1 (linha verde) e elevação nas respostas imunes de padrão Th2 (linha vermelha), período em que está compreendida a liberação de oocistos. Este padrão de resposta se mostra incapaz de inibir a replicação do parasito nos diferentes tecidos dos animais. Esta imunomodulação é mediada principalmente por $TGF\beta_1$, IL-10 e IL-4, os quais inibem a expressão de IL-2, IL-12 e $IFN\gamma$, que por sua vez levam a uma redução da expansão clonal de linfócitos T, baixa expressão de MHC de classe II e conseqüente ausência de ativação de macrófagos. Em contrapartida, após as maiores quedas nos parâmetros de resposta imune com padrão Th1 serem registradas aos 60 dpi, há uma inversão no padrão de imunidade frente à infecção, onde se observa picos de proliferação de células T, expressão de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos IgG. Esta mudança é decorrente da alta expressão de IL-2, IL-12 e $IFN\gamma$, sendo modulada principalmente por IL-6 e IgG_1 . Além disso, esta alteração leva a um controle da infecção levando ao fim da fase aguda, por meio da inibição da replicação dos parasitos, que provavelmente realizam interconversão de estágio e se mantêm quiescentes em forma de cistos teciduais.

4. CONCLUSÕES

- Conclui-se que há uma maior susceptibilidade de cães jovens à infecção oral por *N. caninum*, em relação a animais adultos;
- O resultado da infecção com diferentes fontes de inóculos administrados aos cães diverge quanto à eliminação de oocistos, porém se mostram semelhantes quanto aos perfis de imunidade induzidos;
- A infecção oral de cães por *N. caninum* leva a uma prolongada fase aguda, demonstrando durante este período uma diminuição nos níveis de células T CD4+ e CD8+, queda na expressão de MHC de classe II e momentos de anergia frente a estímulos exógenos, caracterizando uma resposta imunoregulatória frente à infecção pelo protozoário. Houve uma mudança de perfil da resposta imune celular somente após dois meses de infecção;
- A resposta imune humoral específica contra *N. caninum* revela três momentos distintos: Uma primeira fase com fraca produção de anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG e suas subclasses, produção somente de IgG₁ (Adultos) e IgG₃ (Filhotes) entre 2 e 3 meses de infecção e, em uma terceira fase, picos de produção de todos os isótipos analisados, principalmente em cães jovens;
- A RIFI possui baixa sensibilidade para a detecção de anticorpos produzidos na fase inicial da infecção, sendo por isso recomendável que o diagnóstico de cães com suspeita clínica seja realizado também pelo ELISA. No entanto, a RIFI se mostra mais sensível na detecção de anticorpos produzidos tardiamente;

- A expressão de citocinas em cães jovens infectados oralmente demonstra que os animais apresentam uma resposta predominantemente imunoregulatória durante a fase aguda, modulada principalmente por $TGF\beta_1$, porém com participações de IL-10 e, tardiamente, de IL-4. Esta fase coincide com o período em que o parasito realiza sua merogonia;

- A expressão de citocinas pró-inflamatórias como $IFN\gamma$, IL-6 e IL-12, associados à resistência frente à infecção pelo parasito, só ocorre efetivamente após os dois meses de infecção;

- O pico de expressão de IL-2 se mostrou muito tardio e está relacionado diretamente à ausência de expansão clonal de linfócitos T durante a fase aguda.

5. REFERÊNCIAS

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Reporto f the AVMA panel on Euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 5, p. 669-696, 2001.

AMMANN, P.; WALDVOGEL, A.; BREYER, I.; ESPÓSITO, M.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B. The role of B- and T-cell immunity in toltrazuril-treated C57BL/6 WT, /MT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 93, n. 3, p. 178–187, 2004.

ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; HOFFMAN, R. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 283-7, 1995.

ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 2, p. 241-4, 1991.

ANDRIANARIVO, A. G.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 817–825, 2001.

ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from rural and urban origin in central New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, n. 5, p. 232-237, 2003.

BAKER, D. G.; MORISHITA, T. Y.; BROOKS, D. L.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 783-785, 1995.

BARBER, J. S.; GASSER, R. B.; ELLIS, J. T.; REICHEL, M. P.; McMILLAN, D.; TREES, A. J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 1056-1058, 1997.

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**, v. 71, n. 2, p. 236-242, 1994.

BARTLEY, P. M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S. W.; SCHOCK, A.; RAE, A. G.; HAMILTON, C.; INNES, E. A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 81-91, 2004.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 3-4, p. 299-303, 2005.

BASZLER, T. V.; LONG, M. T.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Interferon-g and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1635–1646, 1999.

BELO, M. A. A.; REZENDE, L. M.; COSTA, A. J. Presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos com histórico de abortos não diagnosticados etiologicamente. **In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 11, 1999, Salvador, Anais... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999a, p.229.

BELO, M. A. A.; REZENDE, L. M.; CASTAGNOLLI, K. L.; BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães criados sob diferentes condições sanitárias. **In:** Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 11, 1999, Salvador, Anais... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999b, p.228.

BJERKÅS, I.; PRESTHUS, J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 445–54, 1988.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271–4, 1984.

BJÖRKMAN, C.; ALENIUS, S.; EMANUELSSON, U.; UGGLA, A. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in swedish dairy cows in relation to abortion. **The Veterinary Journal**, v. 159, n. 2, p. 201–206, 2000.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-507, 1999.

BODAS, M.; JAIN, N.; AWASTHI, A.; MARTIN, S.; PENKE LOKA, R. K.; DANDEKAR, D.; MITRA, D.; SAHA, B. Inhibition of IL-2 induced IL-10 production as a principle of phase-specific immunotherapy. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4636-4643, 2006.

BOTELHO, A. S.; TEIXEIRA, L.; CORREIA-DA-COSTA, J. M.; FAUSTINO, A. M.; CASTRO, A. G.; VILANOVA, M. *Neospora caninum*: high susceptibility to the parasite in C57BL/10ScCr mice. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 68-75, 2007.

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, n. 2, p. 953-960, 2006.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CHEADLE, M. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 85, n. 4, p.325-330, 1999.

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. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2491-2494, 2006.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. L. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina Londrina**, v. 22, p. 57-62, 2001.

DAVISON, H.; OTTER, A.; TREES, A. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999.

DE SMEDT, T.; PAJAK, B.; MURAILLE, E.; LESPAGNARD, L.; HEINEN, E.; DE BAETSELIER, P.; URBAIN, J.; LEO, O.; MOSER, M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p. 1413-1424, 1996.

DEMAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1647–1657, 1999.

DENKERS, E. Y.; SCHARTON-KERSTEN, T.; BARBIERI, S.; CASPAR, P.; SHER, A. A role for CD4⁺ NK1.1⁺ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8⁺ effector function against intracellular infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 1, p. 131-139, 1996.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, D.; SHER, A. Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 5, p. 1465-1472, 1993.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 3-4, p. 161-169, 2003.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002.

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 colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 747–52, 2001.

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

DUBEY, J. P. Recent Advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367, 1999.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 1–59, 1996.

DUBEY, J. P.; COSENZA, S. F.; LIPSCOMB, T. P.; TOPPER, M. J.; SPEER, C. A.; HOBAN, L. D.; DAVIS, S. W.; KINCAID, A. L.; SEELY, J. C.; MARRS JR., G. E. Acute sarcocystosis-like disease in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 3, p. 439-443, 1991.

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, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

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

ELLIS, J. T. *Neospora caninum*: prospects for diagnosis and control using molecular methods. In: SHIRKEY, M. W., TOMLEY, F.M., FREEMAN, B. M. **Control of Coccidiosis into the Next Millenium**. Institute for Animal Health, Compton Newbury, Berks, Grã-Bretanha, 1997. p. 80.

ENTRICAN, G.; BUXTON, D.; LONGBOTTOM, D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 94, n. 6, p. 273-277, 2001.

EPERON, S.; BRONNIMANN, K.; HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 5, p. 225-236, 1999.

FREYRE, A.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; GASTELL, T.; VENZAL, J. M. *Toxoplasma gondii*: cross-immunity against the enteric cycle. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 48-52, 2007.

FURUTA, P. I.; MINEO, T. W. P.; CARRASCO, A. O. T.; GODOY, G. S.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in poultry and embryonated eggs. **Parasitology**, submetido para publicação.

GADDI, P. J.; YAP, G. S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, aceito para a publicação.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 23-28, 2004.

GENNARI, S. M.; YAI, L. E.; D'AURIA, S. N.; CARDOSO, S. M.; KWOK, O. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 177-179, 2002.

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

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, n. 2, p. 159-161, 2004.

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

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

HAQUE, S.; HAQUE, A.; KASPER, L. H. A *Toxoplasma gondii*-derived factor(s) stimulates immune downregulation: an *in vitro* model. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3442-3447, 1995.

HAQUE, S.; KHAN, I.; HAQUE, A.; KASPER, L. H. Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 2908-2916, 1994.

HASEGAWA, M. Y. *Soroprevalência de anticorpos contra Neospora caninum em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré, SP.* 2000, 50 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M. Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 837-846, 2007.

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

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v. 43, p. 47-104, 1999.

HIGA, A. C.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 91-95, 2000.

HONG, Y. H.; LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P.; LEE, S. H. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3-4, p. 259-272, 2006.

HUNTER, C. A.; REINER, S. L. Cytokines and T cells in host defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 413-418, 2000.

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MacALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, 2005.

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

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

INNES, E.A.; PANTON, W.; MARKS, J.; TREES, A.; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H Uracil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. , p. 95-100, 1995.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 6 ed. Garland Science, 2005. 823 p.

JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 185-191, 2002.

KAGAN, J. C.; MEDZHITOV, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 943-955, 2006.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 78-83, 2001.

KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; SNIJDERS, A.; SNIJDEWINT, F. G.; KAPSENBERG, M. L. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 1, p. 28-35, 1997.

KANO, R.; MASUKATA, Y.; OMATA, Y.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; SAITO, A. Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 159-164, 2005.

KASPER, L. H.; KHAN, I. A. Antigen-specific CD8⁺ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4, p. 1554-1560, 1998.

KELLER, C. C.; YAMO, O.; OUMA, C.; ONG'ECHA, J. M.; OUNAH, D.; HITTNER, J. B.; VULULE, J. M.; PERKINS, D. J. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5249-5260, 2006.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 4, p. 185-195, 1995.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 24-34, 1997.

KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A. K.; MOLDAL, T.; BJORKMAN, C.; OLSEN, I. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3-4, p. 329-339, 2007.

KODYM, P.; MACHALA, L.; ROHACOVA, H.; SIROCKA, B.; MALY, M. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 1, 40-47, 2007.

LANG, C.; ALGNER, M.; BEINERT, N.; GROSS, U.; LUDER, C. G. Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 1994-2005, 2006.

LEVY, J. K.; LIANG, Y.; RITCHEY, J. W.; DAVIDSON, M. G.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. Failure of FIV-infected cats to control *Toxoplasma gondii* correlates with reduced IL2, IL6, and IL12 and elevated IL10 expression by lymph node T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, n. 1-2, p. 101-111, 2004.

LIAO, M.; MA, L.; BANNAI, H.; LEE, E. G.; XIE, Z.; TANG, X.; ZHANG, H.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Identification of a protein disulfide isomerase of *Neospora caninum* in excretory-secretory products and its IgA binding and enzymatic activities. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, 47-56, 2006.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H.; 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**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LUDER, C. G.; LANG, T.; BEUERLE, B.; GROSS, U. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 112, n. 2, p. 308-16, 1998.

LUNDÉN, A.; WRIGHT, S.; ALLEN, J. E.; BUXTON, D. Immunisation of mice against neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 867-876, 2002.

LUNDÉN, A.; MARKS, J.; MALEY, S.; INNES, E. A. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 11, p. 519-526, 1998.

MACHADO, R. Z.; MINEO, T. W. P.; LANDIM JR, L. P.; CARVALHO, A. F.; GENNARI, S. M.; MIGLINO, M. A. Possible role of bovine trophoblast giant cells in transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, no prelo.

MARKS, J.; LUNDEN, A.; HARKINS, D.; INNES, E.A. Identification of *Neospora* antigens recognised by CD4 + T-cells and immune sera from experimentally infected cattle. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 7, p. 303-309, 1998.

MAZZA, G.; WHITING, A. H.; DAY, M. J.; DUFFUS, W. P. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG subclasses in the serum of normal and diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 2, p. 133-139, 2004.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLIS, R. A.; McGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

McGARRY, J. W.; STOCKTON, C. M.; WILLIAMS, D. J.; TREES, A. J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 628-630, 2003.

McGUIRE, A. M.; McALLISTER, M. M.; WILLS, R. A.; TRANAS, J. D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1525-1529, 1999.

MINEO, T. W. P.; CARRASCO, A. O. T.; MARCIANO, J. A.; RASO, T.; WERTHER, K.; PINTO, A. A., MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: serological and immunohistochemical findings in wild and captive birds. **Parasitology**, submetido para publicação.

MINEO, T. W. P.; ALENIUS, S.; NASLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 4, p. 188-192, 2006.

MINEO, T. W. P.; MARCIANO, J. A.; CARRASCO, A. O. T.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Experimental infection of pigeons (*Columbia livia*) by *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. In: 1o. SIMPÓSIO SOBRE NEOSPOORA CANINUM NO BRASIL, 2005, São Paulo, SP... Anais do 1o. Simpósio sobre *Neospora caninum* no Brasil. Jaboticabal, SP: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2005.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D.A.O.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 414-417, 2004.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; COSTA, G. H. N.; von ANCKEN, A. C. B.; KASPER, L. H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 239-245, 2001.

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

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clinical and Laboratory Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 811-817, 2001a.

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

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. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 175-184, 2003.

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

PARÉ, J.; THURMOND, M.; HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 2, p. 133-139, 1996.

PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. **Handbook of Vertebrate Immunology**. 1 ed. Academic Press, 1998. 673 p.

PATITUCCI, A. N.; PHIL, M.; PÉREZ, M. J.; ROZAS, M. A.; ISRAEL, K. F. Canine neosporosis: presence of serum antibodies in rural and urban dog populations from Chile. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 3, p. 252-255, 2001.

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acid Research**, v. 29, n. 900, p. 2002-2007, 2001.

PICCINNI, M. P.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; BELONI, L.; GIANNARINI, L.; SAMPOGNARO, S.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F.; LIVI, C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 1, p. 128-133, 1995.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, M. F.; PAULE, B.; VALE, V.; RIBEIRO, M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R. E.; ALMEIDA, M. A.; MEYER, R.; FREIRE, S. M. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 73-79, 2005.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L., FREIRE, S. M., MEYER, R., ALMEIDA, M. A., TARDY, M., EL BACHA, R., COSTA, M. F. *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. **Experimental Parasitology**, v.112, n. 3, p.193-197, 2006.

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

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immunemediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v.18, n. 9, p. 391-394, 2002.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p. 161-168, 2003.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478–482, 1997.

REIS E SOUSA, C.; YAP, G.; SCHULZ, O.; ROGERS, N.; SCHITO, M.; ALIBERTI, J.; HIENY, S.; SHER, A. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. **Immunity**, v. 11, n. 5, p. 637-647, 1999.

RETTIGNER, C.; LECLIPTEUX, T.; DE MEERSCHMAN, F.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 225-232, 2004.

RISCO-CASTILLO, V.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Comparative analysis of stress agents in a simplified in vitro system of *Neospora caninum* bradyzoite production. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 466-470, 2004.

RODRIGUES, A. A.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 3-4, p. 139-50, 2004.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; SEABRA, S.; SANT'ANNA, C.; GONCALVES, J. G.; BOZZA, M.; MOURA-NETO, V.; DE SOUZA, W. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 4, p. 1021-1031, 2005.

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

SAWADA, M.; PARK, C. H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T.; HARITANI, M. Pathological findings of nude mice inoculated with bovine *Neospora*. **Journal of Veterinary Medical Science – Series B**, v. 59, n. 10, p. 947-948, 1997.

SCHARES, G.; HEYDORN, A. O.; CÜPPERS, A.; CONRATHS, F. J.; MEHLHORN, H. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 873-877, 2001.

SCHITO, M. L.; CHOBOTAR, B.; BARTA, J. R. Cellular dynamics and cytokine responses in BALB/c mice infected with *Eimeria papillata* during primary and secondary infections. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 328-337, 1998.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 4, p. 321-327, 1999.

SHIN, Y. S.; LEE, E. G.; SHIN, G. W.; KIM, Y. R.; LEE, E. Y.; KIM, J. H.; JANG, H.; GERSHWIN, L. J.; KIM, D. Y.; KIM, Y. H.; KIM, G. S.; SUH, M. D.; JUNG, T. S. Identification of antigenic proteins from *Neospora caninum* recognized by bovine immunoglobulins M, E, A and G using immunoproteomics. **Proteomics**, v. 4 n. 11, p. 3600-3609, 2004.

SHIN, Y. S.; LEE, E. G.; JUNG, T. S. Exploration of immunoblot profiles of *Neospora caninum* probed with different bovine immunoglobulin classes. **Journal of Veterinary Sciences**, v. 6, p. 2, p. 157-60, 2005.

SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 181-195, 2002.

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

SILVA, D. A. O.; VITALIANO, S. N.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1212-1216, 2005.

SPENCER, J. A.; HIGGINBOTHAM, M. J.; YOUNG-WHITE, R. R.; GUARINO, A. J.; BLAGBURN, B. L. *Neospora caninum*: adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 3-4, p. 329-333, 2005.

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, n. 6, p. 3272–3279, 2003.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, p. 414-416, 2003.

TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 183-191, 2000.

TEIXEIRA, L.; BOTELHO, A. S.; BATISTA, A. R.; MEIRELES, C. S.; RIBEIRO, A.; DOMINGUES, H. S.; CORREIA DA COSTA, J. M.; CASTRO, A. G.; FAUSTINO, A. M.; VILANOVA, M. Analysis of the immune response to *Neospora caninum* in a model of intragastric infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 1, p. 23-36, 2007.

TEIXEIRA L.; MARQUES, A.; MEIRELES, C. S.; SEABRA, A. R.; RODRIGUES, D.; MADUREIRA, P.; FAUSTINO, A. M.; SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; CORREIA DA COSTA, J. M.; CANADA, N.; VILANOVA, M. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. **Immunology**, v. 116, n. 1, p. 38-52, 2005.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária: Uma introdução**. 5 ed. Editora ROCA LTDA., 1998. 545 p.

- 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, n. 5, p. 765-767, 1999.
- TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1195–1200, 1999.
- TREES, A. J.; McALLISTER, M. M.; GUY, C. S.; McGARRY, J. W.; SMITH, R. F.; WILLIAMS, D. J. L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 147–154, 2002.
- TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.
- VITALIANO, S. N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 253-260, 2004.
- VONLAUFEN, N.; MULLER, N.; KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; BOHNE, W.; McALLISTER, M. M.; BJORKMAN, C.; MULLER, E.; CALDELARI, R.; HEMPHILL, A. Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 1253-1265, 2002.
- WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum* infected cattle. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 3, p. 61-67, 2006.

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C. S.; MCGARRY, J.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.; MacEACHERN, K.; CRIPPS, P.; KELLY, D.; TREES, A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 347-358, 2000.

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

WU, Y.; WANG, Q. H.; ZHENG, L.; FENG, H.; LIU, J.; MA, S. H.; CAO, Y. M. *Plasmodium yoelii*: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 301-304, 2007.

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. **Journal of Veterinary Medical Sciences - series B**, v. 62, n. 3, p. 347-351, 2000.

6. APÊNDICE

6.1. Lista de reagentes e equipamentos utilizados

A

- . *Ácido sulfúrico*: Synth – Labsynth Produtos para Laboratório LTDA., São Paulo, SP.
- . *Agulhas e seringas*: BD – Becton, Dickson and Co., Franklin Lakes, NJ, EUA.
- . *Anti-helmínticos*: Petzi Plus – Vetbrands, Paulínia, SP.
- . *Aparelho de citometria de fluxo*: FacSort – BD.
- . *Azul de Evans*: Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.

B

- . *BCA Protein Assay* (Ácido biquinonínico): Pierce – ThermoFisher Co., Rockford, IL, EUA.
- . *Bicarbonato de sódio*: Merck.
- . *Biofotometro*: Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha.
- . *BSA*: Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA.

C

- . *Clorofórmio PA*: Merck.
- . *Complexo ABC* (Link biotilado e Estreptoavidina-HRPO): Dakocytomation – Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca.
- . *ConA*: Sigma Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA.
- . *Centrifuga de tubos cônicos*: Fanem LTDA., São Paulo, SP.
- . *Centrífuga de microtubos*: Eppendorf.

D

- . *DAB* (Diaminobenzidina): Sigma.

E

- . *Enzima Multiscribe e mix inibidor de RNase*: Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA.
- . *Eosina*: Merck.
- . *Estreptomicina e Anfotericina B*: Gibco.

F

- . *FACS Lysing Solution*: BD.
- . *Formol*: Synth.
- . *Fotodocumentador*: Kodak – Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA.
- . *Frasco de cultivo celular de 25 cm²*: TPP – Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça.

GH

- . *Hematoxilina de Harris*: Merck.
- . *Histopaque 1077*: Sigma.

I

- . *IgG de camundongo anti-iNOS*: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA.
- . *IgG de camundongo anti-MHC de classe II humano (HLA-DR)*: Dako.
- . *IgG de cabra anti-IgA canina-HRPO*: Bethyl, Inc., Montgomery, TX, EUA.
- . *IgG de cabra anti-IgE canina-HRPO*: Bethyl.
- . *IgG de cabra anti-IgG₁ canino*: Bethyl.
- . *IgG de cabra anti-IgG₂ canino*: Bethyl.
- . *IgG de cabra anti-IgM bovina-FITC*: KPL – Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MA, EUA.
- . *IgG de cabra anti-IgM canina-FA*: KPL.
- . *IgG de cabra anti-IgM canina-FITC*: KPL.
- . *IgG de camundongo anti-CD163 humano*: Dako.

- . *IgG de camundongo anti-CD3 humano*: Dako.
- . *IgG de camundongo anti-CD79 humano*: Dako.
- . *IgG de coelho anti-IgG bovinos-FITC*: Sigma.
- . *IgG de coelho anti-IgG canina-FITC*: Sigma.
- . *IgG de coelho anti-IgG canina-FA*: Sigma.
- . *IgG de coelho anti-IgG canina-HRPO*: Sigma.
- . *IgG de coelho anti-IgG de camundongo-FA*: Sigma.
- . *IgG de coelho anti-TGF β ₁*: Santa Cruz.
- . *IgG₁ de rato anti-CD8 canino-PE*: AbD Serotec, Oxford, Inglaterra.
- . *IgG₁ de rato anti-hapteno de dinitrofenil-PE*: Serotec.
- . *IgG_{2a} de rato anti-CD4 canino-FITC*: Serotec
- . *IgG_{2a} de rato anti-hapteno de dinitrofenil-FITC*: Serotec.
- . *Incubadora de ovos embrionados*: IP-130 – Premium Ecológica LTDA., Belo Horizonte, MG.

J

K

- . *Kit de extração de RNA total*: SV Total RNA Isolation System – Promega Co., Madison, WI, EUA.
- . *Kits de dosagem de anticorpos caninos totais (IgG, IgG₁, IgG₂, IgA, IgE)*: Bethyl.

L

- . *Lâminas de Imunofluorescência*: Perfecta, São Paulo, SP.
- . *Leite desnatado em pó*: Molico desnatado – Nestlé S.A., Vevey, Suíça.
- . *Leitor de placas*: Dynex Technologies, Chantilly, VA, EUA.

M

- . *Master mix*: TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix – Applied Biosystems.
- . *Meio de cultura RPMI 1640*: Sigma.
- . *Membrana de nitrocelulose (poros de 45 μ m)*: Sigma.

- . *Microscópio equipado com luz fluorescente*: Modelo – Nikon Co., Tóquio, Japão.
- . *Microscópio ótico*: E200 – Nikon.

N

O

- . *Ovos embrionados de galinha* (Linhagem comercial de corte): Hy-line do Brasil, Nova Granada, SP.

P

- . *Padrão de peso molecular*: Wide range – Sigma.
- . *Peróxido de hidrogênio*: Merck.
- . *Phase Lock Gel Heavy* (2 ml): Eppendorf.
- . *Placa de cultivo celular*: TPP.
- . *Placas de 96 cavidades para PCR*: Greiner Bio-One Brasil, São Paulo, SP.
- . *Placas de ELISA Immuno Plate Maxisorp*: Nunc A/S – Thermofisher Co., Roskilde, Dinamarca.
- . *Placas de ELISA Nunclon Delta Surface*: Nunc.
- . *pNPP*: Sigma.
- . *Poli-L-lisina*: Sigma

Q

R

- . *Retículo quadriculado*: Nikon.

S

- . *SFB*: Gibco.
- . *Software Abi Prism 7000 SDS*: Applied Biosystems.
- . *Software CellQuest*: BD.
- . *Software Kodak 1D*: Kodak.

I

- . *T-61* (Iodeto de mebezônio, Embutramida, Cloridrato de tetracaína): Intervet, Akzo Nobel, Arnhem, Holanda.
- . *Taqman Assay by Design*: Applied Biosystems.
- . *Termociclador Real time PCR*: Applied Biosystems.
- . *TMB*: KPL.
- . *Trizol*: Invitrogen.
- . *Tubos cônicos de 15 e 50 ml*: TPP.
- . *Tween 20*: GE Healthcare Life Sciences, Gilles, Inglaterra.

UV

- . *Vacinas para cães*: Duramune Max – Fort Dodge, Fort Dodge, IO, EUA.

XZ