



**Universidade Federal de Uberlândia**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia**  
**Aplicadas**

**Imunização de camundongos com antígenos de lisado total (NLA) e de excreção-secreção (NcESA) de *Neospora caninum* associados com oligodeoxinucleotídeo CpG como adjuvante**

**Dâmaso Pacheco Ribeiro**

**Uberlândia - Minas Gerais**

**Agosto – 2008**

**Dâmaso Pacheco Ribeiro**

**Imunização de camundongos com antígenos de lisado total (NLA) e de excreção-secreção (NcESA) de *Neospora caninum* associados com oligodeoxinucleotídeo CpG como adjuvante**

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

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

**Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo**

**Uberlândia - Minas Gerais**

**Agosto – 2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

- R484i Ribeiro, Dâmaso Pacheco, 1982-  
Imunização de camundongos com antígenos de lisado total (NLA) e de excreção-secreção (NcESA) de *Neospora caninum* associados com oligodeoxinucleotídeo CpG como adjuvante / Dâmaso Pacheco Ribeiro. - 2008.  
62 f. : il.
- Orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.  
Co-orientador: José Roberto Mineo  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.
1. Doenças parasitárias - Teses. I. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. II. Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 616.99



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br)  
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



**Dâmaso Pacheco Ribeiro**

**“Imunização de camundongos com antígenos de lisado total e excretado-secretado de *Neospora caninum* associados com oligodeoxinucleotídeo CpG como adjuvante”**

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo – FMRP/USP

Prof. Dra. Neide Maria da Silva – ICBIM/UFU

Prof. Dra. Deise Aparecida Oliveira Silva – ICBIM/UFU

## DEDICATÓRIA

À minha orientadora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva pelo carinho, empenho e dedicação na execução deste trabalho científico,

Aos meus pais, que com amor e carinho construíram as bases da minha existência e me ensinaram os verdadeiros valores da vida,

Aos meus irmãos que são meus grandes companheiros e referência em minha vida, obrigado pela força e incentivo,

À minha avó Francisca que sempre motivou a seguir nos estudos e me ensinou que o conhecimento é uma jóia e que ninguém é capaz de rouba - lá,

Ao meu avô e xará (*in memorian*), que mesmo distante ainda sinto muito orgulho e saudades.....

À minha tia Zélia que por sua missão de educadora sempre me serviu de exemplo e admiração, muito obrigado pelo carinho de mãe,

Ao Marcos Murilo Martins pelo companheirismo e apoio concedido,

Aos meus queridos sobrinhos (Talles, Talissa e Maria Paula) por serem motivo de grandes alegrias em nossas vidas.... espero um dia poder motivá-los a seguir pelo caminho do aprendizado.

À Leandra que sempre foi um anjo em minha vida .....  
obrigado pelo carinho, paciência, incentivo e compreensão

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS,

Pela vida cheia de saúde e graças que me concedeu, por ter sido onipresente nos momentos desafiadores me ajudando a suportá-los, por ter iluminado o caminho que decidi trilhar e pelos grandes presentes que colocou em minha vida.....

Ô Senhor obrigado por tudo!!!

A minha querida orientadora **Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva,**

Por ter me acolhido como um filho no laboratório, e sendo uma boa mãe me ensinou além de técnicas laboratoriais os verdadeiros valores da vida profissional, me ensinando a trabalhar em equipe e tendo a certeza que temos muito a aprender com o próximo; além do mais me ensinou o verdadeiro sentido de gostar daquilo que se faz e partindo dessa premissa, a tentar fazer bem feito, portanto aprendi muito....., porém peço desculpas pelas infinitas vezes que não fui tão bom quanto deveria.

Enfim, tive a honra e o prazer de ter sido orientado por alguém que sempre foi motivo de orgulho e admiração de toda a equipe do laboratório, sendo pra mim uma referência de vida, tanto no aspecto profissional quanto pessoal.

Obrigado pelo carinho, companheirismo, dedicação e apoio nos momentos difíceis, tornando assim possível e prazeroso a execução deste trabalho, e obrigado também por ser um dos grandes presentes que Deus colocou em minha vida.

Ao meu amigo e co-orientador **Dr. José Roberto Mineo,**

Por ter aberto as portas do laboratório e um dia ter permitido conhecer o mundo científico com um olhar crítico e inovador e ao mesmo tempo deslumbrante ao lidar com as descobertas dos segredos da mãe natureza.

Por ser um grande homem, ao ter cumprido com dignidade e competência o papel de mestre, e não ter perdido ao longo dos anos o verdadeiro prazer de ensinar e aprender.

Portanto obrigado pelo carinho, amizade, dedicação ao laboratório e por todas as palavras de apoio que me ajudaram a seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada, pela valiosa contribuição na formação acadêmica.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunologia, *Ana Cláudia, Celene, Cristina, Gabriele, Priscila, Julianne, Anatália, Guilherme, Hugo, Pablo, Álvaro, Hercílio, André*, pelo companheirismo, aprendizagem e constante apoio na rotina laboratorial.

Às amigas e colaboradoras *Marina e Mariana* pelo auxílio na execução do trabalho, pelo carinho, pela valiosa amizade e pelos momentos gratificantes de convívio.

Às grandes amigas e parceiras de laboratório, *Samantha e Taísa*, muito obrigado pelo carinho e apoio concedidos, pelos momentos de aprendizagem e por servirem de exemplo de dedicação e competência.

Aos amigos do laboratório de alergia: *Leandro, Rafael, Jorge, Diego, Ronaldo, Priscila, Karine, Danielle, Juliana, Gesmar*, pelo apoio, pela amizade, pela troca de aprendizado e pelo bom convívio no laboratório, e ao *prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi*, pelo espírito de solidariedade e compreensão de trabalho em equipe.

Aos queridos e prestativos técnicos do Laboratório de Imunologia, *Dona Zilda, Marley* pela solidariedade, companheirismo, apoio e pelos inesquecíveis momentos de convivência .....

Aos secretários do Laboratório, *Max*, e da Pós-Graduação, *Neto, Lucileide, Lucélia*, pela solicitude, dedicação e atenção dispensadas.

Às “meninas da Profa. *Eloísa*”, *Mariana, Bellisa, Priscila, Andressa, Idessânia* e em especial a *Angélica*, que como o nome já diz é um verdadeiro anjo de plantão, me socorreu infinitas vezes quando precisei de ajuda (pesar animais, trocar meio de cultura, salvar células em meio a tempestade, emblocar material .... etc), te admiro muito pela sua humildade, pela sua dedicação e pelo carinho em ajudar o próximo.

Às “meninas da Profa. *Neide*”, *Juliana*, *Ester* e principalmente a *Loyane* pela valiosa ajuda nos procedimentos de imunohistoquímica e histologia e pelos agradáveis momentos de convívio.

À *Profa. Dra. Neide Maria da Silva*, pelo exemplo de profissionalismo, competência e dedicação. Obrigado pelo carinho e atenção que sempre dispensou desde o início da minha carreira acadêmica, pela grande contribuição na execução deste trabalho científico e por ter colaborado no meu crescimento profissional.

Ao *Prof. Dr. João Santana Silva*, pela parceria laboratorial e por ter concedido reagentes para a realização dos experimentos de PCR em tempo real.

Ao *Pós-doutorando Tiago Mineo*, pela valiosa contribuição no trabalho científico através de valiosas sugestões, pela gentileza e presteza em ter me recebido em Ribeirão Preto e permitido aprender novas técnicas laboratoriais, espero que em breve venha fazer parte da nossa equipe ....

Às professoras. *Dra Eloísa Amália Vieira Ferro* e *Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza* pelas sugestões e críticas na banca de qualificação e a *Dra. Márcia Cristina Cury* pela contribuição na avaliação do projeto de pesquisa.

Às amigas *Patrícia de Castilhos*, *Carla Duque*, *Cynthia* e principalmente a *Rúbia*, pelo apoio incondicional, pela amizade e prazerosa convivência.

Aos animais que participaram deste estudo, pela valiosa missão de vida em prol do desenvolvimento da Ciência.

Enfim a todos os demais colegas, amigos, familiares e profissionais que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei  
Eu nada sei ...  
É preciso amor pra poder pulsar,  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso chuva para florir  
Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
Compreender a marcha e ir tocando em frente.  
Todo mundo ama uma dia, todo mundo chora,  
Um dia a gente chega, no outro vai embora.  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
De ser feliz ..."

(SATER; TEIXEIRA, 1992)

## RESUMO

*Neospora caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa que causa doenças neuromusculares em cães e abortos em bovinos, acarretando significativas perdas econômicas. Estudos em modelos murinos têm contribuído para caracterizar novos antígenos e estratégias para procedimentos de vacinação. Oligodeoxinucleotídeos (ODN) com seqüências CpG são considerados potentes imunoadjuvantes para vários patógenos, mas há limitada informação sobre sua utilização em vacinação contra neosporose. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de antígenos de lisado total (NLA) e de excreção-secreção (NcESA) de *N. caninum* combinados com ODN-CpG na indução de resposta imune e proteção contra infecção por *N. caninum* em camundongos. Seis grupos de camundongos C57BL6 foram imunizados subcutaneamente com NLA, NLA+CpG, NcESA, NcESA+CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção), com três reforços em intervalos de 2 semanas. Análises sorológicas mostraram aumento na resposta de IgG2a anti-*N. caninum* em grupos de animais imunizados com qualquer antígeno combinado com adjuvante CpG e níveis elevados do isotipo IgG1 naqueles grupos contendo somente antígenos. Respostas proliferativas após estimulação antigênica *in vitro* foram mais elevadas nos grupos imunizados com antígenos associados com CpG, com alta produção de IL-12, mas camundongos imunizados com NcESA ou NcESA+CpG exibiram maiores níveis de IFN- $\gamma$  e elevada razão IFN- $\gamma$ /IL-10. Após desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas de *N. caninum*, camundongos vacinados com NLA+CpG ou NLA apresentaram os mais baixos escores de morbidade e alterações de peso corporal em comparação aos outros grupos, e nenhum animal sucumbiu à infecção. Em contraste, camundongos vacinados com NcESA+CpG ou NcESA exibiram os mais altos escores de morbidade, alterações de peso corporal e taxas de mortalidade após desafio, associado com a maior carga parasitária cerebral determinada por PCR e imunohistoquímica. Pode-se concluir que ODN-CpG foi capaz de induzir elevada resposta imune humoral e celular do tipo Th1 pela produção de maiores níveis de IgG2a que IgG1 para qualquer antígeno, NLA ou NcESA, e uma forte resposta imune celular associada com altos níveis de IFN- $\gamma$  foi relacionada mais ao antígeno NcESA do que ao adjuvante utilizado. Vacinação com NLA+CpG ou NLA resultou em total proteção dos camundongos enquanto NcESA+CpG ou NcESA induziram maior susceptibilidade dos animais após desafio com *N. caninum*.

**Palavras chave:** *Neospora caninum*, ODN-CpG, adjuvante, vacinação

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is an apicomplexan parasite that causes neuromuscular diseases in dogs and abortion in cattle worldwide, leading to significant economic losses. Studies using murine models have contributed to characterize novel antigens and strategies for successful protocols of vaccination. CpG oligodeoxynucleotides (ODN) have shown to be potent immunoadjuvants for several pathogens, but there is limited information concerning its utilization in vaccination for neosporosis. This study aimed to evaluate the potential of *Neospora* lysate antigen (NLA) or excreted-secreted antigen (NcESA) combined with CpG-ODN in inducing enhanced immune response and protection against *N. caninum* infection in mice. Six groups of C57BL6 mice were vaccinated subcutaneously three times at 2-week intervals with NLA, NLA+CpG, NcESA, NcESA+CpG, CpG (adjuvant control) or PBS (infection control). Serological assays showed an increased IgG2a response in groups of animals immunized with either antigen plus adjuvant and elevated levels of the IgG1 isotype in those presenting antigen preparations alone. Splenocyte proliferative responses upon antigen stimulation *in vitro* were higher in groups immunized with either antigen plus CpG, with increased IL-12 production, but mice immunized with NcESA or NcESA+CpG exhibited higher IFN- $\gamma$  levels and IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio. After a month of the 3<sup>rd</sup> booster and challenge with  $2 \times 10^7$  *N. caninum* tachyzoites, mice vaccinated with NLA+CpG or NLA alone had lower morbidity score and body weight changes in comparison to other groups, and no animal succumbed to infection. In contrast, mice vaccinated with NcESA+CpG or NcESA exhibited the highest morbidity scores, body weight changes and mortality rates after challenge, associated with a greater brain parasite burden determined by PCR and immunohistochemistry. In conclusion, CpG-ODN was able to induce an increased Th1-type immune response as determined by higher levels of IgG2a than IgG1 for either antigen, NLA or NcESA, and a strong cellular immune response associated with high levels of IFN- $\gamma$  was related to the NcESA antigen rather than the adjuvant used. Also, vaccination with NLA+CpG or NLA alone resulted in total protection of mice, while NcESA alone or combined with CpG became mice more susceptible to parasite challenge.

**Key words:** *Neospora caninum*, CpG-ODN, adjuvant, vaccination

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Parasito.....	1
1.2. Hospedeiros intermediários e definitivos.....	1
1.3. Ciclo biológico.....	3
1.4. Transmissão.....	6
1.5. Patogênese e interação parasito-hospedeiro.....	7
1.6. Resposta imune.....	8
1.7. Sinais clínicos.....	9
1.8. Epidemiologia e prevalência.....	10
1.9. Impacto econômico.....	11
1.10. Medidas de controle e vacinação.....	12
1.11. Adjuvantes e ODN-CpG .....	13
2. JUSTIFICATIVAS.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Geral.....	16
3.2. Específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Manutenção e obtenção de parasitos.....	17
4.2. Preparação de antígenos de <i>N. caninum</i> .....	17
4.2.1. Antígeno de lisado de <i>N. caninum</i> (NLA).....	17
4.2.2. Antígeno de excreção-secreção de <i>N. caninum</i> (NcESA).....	18
4.2.3. Taquizoítas íntegros formolizados .....	18
4.3. Oligodeoxinucleotídeo CpG.....	19
4.4. Animais e imunização.....	19
4.5. Avaliação da resposta imune humoral.....	20
4.5.1. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	20
4.5.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) .....	20
4.5.3. SDS-PAGE e <i>immunoblot</i> .....	21
4.6. Avaliação da resposta imune celular.....	22
4.6.1. Análise de proliferação.....	22

4.6.2. Análise de citocinas.....	23
4.7. Desafio e avaliação de parâmetros clínicos .....	24
4.8. PCR em tempo real .....	24
4.9. Análise imunohistoquímica.....	25
4.10. Análise estatística.....	26
4.11. Normas de biossegurança.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Resposta imune humoral após imunização e desafio com <i>N. caninum</i> .....	27
5.2. Resposta imune celular após imunização com antígenos de <i>N. caninum</i> .....	35
5.2.1. Resposta proliferativa.....	35
5.2.2. Produção de citocinas.....	36
5.3. Sinais clínicos e mortalidade após desafio com <i>N. caninum</i> .....	38
5.4. Carga parasitária cerebral após desafio com <i>N. caninum</i> .....	41
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Parasito

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e à subclasse Coccidia, apresentando características morfológicas, genéticas e antigênicas semelhantes a *Toxoplasma gondii*, porém com diferenças quanto à biologia, interação parasito-hospedeiro e características da doença que causam em seus hospedeiros. *N. caninum* tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, por causar doença neuromuscular em cães e aborto e mortalidade neonatal em bovinos, ocasionando significativas perdas econômicas para a bovinocultura de todo o mundo (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

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

## 1.2. Hospedeiros intermediários e definitivos

*N. caninum* está amplamente distribuído e acomete várias espécies animais, embora cause doença clínica em bovinos e cães. Evidência direta de infecção natural por *N. caninum* foi demonstrada pela identificação do parasito em tecidos de carneiros, cabras, veados, búfalos e cavalos (DUBEY, 2003). No Brasil, já foram relatados na literatura isolamento do parasito em um cão (NC-Bahia) (GONDIM et al., 2001) e um bezerro (BNC-PR1) (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003), ambos com sinais neurológicos e a partir de cistos cerebrais, nos estados da Bahia e Paraná, respectivamente. Recentemente, os búfalos foram descritos como importantes

reservatórios naturais de *N. caninum*, com isolamento do parasito de cistos cerebrais (NcBrBuf-1, 2, 3, 4 e 5) de búfalos da região norte do Brasil (RODRIGUES et al., 2004, 2005).

Exposição a *N. caninum* evidenciada pela resposta de anticorpos foi relatada em várias espécies de animais domésticos e silvestres (raposas, coiotes, lobos, alpacas e camelos) (DUBEY, 2003). Infecções experimentais foram realizadas com êxito em bovinos, carneiros, cabras, porcos, cães, gatos, camundongos, gerbis, macacos e pombos (DUBEY et al., 2002).

Outros possíveis hospedeiros intermediários de *N. caninum* são os humanos, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico. Embora não haja relatos comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999) e nem a demonstração de DNA do parasito em tecidos humanos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007), evidências sorológicas de exposição ao parasito foram demonstradas em diferentes populações humanas (NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999). Em contraste, um recente estudo retrospectivo realizado na Inglaterra com uma grande amostragem de soros da população geral e de um grupo de alto-risco não mostrou evidência de exposição humana a *N. caninum* (McCANN et al., 2008). Entretanto, nosso grupo demonstrou maior soropositividade a *N. caninum* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com desordens neurológicas quando comparado a indivíduos saudáveis, aludindo novas questões sobre o papel de *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos (LOBATO et al., 2006).

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

silvestres, incluindo o lobo-guará (VITALIANO et al., 2004; SILVA et al., 2005). Recentemente, um estudo com infecção experimental de *N. caninum* em aves demonstrou que cães eliminam oocistos nas fezes após alimentação com ovos embrionados de galinhas inoculados com taquizoítas de *N. caninum*, levantando a questão que as aves podem participar como reservatórios do parasito (FURUTA et al., 2007). Logo após, galinhas (*Gallus domesticus*), principalmente as galinhas caipiras ou de criação extensiva, foram confirmadas como hospedeiros naturais de *N. caninum* (COSTA et al., 2008). Estes achados têm grande importância epidemiológica, uma vez que as galinhas são cosmopolitas e fontes de alimento para muitas outras espécies de animais, incluindo os cães, os hospedeiros definitivos do parasito.

### 1.3 Ciclo biológico

*N. caninum* possui ciclo de vida heteroxeno típico de parasitos do filo Apicomplexa, alternando entre hospedeiros definitivos (replicação sexuada) e intermediários (replicação assexuada). A fase assexuada ocorre em ampla faixa de hospedeiros intermediários herbívoros ou onívoros (mamíferos domésticos e silvestres), enquanto a fase sexuada é limitada a hospedeiros definitivos canídeos (cão e coiote) (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004).

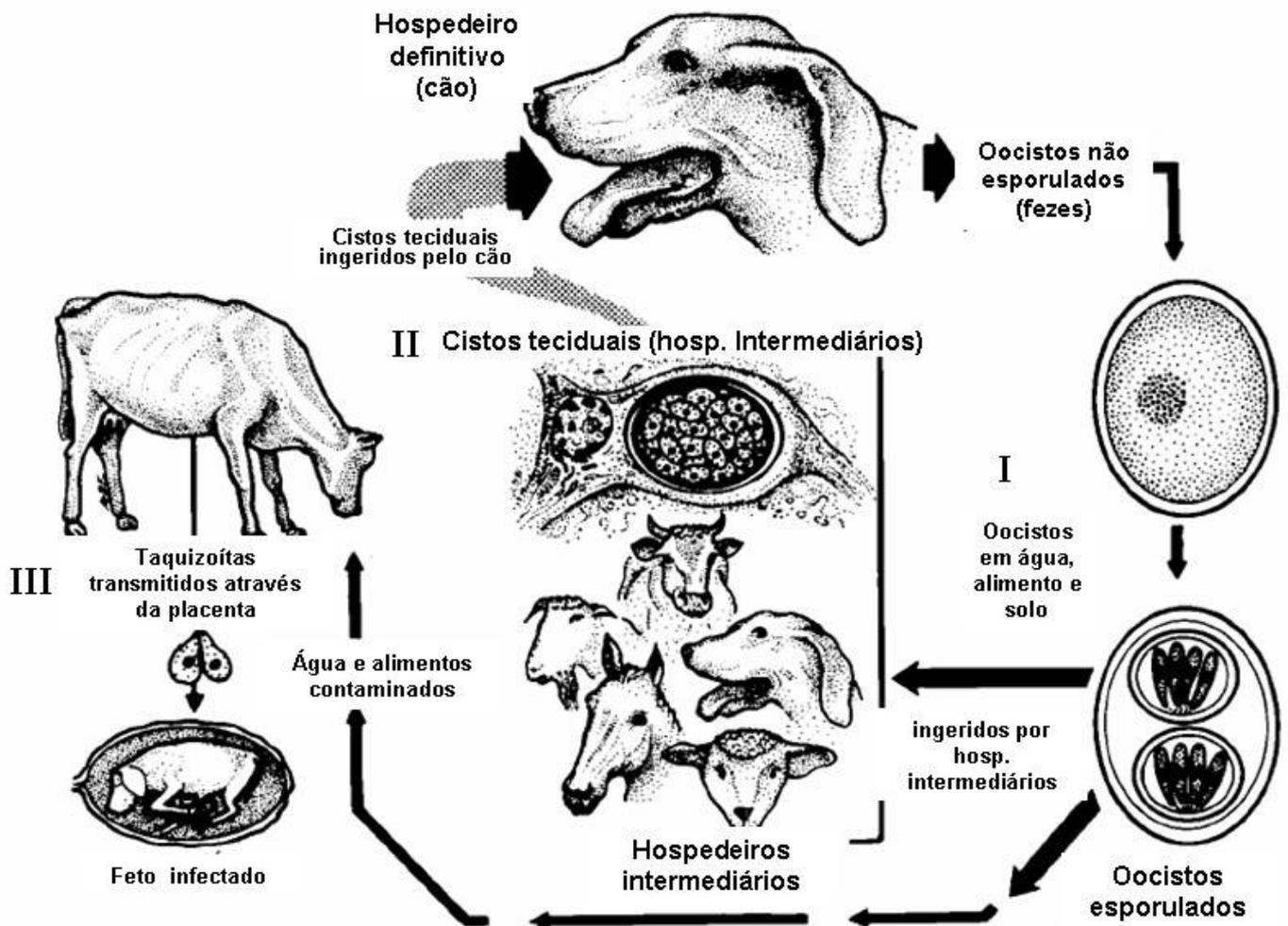
Embora os estágios sexuados ainda não tenham sido completamente descritos, o ciclo parece ser muito similar ao de *T. gondii* e envolve três formas infecciosas: taquizoítas (livres ou em grupos), bradizoítas (em cistos teciduais) e esporozoítas (em oocistos) (Figuras 1 e 2).

Taquizoítas e cistos teciduais são encontrados em hospedeiros intermediários, onde ocorrem duas fases de desenvolvimento assexuado. Na primeira fase, taquizoítas invadem as células e se multiplicam rapidamente por endodiogenia, levando à formação de pseudocistos que se rompem e liberam taquizoítas que disseminam para vários tecidos (sistema nervoso central, olho, músculos esquelético e cardíaco). Os taquizoítas causam forte resposta inflamatória e destruição de tecidos e são responsáveis pela manifestação clínica da doença (fase aguda). Sob a pressão da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítas se transformam em bradizoítas que iniciam a segunda fase de desenvolvimento assexuado (DUBEY, 2003).

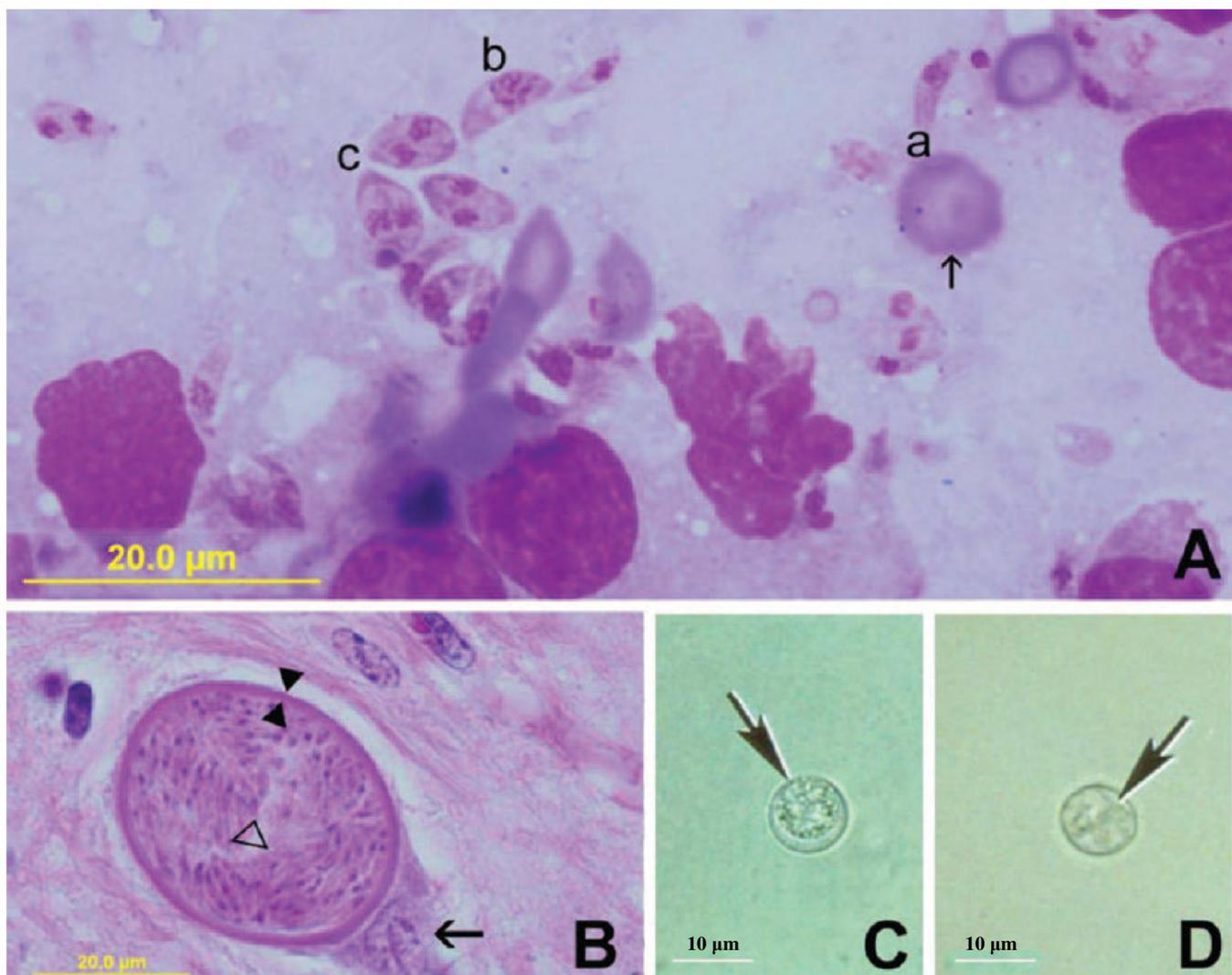
Bradizoítas se multiplicam lentamente por endodiogenia e vão formar os cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais e musculares, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica). Quando ingeridos por hospedeiros

definitivos, a parede dos cistos é digerida por enzimas proteolíticas, liberando bradizoítas que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia) com formação de esquizontes e liberação de merozoítas, os quais iniciam a fase sexuada (gamogonia) com a produção final de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos) que são eliminados com as fezes (DUBEY, 2003).

No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia entre 1 e 5 dias, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados (infecciosos) que podem permanecer viáveis no solo por longo tempo. Após a ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários, os esporozoítas são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítas que disseminam por todo o organismo. Após alguns ciclos de multiplicação, taquizoítas dão origem a bradizoítas e formam novos cistos teciduais (DUBEY, 2003).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Neospora caninum*. Fonte: Dubey (2003).



**Figura 2.** Formas infecciosas de *N. caninum*. (A) Impressão de fígado de camundongo infectado experimentalmente com *N. caninum*, demonstrando numerosos taquizoítas (Coloração Giemsa). Notar que os taquizoítas variam em dimensão dependendo do estágio de divisão: (a) taquizoíta delgado, (b) taquizoíta antes da divisão, e (c) três taquizoítas em divisão e uma hemácea (seta) para comparação de tamanho. (B) Corte histológico de cisto tecidual dentro de um neurônio do cordão espinhal de bezerro infectado congenitamente (Coloração por Hematoxilina e Eosina). Notar a espessura da parede do cisto (cabeças de setas opostas) e a quantidade de bradizoítas dentro do cisto (triângulo aberto), e o núcleo da célula hospedeira está indicado pela seta. (C) Oocisto não esporulado (seta) com uma massa central não dividida encontrado em fezes de um cão. (D) Oocisto esporulado (seta) com dois esporocistos internos. Fonte: Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007

#### 1.4. Transmissão

A transmissão vertical foi demonstrada em vários hospedeiros (bovinos, cães, carneiros, cabras, gatos, camundongos, macacos e porcos) e é o principal modo de transmissão em bovinos (DUBEY, 2003).

Nos bovinos o parasito é transmitido da mãe para o feto via placenta, durante sucessivas gestações, indicando que este modo de transmissão é altamente eficiente e que bovinos não desenvolvem boa imunidade protetora contra a transmissão vertical do parasito, contribuindo significativamente para a persistência da infecção no rebanho (DAVISON; OTTER, TREES, 1999).

Duas formas de transmissão transplacentária foram caracterizadas para melhor definir a origem da infecção fetal em bovinos (TREES; WILLIAMS, 2005): (1) *infecção transplacentária endógena*, na qual o feto pode ser infectado como resultado de reativação de infecção materna pré-natal, provavelmente devido aos efeitos da progesterona e balanço alterado do sistema imune por citocinas reguladoras, tais como IL-10 e IL-4 (QUINN; MILLER; ELLIS, 2004). Bradizoítas contidos dentro de cistos teciduais recrudescem e diferenciam, resultando em parasitemia de taquizoítas, que então atravessam a placenta e infectam o feto, causando aborto ou infecção congênita, dependendo do tempo de gestação em que o feto se torna infectado (WILLIAMS et al., 2000; WILLIAMS et al., 2007); e (2) *infecção transplacentária exógena*, na qual a transmissão fetal ocorre como resultado de infecção primária materna durante a gestação (TREES; WILLIAMS, 2005). A frequência relativa com que estas duas formas de transmissão ocorrem é crítica para abordagem de medidas de controle da neosporose bovina (WILLIAMS; TREES, 2006).

A transmissão horizontal pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais presentes em cérebro, medula espinhal, coração e músculos por hospedeiros intermediários, ou pela ingestão de oocistos, através de água ou alimentos contaminados. A ingestão de oocistos esporulados de *N. caninum* do ambiente é o único modo de infecção natural em bovinos após o nascimento (GONDIM et al., 2004).

A transmissão heteroxena cíclica de *N. caninum* foi comprovada experimentalmente entre cães e vários hospedeiros intermediários (cabras, carneiros, gerbis, cobaias, ratos e camundongos) (SCHARES et al., 2001). A transmissão cíclica de *N. caninum* entre cães e bovinos foi também demonstrada pela administração oral de oocistos a bovinos e subsequente administração de tecidos dos bovinos infectados a

cães, com nova eliminação de oocistos, e assim sucessivamente (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002).

Outras rotas secundárias de transmissão horizontal como lactogênica, venérea ou inseminação artificial têm sido investigadas. A possibilidade de transmissão lactogênica de *N. caninum* foi sugerida após a demonstração de infecção oral em bezerros recém-nascidos de vacas soronegativas através de colostro artificialmente contaminado com taquizoítas (UGGLA et al., 1998) e recentemente pela detecção de DNA do parasito no colostro e leite de vacas soropositivas (MOSKWA et al., 2007).

A presença de DNA de *N. caninum* em sêmen de touros com infecção naturalmente adquirida (ORTEGA-MORA et al., 2003) e o encontro de taquizoítas de *N. caninum* em órgãos genitais de camundongos machos imunodeficientes (MASUDA et al., 2007) sugerem a possibilidade de transmissão venérea, mas o seu real papel na transmissão da neosporose bovina precisa ainda ser determinado.

A inoculação intra-uterina de sêmen contaminado com taquizoítas de *N. caninum* em novilhas resultou em infecção materna e número reduzido de embriões viáveis, embora DNA do parasito não tenha sido detectado em nenhum embrião (SERRANO et al., 2006). Entretanto, vacas inseminadas após congelamento e descongelamento de sêmen contaminado com taquizoítas de *N. caninum* falharam em adquirir a infecção (CANADA et al., 2006).

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

### **1.5. Patogênese e interação parasito-hospedeiro**

Na patogênese da infecção por *N. caninum*, a invasão celular é o principal evento de processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa, sendo um mecanismo ativo que requer energia do parasito e de seu próprio sistema de actina/miosina (CARRUTHERS; SIBLEY, 1999). Os estágios invasivos apresentam um complexo apical composto por conóide, anel polar, microtúbulos e organelas secretórias (micronemas, roptrias e grânulos densos), que são utilizados pelo parasito durante um processo orquestrado de adesão e invasão de células hospedeiras (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002).

Desta forma, a invasão celular pode ser resumida em três etapas:

- (1) A interação inicial entre o parasito e a célula hospedeira ocorre sem qualquer orientação e envolve antígenos de superfície imunodominantes do parasito (NcSAG1 e NcSRS2). Os parasitos então se reorientam, posicionando a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (adesinas) são secretadas e responsáveis pela espessa zona de adesão e junção entre o taquizoíta e a membrana da célula hospedeira. Após a formação desta junção, inicia-se o movimento da junção ao redor do taquizoíta, juntamente com o citoesqueleto do parasito, culminando com a invasão do parasito dentro do VP. A membrana plasmática do hospedeiro é utilizada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos.
- (2) Proteínas de roptrias são então liberadas dentro do VP e estendem a MVP para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP.
- (3) Proteínas de grânulos densos modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do VP com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento do parasito.

## 1.6. Resposta imune

Como parasito intracelular obrigatório semelhante a *T. gondii*, a resposta imune protetora é fundamentalmente mediada por células, mas tanto a resposta imune inata como a resposta adaptativa participa dos mecanismos protetores contra *N. caninum*. A primeira barreira física é representada pelos enterócitos e as espessas junções intercelulares da mucosa intestinal que tentam deter a invasão do parasito pela via oral. Quando enterócitos são infectados eles podem secretar moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO), citocinas (IL-15) que ativam células *natural killer* (NK) para produzir IFN- $\gamma$ , e quimiocinas que recrutam leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas. Estas células recrutadas, quando estimuladas pelo parasito, secretam IL-12 que ativa as células NK e células T CD4+, induzindo a diferenciação para a subpopulação Th1 produtora de IFN- $\gamma$ , que por sua vez, ativa os macrófagos, células dendríticas e enterócitos que vão destruir o parasito, sendo crítico para a sobrevivência do hospedeiro (BUZONI-GATEL et al., 2006).

Células T CD8<sup>+</sup> também contribuem para controlar as infecções devido à produção de IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8<sup>+</sup> liberando taquizoítas, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos (anticorpos, macrófagos ativados e células NK). Assim, a formação de cistos é dependente primariamente de mecanismos imunes mediados por IFN- $\gamma$  que representa o principal mediador de resistência através da ativação de macrófagos. Estas células inibem a replicação de parasitos pela produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio que promovem a inativação de enzimas críticas para replicação do parasito. Portanto, os dois componentes críticos da resposta imune contra *N. caninum* tanto em bovinos como em camundongos são as células T CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ , que influenciam o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, desenvolvem células efetoras citotóxicas e mantêm cistos teciduais contendo bradizoítas no animal imune (WILLIAMS; TREES, 2006; KLEVAR et al., 2007).

Outra citocina que pode ser importante na regulação da resposta imune celular a *N. caninum* é IL-10, que tem efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , a diferenciação de clones Th1, a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de IL-12 por células acessórias (INNES et al., 2002).

A cinética da resposta imune humoral em animais naturalmente infectados é pouco conhecida, mas sua participação direta na neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares é importante para controlar a disseminação da infecção (EPERON et al., 1999; INNES et al., 2002). Há pouca informação sobre a produção de anticorpos IgM específicos tanto em animais com infecção congênita como em infecção pós-natal. Em infecção experimental com tecidos de bovinos infectados com *N. caninum*, os cães parecem não desenvolver respostas de anticorpo dentro das primeiras 3 a 4 semanas após infecção (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002). A imunidade resultante de uma única exposição pode durar mais que 8 meses em cães, como demonstrada pela não eliminação de oocistos após re-exposição. Entretanto, após 18 e 20 meses da infecção primária, a re-exposição induz nova eliminação de oocistos, mesmo na presença de um alto título de anticorpo (1:1600), indicando que a resposta imune humoral por si não assegura que um cão seja refratário à produção de oocistos (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005).

## 1.7. Sinais clínicos

*N. caninum* causa aborto tanto em gado de corte como de leite, a partir do 3º mês até o final da gestação, sendo mais comum entre o 5º e 6º mês de gestação. Vários eventos podem ocorrer, como morte, reabsorção, mumificação ou autólise fetal dentro do útero, natimortos, recém-nascidos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados. Sinais clínicos são mais freqüentes em animais jovens (< 2 meses de idade) infectados congenitamente e predominantemente neurológicos, como ataxia, paralisia de membros posteriores (hiperextensão rígida), reflexos patelares diminuídos e perda de consciência. Em animais adultos, o aborto é o único sinal clínico observado, podendo ser esporádico, endêmico ou epidêmico (DUBEY, 2003).

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

A doença clínica em cães pode ser localizada ou generalizada, com o envolvimento de todos os órgãos, inclusive da pele causando a neosporose cutânea (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002). Nestes casos observa-se intenso parasitismo com grande número de taquizoítas nas lesões cutâneas, sugerindo falha de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos. Assim, algumas condições como terapia imunossupressora ou co-infecção com outros agentes infecciosos podem estar contribuindo para esta patogenia. Os casos mais graves da doença localizada ocorrem em cães jovens com infecção congênita, que apresentam um quadro de paresia inicial de membros posteriores que progride para a paralisia. Sinais neurológicos são dependentes do local parasitado no SNC e os membros posteriores são os mais afetados e ficam em hiperextensão rígida. Outras disfunções que podem ocorrer incluem dificuldade na deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia de nervos faciais e até falência cardíaca (DUBEY, 2003).

## 1.8. Epidemiologia e prevalência

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

Infecções subclínicas por *N. caninum* em cães têm grande importância epidemiológica, porque os cães domésticos são os hospedeiros definitivos e podem eliminar oocistos nas fezes, contribuindo para a contaminação ambiental. Inquéritos soroepidemiológicos foram realizados em várias partes do mundo, mostrando ampla variação nas taxas de soroprevalência, de 0% no Kênia (BARBER et al., 1997) a 97% na Nova Zelândia (ANTONY; WILLIAMSON, 2003). Ressalta-se a maior soroprevalência em cães de área rural (20% a 97%) que de área urbana (7% a 26%), sugerindo maior exposição a *N. caninum* em cães de ambientes rurais e importante associação epidemiológica entre bovinos e cães, já que eles podem ter contato com placentas e fetos abortados de bovinos (PATITUCCI et al., 2001; ANTONY; WILLIAMSON, 2003; SÁNCHEZ et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; LASRI et al., 2004).

## 1.9. Impacto econômico

*N. caninum* é atualmente reconhecido como importante agente causal de doenças neuromusculares em cães e infecções congênitas em bovinos mundialmente, resultando em abortos, natimortos e complicações neurológicas em bezerros. Assim, este patógeno causa grande impacto econômico tanto na indústria pecuária devido a perdas de animais, queda na produção de leite e ganho de peso (DUBEY, 1999) bem como perdas afetivas, quando se trata de animais de companhia.

Não há dados oficiais sobre as perdas econômicas devido à neosporose para a indústria pecuária em todo o mundo, mas as perdas são estimadas em milhões de dólares, particularmente na América do Norte e Europa. Como abortos devido à

neosporose podem ocorrer em torno de 42% das vacas leiteiras, o impacto econômico está na dependência dos custos diretos e perdas de bezerros. Além disso, custos indiretos também são contabilizados, incluindo auxílio profissional e custos associados com o estabelecimento de diagnóstico, reprodução, possíveis perdas na produção de leite, entre outros (DUBEY, 1999). Em geral, as perdas em rebanho de corte são menos conhecidas devido à dificuldade de se encontrar fetos abortados, mas estudos têm mostrado associação positiva entre soropositividade a *N. caninum* e queda no ganho de peso (BARLING et al., 2000).

### **1.10. Medidas de controle e vacinação**

O controle da neosporose bovina é correntemente baseado na prevenção da contaminação do ambiente com oocistos de cães, restringindo o acesso destes animais nas proximidades do rebanho, sacrifício dos animais infectados ou usando sistema de transferência de embriões para prevenir transmissão vertical do parasito a novas gerações (WILLIAMS; TREES, 2006). Para neosporose canina, as recomendações são direcionadas no sentido de evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas para *N. caninum* bem como, impedir alimentação com carne ou vísceras cruas, principalmente os cães de áreas rurais, além de medidas de controle da população de cães dentro e ao redor das fazendas (McALLISTER; WALLACE, 1999).

Vacinas disponíveis para o controle de doenças causadas por protozoários de importância veterinária como *T. gondii* (aborto em carneiros) e *Eimeria* spp (coccidiose aviária) consistem geralmente de organismos vivos atenuados e apresentam as dificuldades inerentes às vacinas vivas, incluindo vida média curta, risco de reversão à virulência e perigo de contaminantes com outros agentes patogênicos (WILLIAMS; TREES, 2006).

Em relação à vacinação contra *N. caninum*, até o presente momento, não há vacina capaz de induzir completa imunidade protetora em bovinos. Há uma vacina disponível comercialmente (Bovilis NeoGuard®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, EUA), consistindo de taquizoítas de *N. caninum* inativados, mas não há dados assegurados sobre sua eficácia (ROMERO et al., 2004; WILLIAMS; TREES, 2006).

Alguns estudos mostram que a infecção de bovinos (INNES et al., 2001) e camundongos (MILLER et al., 2005), antes da gestação, com taquizoítas vivos protege contra o desafio durante a gestação e a transmissão transplacentária. Entretanto, a possibilidade de contaminantes com agentes patogênicos nos isolados de *N. caninum*

implica que novas formulações de vacinas sejam investigadas para prevenir sua transmissão e infecção, bem como reduzir a gravidade da doença. Desta forma, o desenvolvimento de formas alternativas de vacinas tem sido intensivamente pesquisado, particularmente em modelos murinos que têm contribuído para a caracterização de novos antígenos protetores e estratégias inovadoras de administração das vacinas para a obtenção de procedimentos eficazes de vacinação.

Vários tipos de vacinas contra *N. caninum* em modelos murinos têm sido investigados, utilizando taquizoítas vivos (LUNDÉN et al., 2002), tratados com radiação gama (RAMAMOORTHY et al., 2006) ou atenuados (BARTLEY et al., 2008). Antígenos imunodominantes de superfície de *N. caninum*, especialmente NcSAG1 e NcSRS2, quer como proteínas nativas (HALDORSON et al., 2005) ou proteínas recombinantes múltiplas (CANNAS et al., 2003a; CHO et al., 2005), proteínas recombinantes de organelas secretórias como NcMIC1 (ALAEDDINE et al., 2005), NcMIC3 (CANNAS et al., 2003b), NcMIC4 (SRINIVASAN et al., 2007), NcROP2 (DEBACHE et al., 2008) e NcGRA7 (JENKINS et al., 2004) têm também sido avaliados como candidatos potenciais de vacinas em modelos murinos. Todos estes estudos mostram que a proteção conferida é, na maioria das vezes, parcial e dependente do tipo de antígeno e adjuvante empregado, bem como das estratégias de administração das vacinas.

Neste contexto, diferentes sistemas de administração de vacinas têm sido investigados, incluindo a utilização de vetores virais como o vírus da varíola recombinante carregando os genes das proteínas de superfície NcSAG1 ou NcSRS2 (NISHIKAWA et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2001a,b; OTSUKA; MIKAMI, 2001), vetores bacterianos como *Brucella abortus* RB51 expressando antígenos de *N. caninum* (RAMAMOORTHY et al., 2007) e a incorporação de antígenos NcGRA7 em DNA bacteriano (JENKINS et al., 2004). Deve ser ressaltado, entretanto, que a utilização prática de vacinas de DNA recombinante para uso humano e animal é limitada, devido às complicações envolvidas em licenciamento e o alto custo na geração de vacinas de DNA livre de lipopolissacárides, além do risco de incorporação do DNA vacinal no genoma do hospedeiro (RAMAMOORTHY et al., 2006).

### **1.11. Adjuvantes e ODN-CpG**

Adjuvantes têm importante papel na eficácia de vacinas, contribuindo tanto para aumentar a força e a cinética da resposta imune bem como direcionar o tipo de resposta.

Além dos adjuvantes experimentais tradicionais como o adjuvante completo (ACF) ou incompleto (AIF) de Freund, a incorporação dos antígenos em partículas submicroscópicas compostas de saponina, colesterol e fosfolipídeos, formando complexos imunoestimulantes (ISCOMS), tem mostrado aumentar a imunogenicidade, resultando em respostas imunes humoral e celular de longa duração. ISCOMS contendo antígenos nativos (LUNDÉN et al., 2002) ou proteínas recombinantes de NcSRS2 (PINITKIATISAKUL et al., 2005) têm sido avaliados e demonstrados induzir imunidade protetora contra neosporose em camundongos.

Oligodeoxinucleotídeos (ODN) contendo seqüências CpGs não metiladas são reconhecidos por receptores intracelulares Toll-like 9 (TLR9) expressos em vesículas endossomais de células apresentadoras de antígenos, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas. Desta forma, ODN-CpGs atuam como um sinal de perigo para o sistema imune de mamíferos, uma vez que estas seqüências são frequentemente encontradas em DNA de bactérias, mas não de organismos vertebrados (KRIEG et al., 2007). A interação de TLR9 com seqüências CpG ativam uma cascata de eventos, tais como as vias de sinalização intracelular (MAPKs e NF- $\kappa$ B), resultando na ativação de células B e células T helper (Th1), com subsequente secreção de citocinas (KLINMAN et al., 2004).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que ODN- CpGs são potentes ativadores do sistema imune em numerosas espécies, incluindo humanos, primatas, camundongos, bovinos, ovinos, suínos, cavalos, cães, gatos, aves e peixes (MUTWIRI et al., 2004). Portanto, ODN-CpGs estimulam o sistema imune inato e têm sido avaliados como adjuvantes em vacinas contra vários patógenos, incluindo bactérias, vírus e protozoários intracelulares, tais como *T. gondii* (SPENCER et al., 2004; KRINGEL et al., 2004; ELMALKY et al., 2005), *Leishmania sp* (JAAFARI et al., 2007), *Trypanosoma cruzi* (FRANK et al., 2003), *Plasmodium falciparum* (MULLEN et al., 2007), pela sua capacidade de induzir potente resposta imune através da ativação preferencial de células Th1 e liberação de citocinas deste perfil, tais como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ZIMMERMANN et al., 2008). Em neosporose, entretanto, há limitada informação sobre o uso de CpGs como adjuvantes em vacinação, exceto pelos relatos de Jenkins e colaboradores (2004) que observaram aumento no nível de proteção contra a transmissão congênita de *N. caninum* em animais imunizados com vacinas de DNA/NcGRA7 incorporadas com CpG.

## 2. JUSTIFICATIVAS

*N. caninum* é um protozoário Apicomplexa emergente no Brasil e no mundo, mais comumente associado com abortos e mortalidade neonatal em bovinos, com acentuada importância econômica devido às perdas incalculáveis na bovinocultura.

Embora seja desejável estudar a imunidade a *N. caninum* em espécies de hospedeiros naturais, os custos envolvidos e dificuldades na disponibilidade de animais e reagentes específicos para análise da resposta imune tornam-se fatores limitantes. Assim, diferentes linhagens de camundongos isogênicos têm sido usadas como modelos experimentais para o estudo da infecção por *N. caninum*, tanto na infecção cerebral para comparar produção de cistos teciduais em cérebros, carga parasitária, lesões e respostas de citocinas, bem como na infecção congênita e transmissão vertical do parasito.

Devido à prevalência e importância econômica da neosporose, o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra *N. caninum* para prevenir abortos e transmissão vertical em bovinos e cães, bem como para controlar a disseminação de oocistos pelo hospedeiro definitivo, tem sido prioridade em pesquisas científicas e é crucial para limitar a infecção por *N. caninum* nestes hospedeiros naturais.

No entanto, até o presente momento, não há relatos sobre o uso de antígenos de excreção-secreção ou lisado total de *N. caninum* associados com o adjuvante CpG para propósitos de vacinação contra neosporose em modelos murinos. Desta forma, espera-se que este estudo possa fornecer informações de relevância para um melhor entendimento da resposta imune humoral e celular, bem como da proteção contra a infecção por *N. caninum* conferida pela imunização de camundongos com os antígenos e adjuvantes aqui propostos, para potencial utilização em vacinas comerciais contra a neosporose.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

- Avaliar a atividade adjuvante de oligodeoxinucleotídeos (ODN) CpG em imunização de camundongos com antígenos de lisado total (NLA) e de excreção-secreção (NcESA) de *N. caninum*.

#### **3.2. Específicos**

- Analisar a resposta imune humoral dos camundongos imunizados pela mensuração dos anticorpos séricos IgG e isotipos IgG1 e IgG2a contra *N. caninum*.
- Analisar a resposta imune celular pela análise de proliferação e padrão de secreção de citocinas Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-10) sob estimulação *in vitro* de células do baço dos camundongos imunizados.
- Avaliar o efeito protetor da imunização com antígenos NLA ou NcESA, associados ou não ao adjuvante CpG, contra o desafio letal de *N. caninum* em camundongos quanto aos sinais clínicos, mortalidade e carga parasitária cerebral.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Manutenção e obtenção de parasitos**

Parasitos do isolado Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) de *N. caninum* foram mantidos em cultura celular usando linhagem de monócitos bovinos (M617) como descrito anteriormente (SPEER et al., 1985). Monócitos bovinos foram cultivados em frascos de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem a confluência. As células hospedeiras foram infectadas com taquizoítas de Nc-1 (1 x 10<sup>6</sup> taquizoítas/frasco de 75 cm<sup>2</sup>) que foram mantidas por passagens seriadas em meio RPMI sem adição de SFB, em intervalos de 48 a 72 horas. Parasitos foram coletados por descamação da monocamada celular (*cell scraper*) e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 25x7 mm e centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2). O sedimento final da suspensão parasitária foi utilizado para preparação de antígeno solúvel total ou lisado de *N. caninum* (NLA), antígeno de excreção-secreção de *N. caninum* (NcESA) ou taquizoítas íntegros formolizados.

### **4.2. Preparação de antígenos de *N. caninum***

#### **4.2.1. Antígeno de lisado de *N. caninum* (NLA)**

Antígeno solúvel total ou lisado de *N. caninum* (NLA) foi preparado como descrito anteriormente (SILVA et al., 2007), com algumas modificações. Os parasitos foram ressuspensos em PBS, contados em câmara hemocitométrica e ajustados para concentração final de 1 x 10<sup>8</sup> taquizoítas/mL. Suspensões parasitárias foram tratadas com inibidores de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF] a 1,6 mM, leupeptina a 50 µg/mL e aprotinina a 10 µg/mL) e então submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido por seis ciclos de ultra-som durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após

centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de 0,22 µm (filtros Millex, Millipore, EUA) e a concentração protéica determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Alíquotas do antígeno NLA foram armazenadas a -20°C até sua utilização nos procedimentos de imunização de camundongos, ensaios *in vitro* de proliferação de linfócitos e como antígeno em reações imunoenzimáticas (ELISA).

#### **4.2.2. Antígeno de excreção-secreção de *N. caninum* (NcESA)**

Preparações de NcESA foram obtidas como anteriormente descrito (NAGULESWARAN et al., 2001). Taquizoítas de Nc-1 recentemente liberados da cultura celular foram lavados por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com PBS, contados e ajustados para aproximadamente  $1 \times 10^8$  taquizoítas/mL, e ressuspensos em solução salina de Hanks estéril. Após incubação por 30 minutos a 37°C em banho-maria sob agitação suave, parasitos foram centrifugados (720 x g, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante coletado e novamente centrifugado (10,000 x g, 30 minutos, 4°C). Após a centrifugação final, o sobrenadante (NcESA) foi coletado, concentrado sob nitrogênio gasoso e filtrado em membranas de 0,22 µm (filtros Millex, Millipore). A concentração protéica do antígeno foi determinada (LOWRY et al., 1951) e alíquotas de NcESA foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas nos procedimentos de imunização de camundongos.

#### **4.2.3. Taquizoítas íntegros formolizados**

Taquizoítas íntegros de *N. caninum* foram preparados como previamente descrito (CAMARGO, 1964). Suspensões parasitárias foram ajustadas para concentração de  $1 \times 10^6$  taquizoítas/mL e tratadas com formaldeído a 1% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover parasitos aglomerados, o sobrenadante foi lavado com PBS por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C). O sedimento final foi ressuspensado em água destilada estéril até obter concentração de 20-30 parasitos por campo microscópico (aumento 400X). Um volume de 10 µL da suspensão parasitária foi adicionado em áreas demarcadas de lâminas microscópicas para imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil) que foram mantidas à temperatura ambiente por 3 a 4 horas para completa fixação dos parasitos. As lâminas com taquizoítas formolizados de *N. caninum* foram individualmente embaladas em

lenços de papel e, posteriormente, em papel alumínio e armazenadas a -20°C até serem utilizadas em reações de imunofluorescência indireta.

### 4.3. Oligodeoxinucleotídeo CpG

O oligodeoxinucleotídeo (ODN) CpG utilizado neste estudo foi ODN-CpG 1826 constituído pela seqüência 5'-TCCATGACGCTTTCCTGACGCTT-3', contendo dois *motifs* CpG e sintetizado com cadeia fosforotioato resistente à nucleases (Coley Pharmaceuticals, Wellesley, EUA). ODN-CpG 1826 já tem sido bem caracterizado pela sua atividade adjuvante com antígenos protéicos (CHU et al., 1997) e demonstrado ser efetivo em espécies murinas (CORRAL; PETRAY, 2001; JIANG, 2003).

### 4.4. Animais e imunização

Um total de 66 camundongos isogênicos C57BL/6, machos, com 8 a 12 semanas de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil) foram utilizados e alojados no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclos de 12 h de luz e 12 h de escuro, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996; MINEO et al., 2005).

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos de 11 camundongos, individualmente identificados e imunizados por via subcutânea (s.c.) em intervalos de 2 semanas, com três doses (200 µL/animal) das seguintes formulações:

- I. NLA+CpG:** 25 µg NLA + 50 µg ODN-CpG em PBS estéril;
- II. NcESA+CpG:** 25 µg NcESA + 50 µg ODN-CpG em PBS estéril;
- III. NLA:** 25 µg NLA em PBS estéril;
- IV. NcESA:** 25 µg NcESA em PBS estéril;
- V. CpG:** 50 µg ODN-CpG em PBS estéril;
- VI. PBS:** PBS estéril (controle não tratado).

Amostras de sangue foram coletadas por punção retro-orbital nos dias 0, 14, 28, 42 e 56 dias após imunização e os soros obtidos após centrifugação (720 x g, 5 minutos)

foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizados em testes sorológicos para análise de anticorpos.

#### **4.5. Avaliação da resposta imune humoral**

##### **4.5.1. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* em amostras de soros individuais de camundongos imunizados, segundo o protocolo anteriormente descrito (WELTER et al., 2007), com algumas modificações. Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, New York, EUA) foram sensibilizadas com antígeno NLA (0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo) (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídas 1:25 em PBS-TM por 1 hora (IgG) ou 2 horas (IgG1 e IgG2a) a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após seis lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com o conjugado IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição 1:1000 em PBS-TM ou com os anticorpos secundários biotinilados (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) anti-IgG1 de camundongo diluído 1:4000 em PBS-TM ou anti-IgG2a de camundongo diluído 1:2000 em PBS-TM. Após incubação por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , as placas foram novamente lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluída 1:1000 em PBS-TM, quando apropriado (para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a). A reação foi revelada com 0.01 M 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS) e 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ambos da Sigma Chemical Co.), e a densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa.

##### **4.5.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)**

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada para verificar o padrão de marcação dos taquizoítas de *N. caninum* testados com amostras de soros de camundongos dos diferentes grupos aos 42 dias após imunização, segundo o protocolo

anteriormente descrito (SILVA et al., 2007). Lâminas contendo taquizoítas formolizados de *N. caninum* foram incubadas com amostras de soros diluídos 1:50 em PBS. Após incubação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas três vezes durante cinco minutos com PBS e incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma Chemical Co.) na diluição 1:50 em PBS contendo 0.01% azul de Evans. Após incubação por 30 minutos a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas, montadas com lamínulas e glicerina tamponada com 0,5 M carbonato (pH 9,5) e examinadas em microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BH2, Tokyo, Japão).

#### **4.5.3. SDS-PAGE e Immunoblot**

Antígenos NcESA e NLA (200 µg de proteína total) foram diluídos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, dodecil sulfato de sodio [SDS] a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e incubados por 5 minutos a 100°C para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% sob condições não-redutoras (LAEMMLI, 1970; TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) utilizando sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Um volume de 150 µL (200 µg proteína) de cada amostra foi aplicado em paralelo aos padrões de pesos moleculares (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.). Após a separação eletroforética, as amostras foram coradas por Nitrato de Prata e o perfil de bandas protéicas dos diferentes antígenos foi analisado.

*Immunoblot* foi realizado para verificar o perfil de reatividade dos soros de camundongos aos 42 dias após imunização com os antígenos NLA e NcESA de *N. caninum*, segundo o protocolo anteriormente descrito (SILVA et al., 2007). Após a separação eletroforética, como descrito acima, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA) utilizando sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia) por 2 horas (TOWBIN; STAEHELIN, GORDON, 1979). O sucesso da transferência foi confirmado por visualização das frações do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose por meio de coloração com solução de Ponceau a 0,5%.

As membranas foram cortadas em tiras de 3 mm de largura e bloqueadas com PBS-T contendo leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente, as tiras foram incubadas com amostras de soros de camundongos diluídas 1:50 em PBS-TM a 1% por 18 horas a 4°C sob agitação lenta. Soros controles

positivos de camundongos experimentalmente infectados com *N. caninum* e soros controles negativos (soros de camundongos não imunes) também foram incluídos. Após seis ciclos de lavagens durante cinco minutos com PBS-T, as tiras foram incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1:1000 em PBS-TM a 1% por 2 horas à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, as tiras foram reveladas pela adição do substrato enzimático que consistiu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e 10 mg/mL de 3,3'- tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Co.) em salina tamponada com 0,02 M Tris-HCl (pH 7,4). As massas moleculares aparentes das bandas antigênicas foram estimadas a partir dos cálculos da mobilidade relativa (Rf), segundo a curva do padrão de peso molecular de referência.

#### **4.6. Avaliação da resposta imune celular**

Após 15 dias da 3<sup>a</sup> dose de imunização, três animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e os baços removidos assepticamente para cultura e estimulação de células *in vitro*.

##### **4.6.1. Análise de proliferação**

Os baços coletados assepticamente foram individualmente macerados em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM), 2-mercaptoetanol (50 µM) e suspensões celulares foram lavadas (350 x g, 5 minutos, 4°C) em meio RPMI. O sedimento de células foi ressuscitado com 2 mL de tampão de lise (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) para eritrócitos e lavado por mais duas vezes em meio RPMI. O sedimento final foi ressuscitado com 5 mL de meio RPMI contendo 10% SFB e a suspensão celular mantida em banho de gelo até a contagem de células viáveis em câmara hemocitométrica de Neubauer, usando o corante de exclusão vital azul de Tripan a 0,4% em PBS.

Suspensões celulares (2 x 10<sup>5</sup> células/poço/200µL) foram adicionadas, em triplicata, em placas de cultura de 96 poços (Corning Incorporated Costar®, New York, EUA) e estimuladas com o mitógeno concanavalina A (ConA: 5 µg/mL) (Sigma Chemical Co.) ou antígeno de lisado total de *N. caninum* (NLA:10 µg/mL). Como controle, células não estimuladas foram adicionadas de meio de cultura somente. As células foram incubadas por 72 horas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e pulsadas com 0,5 µCi de timidina

tritiada [ $H^3$ ] (New England Nuclear, Buckinghamshire, Inglaterra) por poço durante as últimas 12 horas de cultura. As células foram coletadas em filtro de fibra de vidro por meio de coletor de células (*Cell Harvester* - Cambridge Technology Inc., Cambridge, EUA) e a quantidade de timidina incorporada foi analisada em contador  $\beta$  de cintilação líquida (Packard, Downers Grove, EUA) em contagem por minuto (c.p.m.). Os resultados foram expressos em Índice de Proliferação (IP), calculado pela fórmula: IP = média da c.p.m. dos poços com estímulo / média da c.p.m. dos poços sem estímulo (apenas meio de cultura). Valores de IP > 2 foram considerados positivos como anteriormente descrito (FRANK et al., 2003).

#### **4.6.2. Análise de citocinas**

Suspensões de células do baço ( $4 \times 10^6$  células/500  $\mu$ L/poço) foram cultivadas, em triplicata, em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated Costar®) e estimuladas como descrito para análise de proliferação. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e os sobrenadantes de cultura foram coletados de poços independentes após 48 horas de estimulação para detecção de IL-12, ou após 72 horas de estimulação para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. Sobrenadantes foram armazenados a -70°C para posterior análise de citocinas.

A dosagem das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes (IL-12 e IFN- $\gamma$ , PeProtech Mexico, Veracruz, México; IL-4 e IL-10, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T e bloqueio com PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co.) a 1% por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados em duplicata. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A

densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de detecção obtido para cada análise foi 31 pg/ml (IL-12), 39 pg/ml (IFN- $\gamma$ ), 15 pg/ml (IL-4) e 31 pg/ml (IL-10). Os coeficientes de variação intra-análise e inter-análise foram abaixo de 10% e 20%, respectivamente.

#### **4.7. Desafio e avaliação de parâmetros clínicos**

Após 4 semanas da 3ª dose de imunização (aos 56 dias após a 1ª imunização), os animais de todos os grupos foram inoculados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum* recentemente coletados de cultura celular, num volume de 200  $\mu$ L, por via intraperitoneal. Os animais foram observados diariamente quanto à morbidade, mortalidade e alterações de peso individual dos animais durante 32 dias após o desafio. A avaliação da morbidade foi estabelecida utilizando um sistema baseado em escores como previamente descrito (BARTLEY et al., 2006), de acordo com os seguintes critérios: (0) pêlo brilhante, animal ativo; (1) pêlo ouriçado, animal relutante a se mover; (2) pêlo muito arrepiado, animal apático.

Após 32 dias do desafio, os animais sobreviventes foram sacrificados e os cérebros coletados e divididos longitudinalmente em duas partes, uma das quais foi armazenada a  $-70^\circ\text{C}$  para avaliar a quantidade de DNA do parasito por PCR em tempo real. A outra metade do tecido cerebral foi fixada em formalina a 10% tamponada com fosfatos 10 mM (pH 7,2) para posterior detecção de parasitas por imunohistoquímica.

#### **4.8. PCR em tempo real**

A quantidade de DNA do parasito no cérebro de camundongos infectados foi determinada por PCR em tempo real, através do sistema de detecção SYBR green como anteriormente descrito (SRINIVASAN et al., 2007). Foram utilizados os seguintes pares de *primers* (*Forward*: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; *Reverse*: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3') para detecção da região Nc5 de *N. caninum* sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Prodimol Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, MG). A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido cerebral utilizando o kit de purificação de DNA genômico Wizard® (Promega Co., Madison, USA), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de

DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e ajustada para 100 ng/ $\mu$ L com água estéril e livre de DNase.

Ensaio para quantificar a carga parasitária cerebral foram realizados no equipamento de PCR em tempo real ABI 7000 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e a contagem de parasitas foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de  $10^7$  taquizoítas de Nc-1 incluídas em cada análise.

#### **4.9. Análise imunohistoquímica**

Amostras de tecido cerebral fixado em 10% de formalina tamponada por 24 horas à temperatura ambiente foram incluídas em parafina de acordo com procedimentos histológicos de rotina. Cortes de 4  $\mu$ m de espessura foram obtidos e colhidos em lâminas microscópicas revestidas com cola (Cascorez®, Vargem Grande Paulista, Brasil) e processados para a reação de imunohistoquímica como anteriormente descrito (SILVA et al., 2002a). Em resumo, cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de álcool e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos com peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Após uma lavagem rápida em PBS, foi realizado o resgate de sítios antigênicos com tampão citrato 0.2 M (pH 6.0) por 7 minutos em microondas. Para o bloqueio de sítios não-específicos foi utilizado soro normal de cabra a 2% em PBS e, logo em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (soro de camundongo experimentalmente infectado com *N. caninum*) diluído 1:100 em PBS contendo BSA 1% por 18 horas a 4°C. Após duas lavagens por 5 minutos em PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcada com biotina (Sigma Chemical Co.) diluído 1:300 em PBS por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, a reação foi amplificada pela incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase biotilada (ABC – Vector) diluído 1:250 em PBS durante 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com o substrato peróxido de hidrogênio a 0,03% e DAB (Sigma Chemical Co.) e a contracoloração utilizou hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas e examinadas em microscopia óptica comum.

#### **4.10. Análise estatística**

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). O método de Kaplan-Meier foi aplicado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes após o desafio e as curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste *log rank*. A comparação entre os dados obtidos nos diversos grupos foi analisada por testes paramétricos (ANOVA) ou não-paramétricos (Kruskal-Wallis), após a realização do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para avaliar o comportamento das variáveis analisadas. Testes de comparação múltipla de Tukey ou Dunn foram aplicados, quando apropriado, para examinar todas as possíveis comparações entre pares de grupos. O teste *t* de Student foi utilizado para comparação dos isotipos de IgG, níveis de citocinas e índice de proliferação nos diferentes grupos. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

#### **4.11. Normas de biossegurança**

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

## 5. RESULTADOS

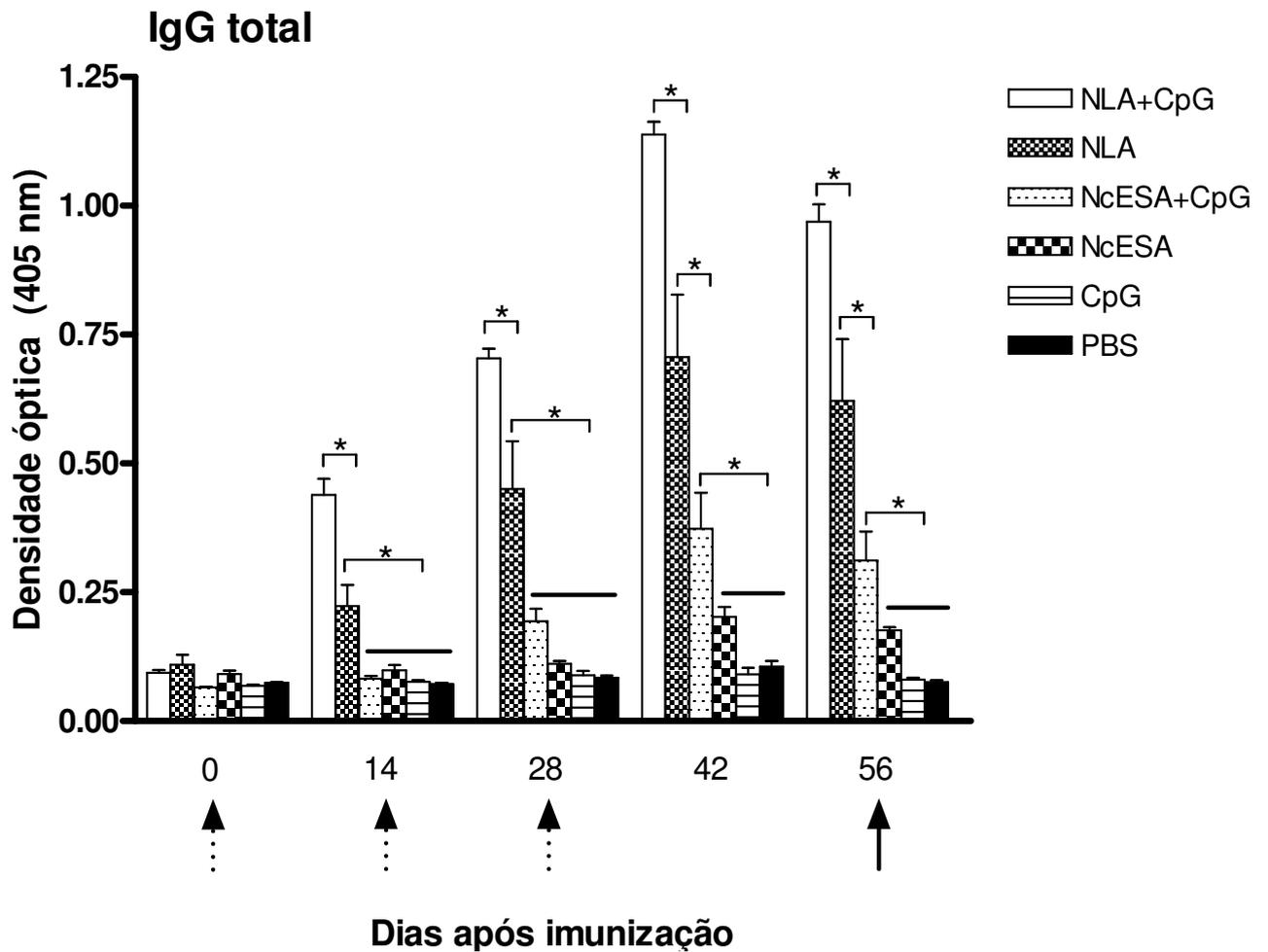
### 5.1. Resposta imune humoral após imunização e desafio com *N. caninum*

A resposta imune humoral de anticorpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos imunizados com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG e respectivos grupos controles (CpG e PBS) está demonstrada nas Figuras 3, 4 e 5.

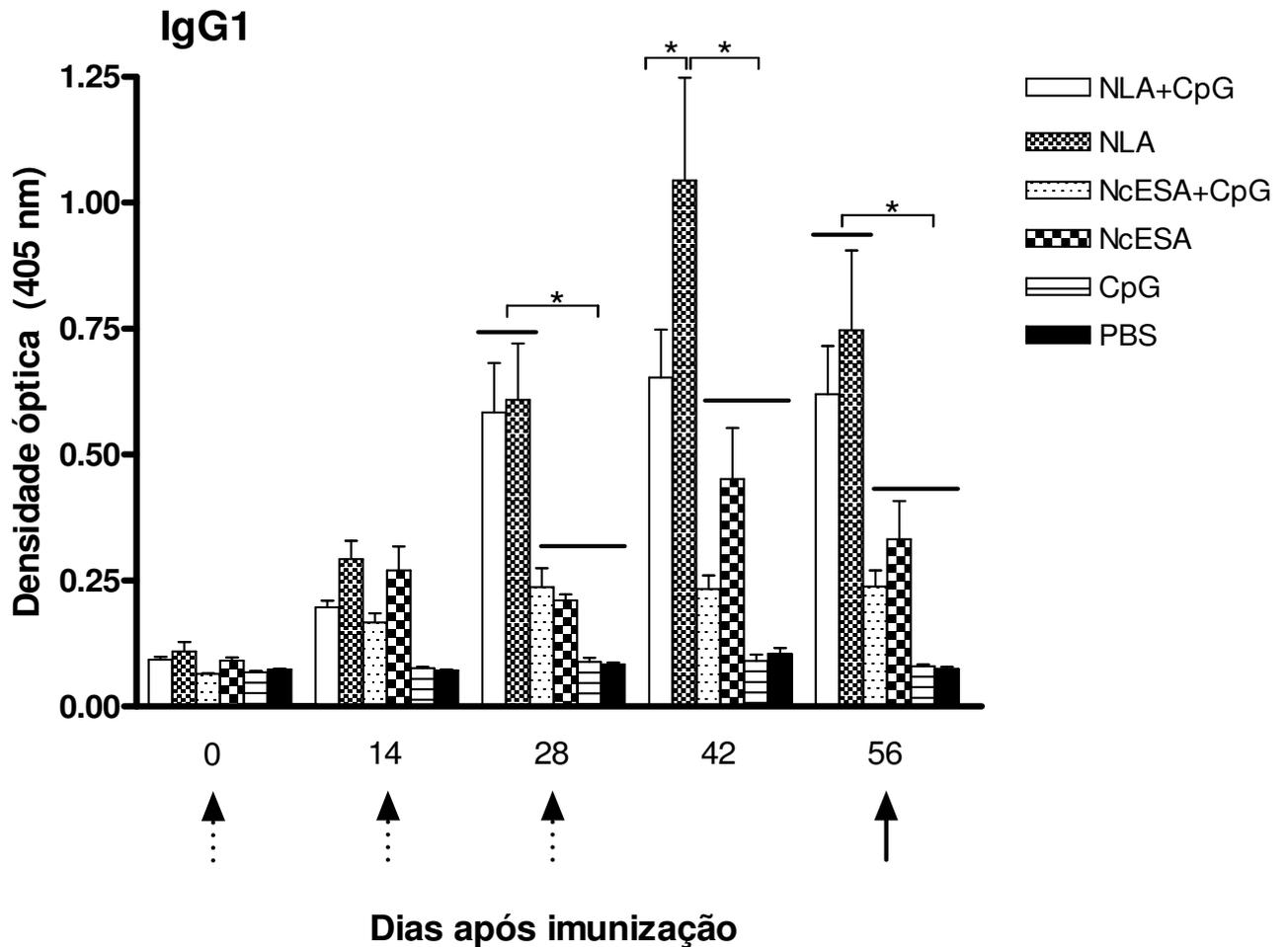
Camundongos imunizados com NLA+CpG apresentaram níveis significativamente maiores de IgG total anti-*N. caninum* do 14° ao 56° dia pós-imunização (d.p.i) em comparação com todos os outros grupos. O mesmo foi observado para o grupo imunizado apenas com NLA em relação aos grupos restantes ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3). Níveis de IgG total anti-*N. caninum* foram significativamente aumentados em camundongos imunizados com NcESA+CpG somente a partir do 42° d.p.i, quando comparado com o grupo NcESA e controles (CpG e PBS) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3).

Na análise da resposta do isotipo IgG1 anti-*N. caninum* (Fig. 4), o grupo imunizado apenas com NLA mostrou níveis significativamente aumentados deste isotipo do 28° ao 56° d.p.i em comparação com os grupos imunizados com NcESA ou NcESA+CpG ( $p < 0,05$ ). O grupo NLA+CpG também apresentou níveis elevados de IgG1 aos 28° e 56° d.p.i em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), embora menores níveis foram detectados no 42° d.p.i quando comparado ao grupo imunizado apenas com NLA ( $p < 0,05$ ).

As respostas do isotipo IgG2a anti-*N. caninum* (Fig. 5) foram similares às respostas de IgG total específica, com níveis significativamente aumentados deste isotipo aos 28° e 42° d.p.i em camundongos imunizados com NLA ou NLA+CpG em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Antes do desafio, aos 56 d.p.i, níveis similares de IgG2a foram encontrados nos grupos imunizados com NcESA+CpG e NLA, mas foram significativamente mais elevados do que nos grupos imunizados apenas com NcESA e grupos controles ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Níveis de IgG total anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes (setas pontilhadas) com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção). Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 (seta contínua). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 28, 42 e 56 após imunização. Valores de  $DO_{405nm}$  são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ .

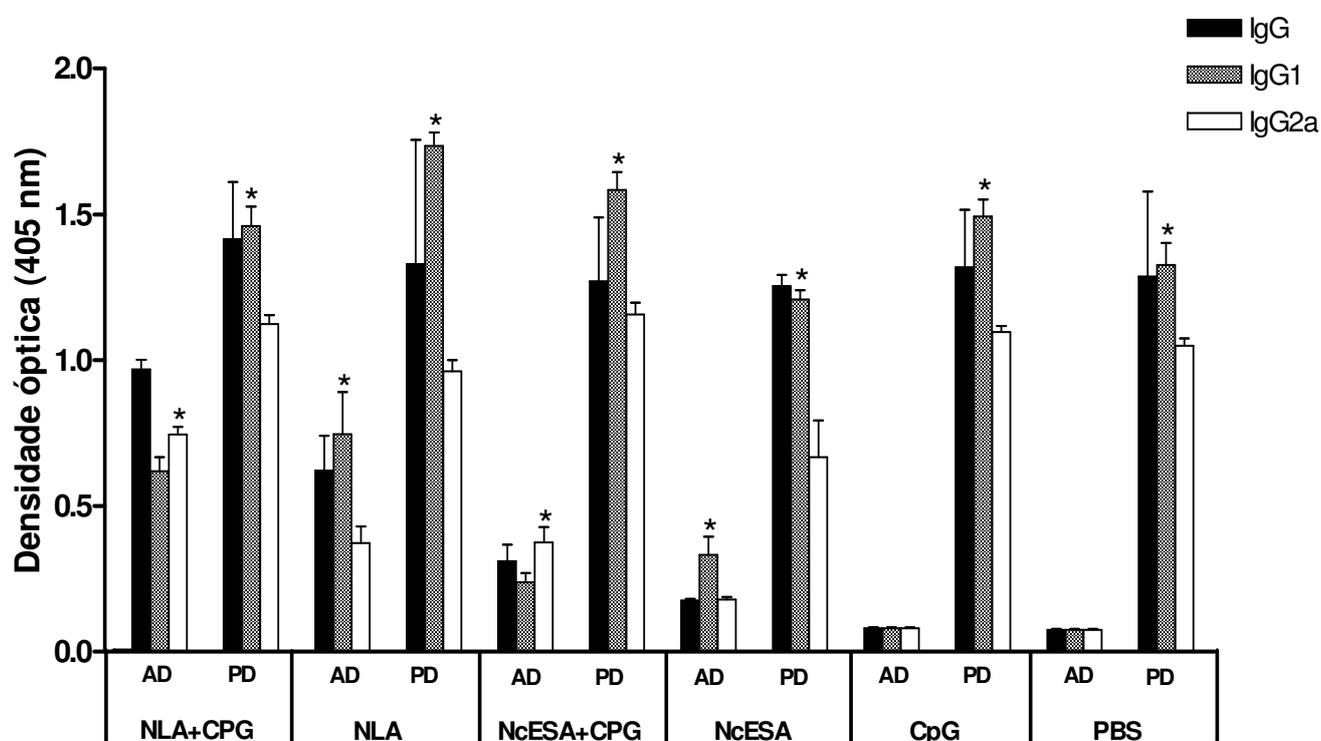


**Figura 4.** Níveis de IgG1 anti-*N.caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes (setas pontilhadas) com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção). Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 (seta contínua). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 28, 42 e 56 após imunização. Valores de  $DO_{405nm}$  são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ .



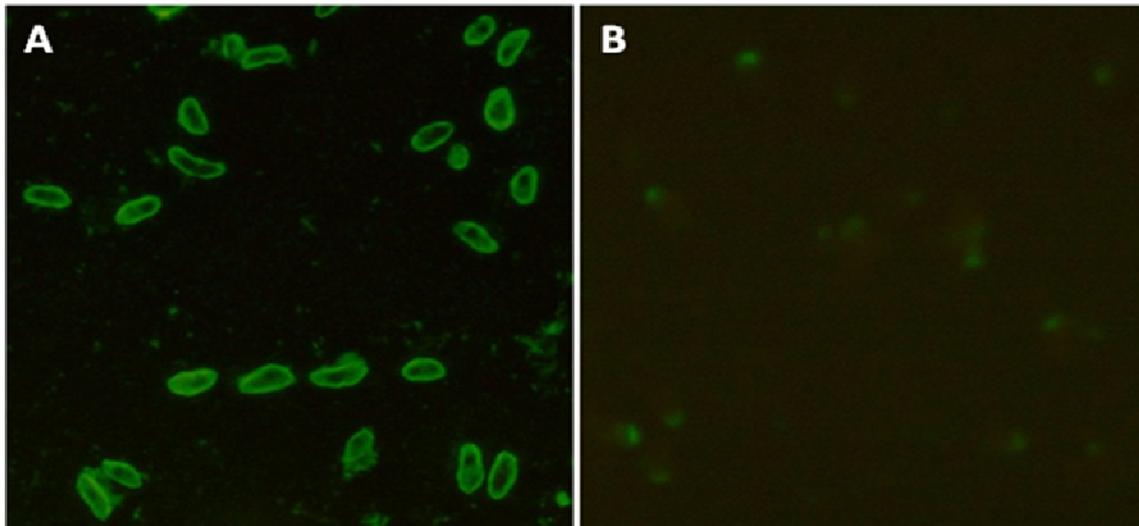
**Figura 5.** Níveis de IgG2a anti-*N.caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes (setas pontilhadas) com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção). Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 (seta contínua). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 28, 42 e 56 após imunização. Valores de  $DO_{405nm}$  são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ .

A soroconversão e resposta de isotipos de anticorpos IgG anti-*N. caninum* foram comparadas antes e após desafio com taquizoítas de Nc-1 em todos os grupos experimentais (Fig. 6). Após o esquema de imunização e antes do desafio, os níveis de IgG2a anti-*N. caninum* foram significativamente mais elevados do que IgG1 em camundongos imunizados com qualquer um dos antígenos (NLA ou NcESA) combinados com CpG, enquanto que nos grupos imunizados apenas com os antígenos houve uma resposta mais elevada do isotipo IgG1 em relação ao IgG2a ( $p < 0,05$ ). Após o desafio, todos os grupos experimentais demonstraram um significativo aumento na resposta de todos os anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG2a), com níveis significativamente aumentados de IgG1 em relação a IgG2a em todos os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Soroconversão e resposta de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção). As amostras de soros foram analisadas aos 56 dias após imunização antes do desafio (AD) e aos 32 dias pós-desafio (PD). Valores de DO<sub>405nm</sub> são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  na comparação entre os níveis de IgG1 e IgG2a em cada grupo experimental.

O padrão de imunomarcção dos taquizoítas de *N. caninum* foi analisado com amostras de soros de camundongos aos 42 d.p.i. em todos os grupos experimentais por RIFI (Fig. 7). Foi observado um distinto padrão de imunomarcção de taquizoítas de *N. caninum* quando testados com soros de animais imunizados com NLA ou NLA+CpG (Fig. 7A), apresentando fluorescência brilhante, linear e periférica na superfície dos taquizoítas, quando comparado com os grupos imunizados com NcESA ou NcESA+CpG (Fig. 7B), que mostraram apenas uma fraca coloração na porção apical dos taquizoítas.

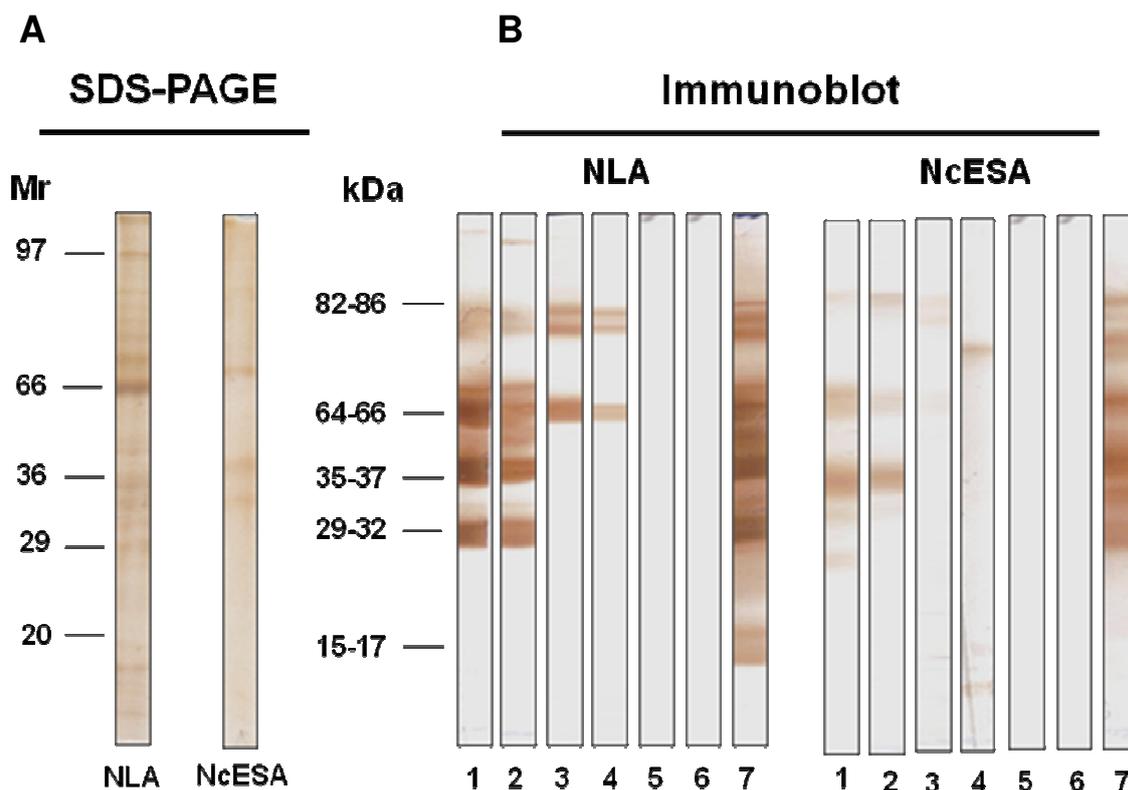


**Figura 7.** Fotomicrografia de taquizoítas de *N. caninum* testados com soros de camundongos C57BL/6 após 42 dias de imunização com antígenos NLA ou NLA+CpG (A) e NcESA ou NcESA+CpG (B) em reação de imunofluorescência indireta. Aumento de 400 X.

O perfil de reatividade dos soros de camundongos aos 42 d.p.i. em todos os grupos experimentais também foi analisado por *immunoblot* de antígenos NLA e NcESA (Fig. 8). Os géis de SDS-PAGE corados por nitrato de prata mostraram diferenças no perfil eletroforético dos antígenos NLA e NcESA (Fig. 8A), com uma ampla faixa de componentes protéicos (14 a 97 kDa) visualizadas no antígeno NLA comparado a uma faixa mais restrita (29 a 86 kDa) no antígeno NcESA.

Resultados de *immunoblot* mostraram nítido padrão diferencial de reatividade de anticorpos IgG exibido por soros de camundongos imunizados com NLA ou NLA+CpG, com forte marcação e maior número de bandas antigênicas reconhecidas no antígeno NLA (29-32, 35-37, 64-66 e 82-86 kDa) em comparação com menor reconhecimento de componentes antigênicos (64-66 e 82-86 kDa) revelados por soros de animais imunizados com NcESA ou NcESA+CpG (Fig. 8B).

Quando os soros foram testados frente ao antígeno NcESA em *immunoblot*, bandas antigênicas de NcESA apresentaram maior reatividade com soros de camundongos imunizados com NLA ou NLA+CpG em relação aos grupos NcESA ou NcESA+CpG, embora com intensidade visivelmente menor do que para o antígeno NLA (Fig. 8B).



**Figura 8.** Perfil eletroforético de antígenos NLA e NcESA de *N. caninum* em SDS-PAGE a 12% corado com nitrato de prata (**A**) e *Immunoblot* (**B**) de antígenos NLA e NcESA testados com soros representativos de cada grupo experimental: NLA+CpG (linha 1); NLA (linha 2); NcESA+CpG (linha 3); NcESA (linha 4); CpG (linha 5); PBS (linha 6). Soro controle positivo de camundongo infectado com *N. caninum* (linha 7). Marcadores de massas moleculares (Mr) e antígenos imunodominantes de *N. caninum* são expressos em kiloDaltons (kDa).

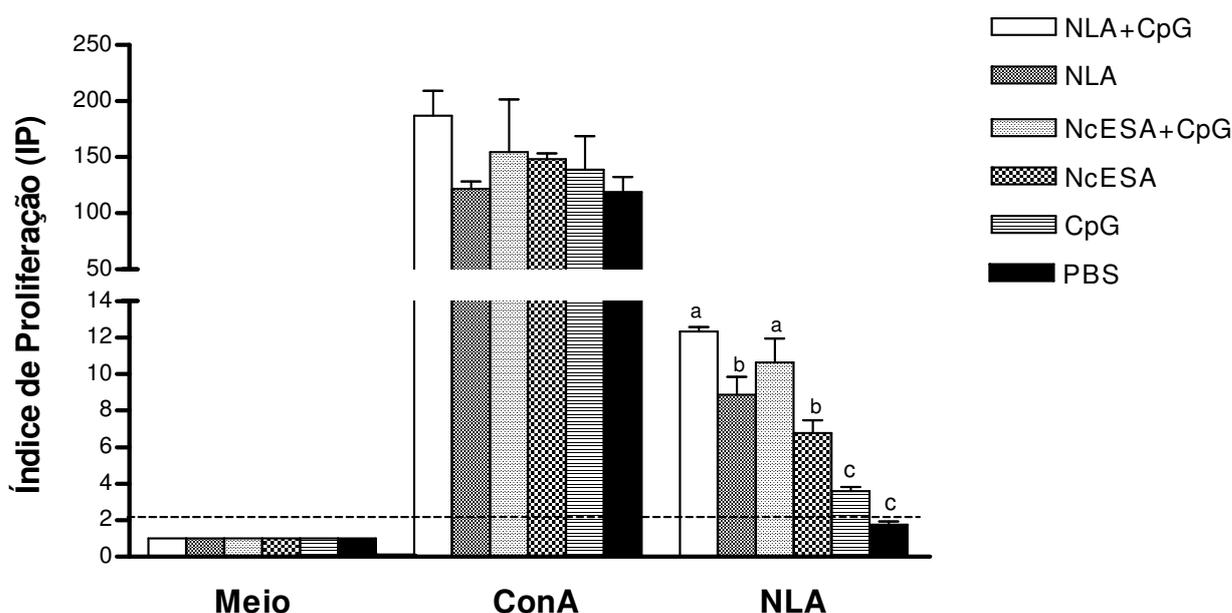
## 5.2. Resposta imune celular após imunização com antígenos de *N. caninum*

### 5.2.1. Resposta proliferativa

A análise de proliferação foi realizada após 15 dias da 3ª dose de imunização com as diferentes formulações de antígenos e adjuvante em todos os grupos experimentais. A resposta proliferativa de células do baço foi determinada após 72 horas de estimulação com o mitógeno ConA, antígeno NLA ou meio de cultura (controle) (Fig. 9).

Como esperado, o estímulo mitogênico provocou uma forte resposta proliferativa de células do baço em todos os grupos experimentais. No entanto, após estímulo antigênico, os grupos de animais imunizados com NLA ou NcESA combinados com CpG mostraram maior resposta proliferativa quando comparado com os grupos imunizados apenas com antígenos ( $p < 0,05$ ).

Todos os grupos imunizados com antígenos apresentaram índice de proliferação (IP) maior do que aquele encontrado para os grupos controles (CpG e PBS) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Resposta proliferativa de células do baço de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção). Células foram coletadas duas semanas após a 3ª dose de imunização e cultivadas na presença de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Concanavalina A (ConA), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  antígeno NLA, ou meio somente. Índice de proliferação (IP) foi determinado após 72 horas de estimulação. Valores são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. A linha pontilhada indica o limite para valores positivos de IP ( $\text{IP} > 2$ ). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

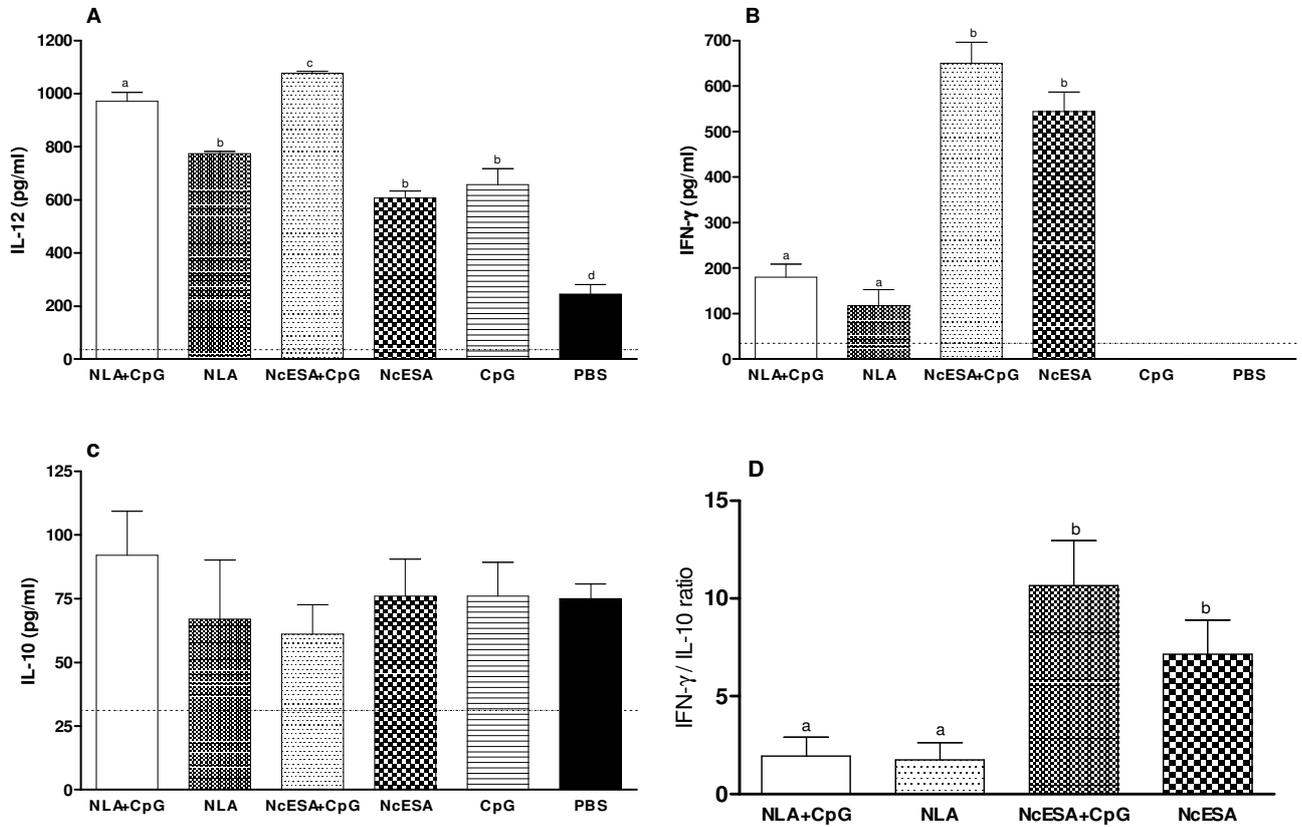
### 5.2.2. Produção de citocinas

A produção de citocinas foi analisada em sobrenadantes de cultura de células do baço após estimulação com antígeno NLA (Fig. 10). Foram detectados altos níveis de IL-12 em todos os grupos experimentais (Fig. 10A), embora os grupos NLA ou NcESA combinados com CpG induziram níveis significativamente mais elevados de IL-12 em comparação com os grupos imunizados apenas com antígenos (NLA ou NcESA) e grupos controles (CpG e PBS) ( $p < 0,05$ ). A produção de IL-12 foi também mais elevada no grupo NcESA+CpG do que no grupo NLA+CpG ( $p < 0,05$ ).

Níveis de IFN- $\gamma$  foram significativamente maiores nos grupos NcESA+CpG e NcESA do que nos grupos NLA+CpG e NLA ( $p < 0,05$ ), e estes dois últimos grupos apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  significativamente mais elevados do que os grupos controles (CpG e PBS) (Fig. 10B).

Em relação à dosagem de IL-10, baixos níveis foram detectados em todos os grupos experimentais e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos (Fig. 10C). No entanto, quando a razão IFN- $\gamma$ /IL-10 foi calculada (Fig. 10D), foi observada uma significativa maior proporção de IFN- $\gamma$  em relação à IL-10 nos grupos NcESA+CpG e NcESA ( $p < 0,05$ ).

Níveis de IL-4 foram encontrados abaixo do limite de detecção da análise em todos os grupos experimentais e todas as citocinas analisadas exibiram níveis detectáveis após estimulação mitogênica em todos os grupos (dados não mostrados).



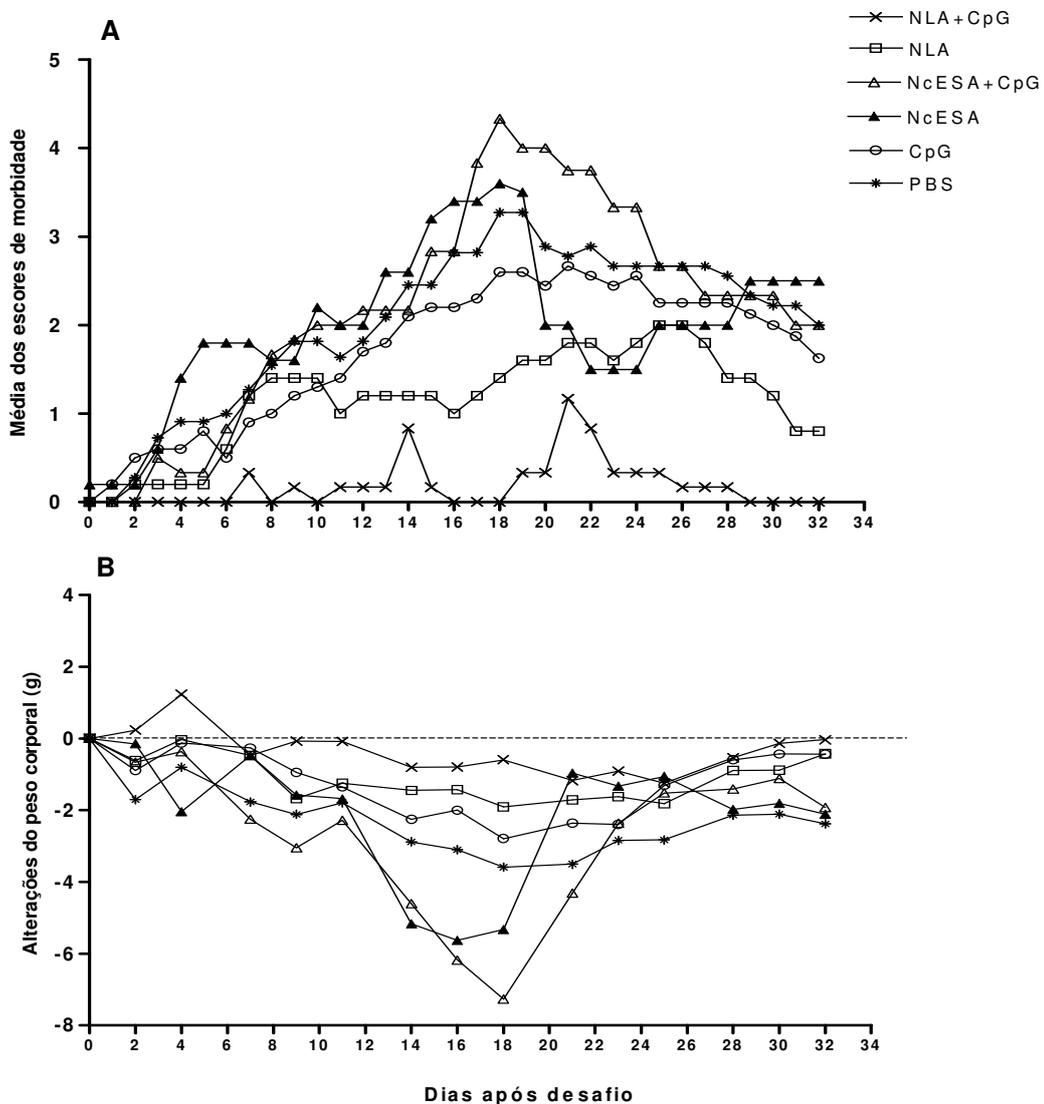
**Figura 10.** Produção de citocinas por células de baço de camundongos C57BL6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção). Células foram coletadas duas semanas após a 3<sup>a</sup> dose de imunização e cultivadas na presença de 5  $\mu$ g/mL Concanavalina A (ConA), 10  $\mu$ g/mL antígeno NLA, ou meio somente. Sobrenadantes de cultura estimulados com antígeno NLA foram analisados após 48 horas para IL-12 (A) ou 72 horas para IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) por ELISA. A razão IFN- $\gamma$ /IL-10 foi também calculada (D). Valores indicam a média  $\pm$  erro padrão da média. As linhas pontilhadas indicam o limite de detecção para cada ensaio de citocina. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

### **5.3. Sinais clínicos e mortalidade após desafio com *N. caninum***

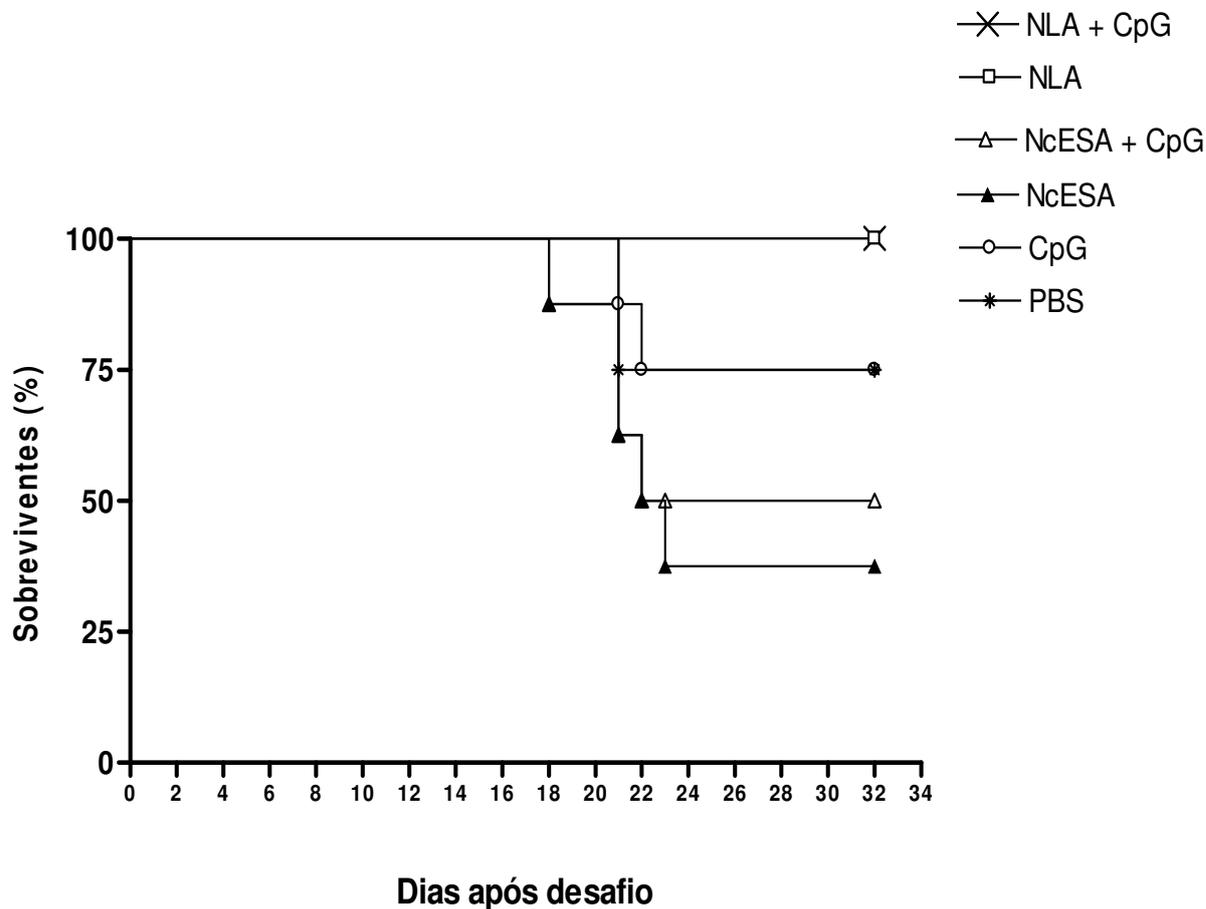
Após desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1, os camundongos foram observados diariamente quanto aos sinais clínicos e avaliados por escores de morbidade e alterações do peso corporal (Fig. 11). Foi observado que os camundongos imunizados com NLA+CpG apresentaram o menor escore médio de morbidade em comparação com os outros grupos ( $p < 0,01$ ). O grupo imunizado apenas com NLA também apresentou escore médio de morbidade significativamente menor em relação aos outros grupos, exceto para o grupo NLA+CpG ( $p < 0,01$ ) (Fig. 11A).

Na análise das alterações do peso corporal dos animais em relação ao tempo zero do desafio, foi constatado que camundongos imunizados com NcESA, NcESA+CpG ou PBS apresentaram significativa redução na média do peso corporal em relação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ), com considerável perda de peso do 10º ao 20º dia após desafio (Fig. 11B).

Os camundongos foram também observados diariamente quanto à mortalidade após desafio e curvas de sobrevida foram determinadas (Fig. 12). Todos os camundongos imunizados com NLA+CpG ou NLA sobreviveram ao desafio enquanto aqueles imunizados com NcESA+CpG ou NcESA apresentaram a mais baixa porcentagem de sobrevivência, com diferenças significantes em relação aos grupos NLA+CpG ou NLA ( $p < 0,05$ ). Animais imunizados com PBS ou CpG apresentaram porcentagens de sobrevida intermediárias entre os outros grupos após o desafio com taquizoítas de Nc-1.



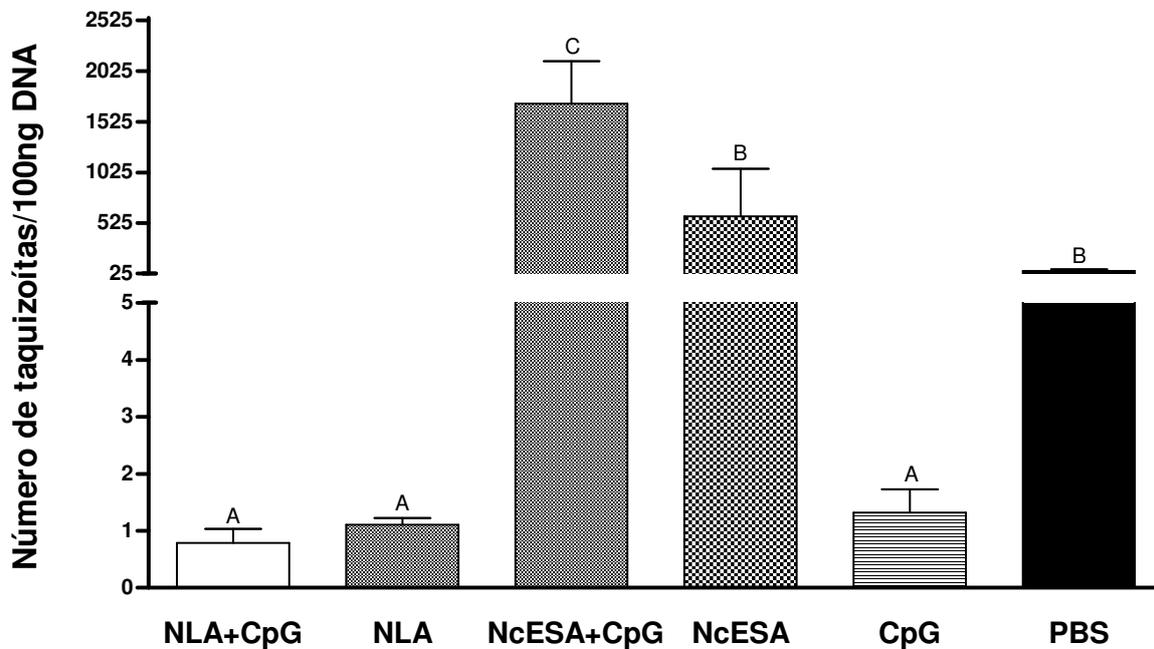
**Figura 11.** Escores médios de morbidade (**A**) e alterações do peso corporal (**B**) de camundongos C57BL6 imunizados com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção) e desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1. Camundongos imunizados com NLA+CpG e NLA apresentaram os menores escores médios de morbidade e alterações do peso corporal, enquanto os grupos NcESA+CpG ou NcESA exibiram os mais altos escores de morbidade e alterações do peso corporal em comparação com os demais grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Curva de sobrevivência de camundongos C57BL6 imunizados com antígenos NLA ou NcESA associados ou não com adjuvante CpG, CpG (controle do adjuvante) ou PBS (controle da infecção) e desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1. Camundongos imunizados com NLA+CpG ou NLA isoladamente apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência (100%) em relação aos grupos imunizados com NcESA+CpG ou NcESA somente ( $p < 0,05$ ).

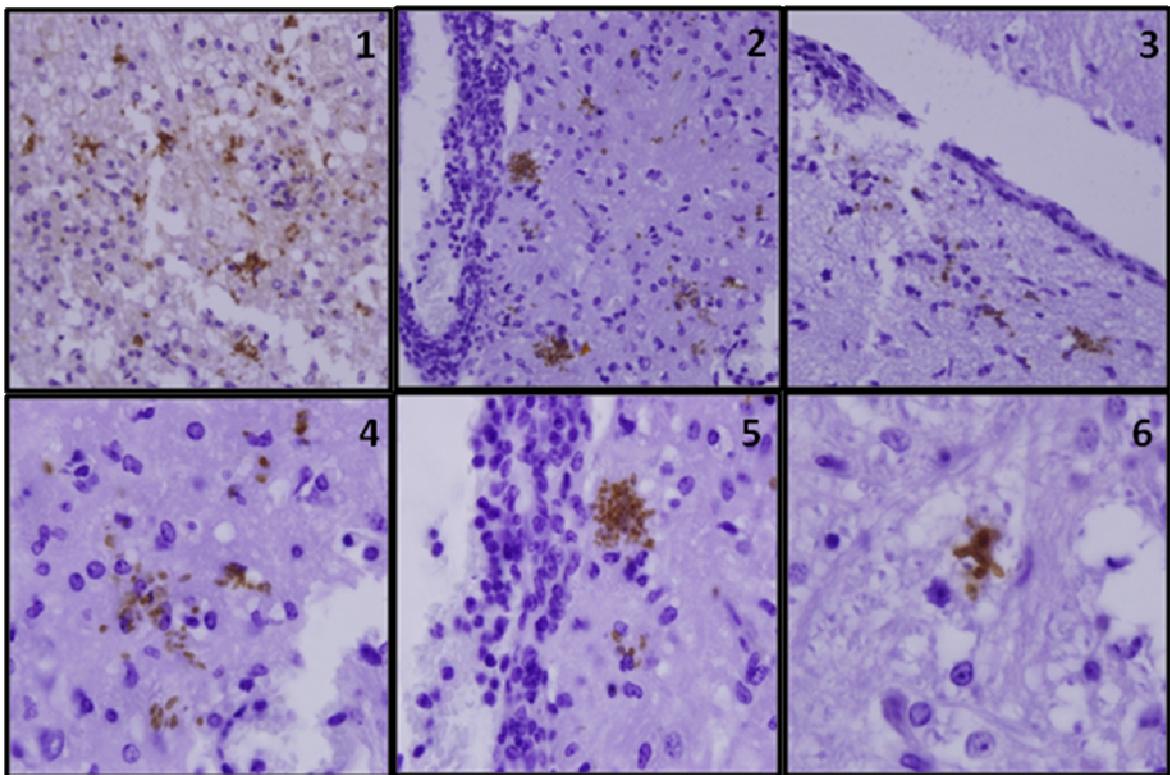
#### 5.4. Carga parasitária cerebral após desafio com *N. caninum*

A carga parasitária cerebral nos camundongos sobreviventes após o desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas de Nc-1 foi determinada por PCR em tempo real (Fig. 13). Camundongos imunizados com NcESA+CpG demonstraram a mais alta carga parasitária em relação aos outros grupos, seguido pelo grupos NcESA e PBS ( $p < 0,05$ ). Em contraste, a carga parasitária cerebral foi significativamente menor nos grupos de animais imunizados com NLA+CpG, NLA isoladamente e CpG, quando comparado com os outros grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13.** Carga parasitária cerebral, determinada por PCR em tempo real, em camundongos sobreviventes de todos os grupos experimentais após desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum*. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

Análise imunohistoquímica foi também realizada para determinação e confirmação do parasitismo cerebral após o desafio com taquizoítas de Nc-1 (Fig. 14). Foi observado um menor parasitismo cerebral nos grupos imunizados com NLA+CpG, NLA ou CpG em contraste aos animais imunizados com NcESA+CpG, NcESA ou PBS que mostraram intensa imunocoloração de taquizoítas e vacúolos parasitóforos de *N. caninum*.



**Figura 14.** Fotomicrografias representativas da análise imunohistoquímica de cérebros de camundongos dos grupos NcESA+CpG (1, 4), NcESA (2, 5) e PBS (3, 6), mostrando taquizoítas e vacúolos parasitóforos de *N. caninum* intensamente corados. As preparações foram coradas com DAB e hematoxilina de Harris foi utilizada para contracoloração. Aumentos de 400X (1, 2, 3) e 1000X (4, 5, 6).

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo primordial do desenvolvimento de vacinas contra neosporose é selecionar antígenos específicos de *N. caninum* que induzam imunidade protetora. Vários antígenos recombinantes de superfície do parasito, bem como proteínas recombinantes de organelas secretórias como roptrias, micronemas e grânulos densos, têm sido avaliados como potenciais candidatos à vacinação, associados com diferentes formulações de adjuvantes e novas estratégias de administração de antígenos (INNES et al., 2007; DEBACHE et al., 2008 ).

Preparações de vacinas contendo uma única proteína são consideradas menos efetivas do que associação de vários antígenos protetores (CANNAS et al., 2003b). Deste modo, vacinas multi-componentes contendo uma combinação de antígenos parasitários protetores, tais como taquizoítas vivos atenuados ou  $\gamma$ -irradiados, bem como antígenos de lisado total de *N. caninum*, poderiam constituir em uma escolha mais racional para a formulação de vacinas efetivas contra neosporose (LINDSAY et al., 1999).

Antígenos de lisado total de taquizoítas de *N. caninum* foram incorporados em diferentes preparaões de adjuvantes, tais como vesículas surfactantes não iônicas, adjuvante completo de Freund (BASZLER; McELWAIN; MATHISON, 2000), Quil A (derivado de saponina) ou ISCOMs (LÚNDEN et al., 2002), para induzir imunidade protetora em camundongos. Entretanto, pouco é conhecido sobre o uso de ODN-CpG como imunoadjuvante no controle da neosporose, exceto em um estudo que avaliou a incorporação de CpG em DNA de plasmídeo codificando o antígeno NcGRA7 em um modelo de transmissão congênita, resultando em considerável aumento no nível de proteção contra transferência congênita de *N. caninum* (JENKINS et al, 2004).

O papel dos antígenos de excreção-secreção (ESA) de parasitos, como *T. gondii* e *Leishmania* sp, em estimular o sistema imune do hospedeiro através da indução de resposta imune mediada por células e anticorpos, além de constituírem fatores de virulência dos parasitos, tem sido bastante investigado. Estes antígenos desempenham importante função na interação parasito-célula hospedeira e nos mecanismos de invasão celular, influenciando na patogênese e no escape da resposta imune do hospedeiro (DARYANI et al., 2003; HAFID et al., 2005; HOLZMULLER et al., 2005; CHENIK et al., 2006;). Deste modo, a utilização de antígenos de excreção-secreção tem sido sugerida para o desenvolvimento de estratégias de vacinação contra parasitos

intracelulares, particularmente *T. gondii* (HAFID et al., 2005; COSTA-SILVA et al., 2008).

Até o presente momento, não existe nenhum estudo publicado avaliando o potencial de antígenos excretados-secretados de *N. caninum* (NcESA) ou antígenos de lisado total de *N. caninum* (NLA) combinados com CpG em induzir resposta imune e proteção contra infecção com *N. caninum* em camundongos.

No presente estudo, as respostas sorológicas avaliadas após o esquema de vacinação dos camundongos mostraram uma imunogenicidade consideravelmente maior para o antígeno NLA do que NcESA, particularmente quando combinado com CpG, como demonstrado pelos altos níveis de IgG total anti-*N. caninum* e o aumento na produção do isotipo IgG2a. Em contraste, vacinação com qualquer um dos antígenos isoladamente, principalmente para NLA, induziu maior produção do isotipo IgG1. Estes resultados indicam que antígenos combinados com o adjuvante CpG foram capazes de induzir uma resposta imune humoral direcionada para o perfil Th1, enquanto os antígenos isoladamente induziram resposta imune humoral predominantemente do tipo Th2. Estes achados são consistentes com vários estudos que demonstraram a mudança para o isotipo IgG2a em modelos de vacinas associadas ao adjuvante CpG contra infecções parasitárias, tais como *Leishmania* sp (JAAFARI et al, 2007), *Trypanosoma cruzi* (FRANK et al., 2003), *Plasmodium falciparum* (MULLEN et al., 2007) e *T. gondii* (EL-MALKY et al, 2005), reforçando a capacidade de ODN-CpGs em aumentar a resposta imune mediada por células e anticorpos em vacinações através da ativação preferencial de células Th1 e do isotipo IgG2a em camundongos (ZIMMERMANN et al., 2007).

Embora o antígeno NcESA tenha mostrado ser menos imunogênico que NLA, a associação com o adjuvante CpG foi capaz de induzir resposta imune humoral com mudança para o isotipo IgG2a. Não há relatos na literatura sobre a utilização de antígenos de excreção-secreção de *N. caninum* em procedimentos de vacinação, mas um estudo utilizando antígeno ESA de *T. gondii* associado à toxina da cólera como adjuvante na imunização oral de camundongos demonstrou a indução de resposta imune humoral sistêmica e de mucosa, pela detecção de anticorpos séricos e fecais das classes IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* (HAFID et al., 2005). Mais recentemente, antígenos ESA de taquizoítas de *T. gondii* foram também avaliados na imunização de uma nova linhagem de camundongos (AS/n) susceptível ao parasito, mostrando um aumento nos níveis de anticorpos após imunização (COSTA-SILVA et al., 2008).

A diferença na imunogenicidade dos antígenos NLA e NcESA, associados ou não com CpG, foi também demonstrada pelo padrão diferencial de imunomarcção de taquizoítas vistos em RIFI como também pelo distinto perfil de reconhecimento antigênico em *immunoblot* por soros de camundongos após 42 d.p.i., comprovando que o tipo de antígeno influenciou mais na magnitude da resposta imune do que o adjuvante utilizado, com uma maior resposta imune humoral induzida por NLA do que NcESA. Resultados similares foram encontrados em um recente estudo com antígenos ESA de taquizoítas de *T. gondii*, demonstrando que anticorpos anti-ESA também reagiram com antígenos totais de taquizoítas e se ligaram na superfície do parasito, com maior intensidade na região apical (COSTA-SILVA et al., 2008).

Foi também analisado se o tipo de resposta imune conferida pela imunização dos camundongos com os antígenos NLA ou NcESA combinados com o adjuvante CpG poderia ser mantida após desafio com o parasito. No entanto, um considerável aumento de ambos os isotipos IgG1 e IgG2a foi observado, indicando que o parasito foi capaz de modular ambos os tipos de resposta imune, Th1 e Th2, embora com predominante resposta imune humoral direcionada para o perfil Th2. Isto provavelmente pode ser explicado devido à alta dose ( $2 \times 10^7$  taquizoítas) de desafio com o isolado Nc-1, que promoveu uma mudança global da resposta imune direcionada para o isotipo IgG1. Além disso, camundongos imunizados somente com CpG ou PBS também mostraram uma alta soroconversão e aumento dos níveis do isotipo IgG1 em resposta ao desafio, reforçando a idéia que o isolado Nc-1 pode ser responsável pelo direcionamento para uma resposta imune humoral do tipo Th2. Achados similares foram encontrados em camundongos imunizados com uma cepa mutante de *T. gondii* sensível à temperatura (ts4) associada ao CpG e desafiados com a cepa RH de *T. gondii* (SPENCER et al., 2004). Em contraste, estudos usando antígenos de *T. cruzi* combinados com ODN-CpG não demonstraram mudanças no tipo de resposta imune promovida pela imunização após desafio com o parasito (FRANK et al., 2003).

Respostas proliferativas de células do baço e produção de citocinas confirmaram que ambos os antígenos NLA e NcESA combinados com ODN-CpG induziram resposta imune celular mais forte quando comparado aos grupos imunizados com os antígenos isoladamente e grupos controles (CpG e PBS). Esta superioridade na resposta imune celular foi evidenciada pelo alto índice de proliferação e níveis aumentados de IL-12 após estimulação antigênica *in vitro* detectados em camundongos imunizados com antígenos associados ao CpG. Foi observado também que o grupo imunizado apenas

com o adjuvante CpG induziu um aumento dos níveis de IL-12, indicando que ODN-CpGs estimulam a imunidade inata através da ligação ao TLR-9 e aumentam a resposta imune à vacinação pela ativação de células do perfil Th1 e liberação de citocinas associadas a esse perfil, tais como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (EL-MALKY et al., 2005; ZIMMERMANN et al., 2007).

Além disso, grupos imunizados com NcESA+CpG ou NcESA isoladamente exibiram maiores níveis de IFN- $\gamma$  quando comparado aos grupos NLA+CpG ou NLA, refletindo uma vigorosa resposta imune celular direcionada para o perfil Th1. Embora níveis de IL-10 foram baixos e similares em todos os grupos experimentais, uma alta razão IFN- $\gamma$ /IL-10 foi observada para os grupos imunizados com NcESA+CpG ou NcESA, reforçando a idéia que o tipo de antígeno foi mais responsável em induzir forte resposta imune celular do tipo Th1 do que o adjuvante. Além disso, foi demonstrado que antígenos ESA de *T. gondii* são capazes de induzir maior resposta imune mediada por células do que os antígenos solúveis (DARYANI et al., 2003).

Após desafio com o isolado Nc-1, os grupos imunizados com NcESA+CpG ou NcESA apresentaram surpreendentemente os mais altos escores médios de morbidade, as maiores perdas de peso corporal e taxas de mortalidade, como também a maior carga parasitária cerebral, como determinada por PCR e imunohistoquímica. É possível que estes parâmetros clínicos observados nos grupos de animais imunizados com antígenos NcESA, isoladamente ou combinado com CpG, estejam relacionados à indução exacerbada de IFN- $\gamma$  com deficiente imunoregulação por IL-10, como observado pela alta razão IFN- $\gamma$ /IL-10 encontrada nestes grupos. Esse padrão de resposta imune caracterizado por forte resposta celular em combinação com fraca resposta imune humoral pode ter levado os animais a sucumbirem à infecção após o desafio. Neste contexto, um recente estudo com vacinas baseadas em proteínas recombinantes de micronemas (NcMIC4) mostrou aumento da mortalidade e da infecção cerebral em camundongos após desafio com taquizoítas de *N. caninum*, associados também com baixa resposta de anticorpos antes do desafio (SRINIVASAN et al., 2007).

Sabe-se que a maioria das proteínas de micronemas de parasitos Apicomplexa são liberadas para o meio extracelular, seja por proteólise ou por secreção de formas solúveis (NAGULESWARAN et al., 2001). Portanto, é possível que os efeitos deletérios da imunização de camundongos com NcESA+CpG ou NcESA estejam relacionados com a presença de proteínas de micronemas nas preparações deste

antígeno. Análises posteriores serão requeridas para caracterizar o perfil proteômico do antígeno de excreção-secreção de *N. caninum* utilizado no presente estudo.

Em contrapartida, os grupos de camundongos imunizados com NLA+CpG ou NLA isoladamente exibiram os mais baixos escores médios de morbidade e alterações do peso corporal, e nenhum animal sucumbiu à infecção após o desafio. Estes parâmetros clínicos foram também associados com a mais baixa carga parasitária cerebral determinada pelo PCR e imunohistoquímica. Deste modo, a alta proteção observada em camundongos vacinados com NLA+CpG ou NLA parece estar associada com uma efetiva resposta imune humoral, caracterizada pelos altos níveis de IgG total específica e resposta elevada do isotipo IgG2a, e uma resposta imune celular protetora com adequado balanço de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (razão IFN- $\gamma$ /IL-10). Neste contexto, ambas as respostas imunes mediada por células e anticorpos parecem ser requeridas para imunidade à infecção por *N. caninum* (HEMPHILL et al., 2006).

Em contraste, imunização de camundongos com antígenos de lisado de *N. caninum* incorporados em vesículas surfactantes não iônicas como adjuvante exacerbou o quadro de encefalite e doença neurológica em camundongos (BASZLER et al., 2000). Por outro lado, a administração do mesmo antígeno com o adjuvante Quil A ou ISCOMs resultou em aumento na proteção de camundongos após o desafio com o parasito (LÚNDEN et al., 2002). A utilização do adjuvante ImmunoMAXSR® associado ao antígeno de lisado total de *N. caninum* induziu proteção de fêmeas gestantes contra transmissão vertical de *N. caninum* (LIDDELL et al., 1999), mas a imunização de camundongos utilizando parasitos vivos antes do acasalamento resultou em nível significativamente melhor de proteção contra transmissão vertical, quando comparado com camundongos imunizados com preparações de lisado total (MILLER et al., 2005). Desta forma, pode-se verificar que antígenos de lisados totais de *N. caninum* com diferentes adjuvantes têm mostrado resultados contraditórios, variando de parcial a total proteção contra transmissão vertical em camundongos, ou até mesmo à exacerbação da doença neurológica.

Os grupos controles (CpG e PBS) apresentaram intermediários escores de morbidade, alterações de peso corporal e porcentagens de mortalidade, mas a carga parasitaria cerebral analisada por PCR foi maior em camundongos imunizados com PBS em relação aos animais do grupo CpG. Estudos prévios têm demonstrado que há pouca correlação entre a carga parasitária no cérebro e a doença cerebral, e que a ocorrência da

neosporose cerebral pode estar ligada a fatores adicionais como a localização dos parasitos no cérebro, resposta imune celular e humoral, pureza e composição dos antígenos e o tipo de adjuvante utilizado (CANNAS et al., 2003a,b; ALAEDDINE et al., 2005).

De uma forma global, os resultados do presente estudo mostraram que ODN-CpG foi capaz de induzir elevada resposta imune humoral do tipo Th1 pela produção de maiores níveis de IgG2a que IgG1 quando associado a qualquer um dos antígenos (NLA ou NcESA), mas uma forte resposta imune celular associada com altos níveis de IFN- $\gamma$  foi relacionada mais ao antígeno NcESA do que ao adjuvante utilizado. Além disso, a vacinação com NLA+CpG ou NLA resultou em total proteção dos camundongos enquanto o antígeno NcESA isoladamente ou combinado com CpG, induziu maior susceptibilidade dos animais após desafio com *N. caninum*.

## 7. CONCLUSÕES

- O adjuvante ODN-CpG foi capaz de aumentar a imunogenicidade de ambos antígenos NLA e NcESA na imunização de camundongos contra neosporose, pela indução de maiores níveis séricos de IgG total anti-*N. caninum* quando comparado com os grupos imunizados apenas com antígenos;
- A imunização de camundongos com antígenos NLA ou NcESA combinados com o adjuvante ODN-CpG induziu resposta imune humoral direcionada para o perfil Th1, com produção de maiores níveis do isotipo IgG2a anti-*N. caninum*, enquanto a imunização apenas com antígenos direcionou a resposta imune humoral para o perfil Th2, pela produção de maiores níveis do isotipo IgG1;
- A imunogenicidade do antígeno NLA foi consideravelmente maior do que NcESA, principalmente quando associado com ODN-CpG, evidenciado por maiores níveis séricos de IgG total anti-*N. caninum*, pelo padrão diferencial de imunomarcção de taquizoítas em RIFI e distinto perfil de reconhecimento antigênico em *immunoblot*;
- O antígeno NLA induziu maior resposta imune humoral que o antígeno NcESA na imunização de camundongos, associados ou não com ODN-CpG, indicando que o tipo de antígeno influenciou na magnitude da resposta imune;
- A imunização de camundongos com antígenos NLA ou NcESA combinados com o adjuvante ODN-CpG induziu resposta imune celular caracterizada por maiores índices de proliferação e níveis de IL-12 após estimulação antigênica *in vitro* de células do baço, quando comparado aos grupos imunizados apenas com antígenos;
- A imunização de camundongos com o antígeno NcESA ou combinado com ODN-CpG induziu os mais altos níveis de IFN- $\gamma$  e elevada razão IFN- $\gamma$ /IL-10, refletindo em forte resposta imune celular direcionada para o perfil Th1;

- Após o desafio com taquizoítas do isolado Nc-1, os animais imunizados com o antígeno NLA ou associado com ODN-CpG exibiram os menores escores de morbidade, alterações de peso corporal e carga parasitária cerebral quando comparado aos grupos imunizados com NcESA ou NcESA+CpG;
- A vacinação com antígeno NLA ou NLA+CpG resultou em total proteção dos camundongos após o desafio, enquanto o antígeno NcESA ou associado com ODN-CpG induziu maior susceptibilidade dos animais à infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAEDDINE, F.; KELLER, N.; LEEPIN, HEMPHILL, A. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in C57BL/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NcMIC1. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 3, p.657-665, 2005.

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

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.218, n.11, p.1803-1806, 2001.

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

BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.

BARLING, K. S.; McNEILL, J. W.; THOMPSON, J. A.; PASCHAL, J. C.; McCOLLUM, F. T. 3<sup>rd</sup>; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 217, n. 9, p. 1356-1360, 2000.

BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. **Parasitology**, Cambridge, v.135, n. 1, p.13-21, 2008.

BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology**, Cambridge, v.135, n. 4, p.421-432, 2006.

BASZLER, T.V.; McELWAIN, T.F.; MATHISON, B.A. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, D.C, v. 7, n. 6, p.893-898, 2000.

BJËRKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L.C.; KASPER, L.H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 4, p.535-544, 2006.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.12, p.117-118, 1964.

CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; FERREIRA, P.; DA COSTA, J.M.C.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semem in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induced neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, n. 1-3, p.109-114, 2006.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, N.; MÜLLER, N.; EPERON, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG-1 and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, Cambridge, v. 126, n.4, p.303-312, 2003a.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, N.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, HEMPHILL, A. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 1, p.44-50, 2003b.

CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.31, n.2, p.421-428, 1999. CHENIK, M.; LAKHAL, S.; BEN KHALEF, N.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potencial excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites. **Parasitology**, Cambridge, v. 132, n.4, p.493-509, 2006.

CHO, J.; CHUNG, W.; SONG, K.; NA, B.; KANG, S.; SONG, C.; KIM, T. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v.43, n.1, p. 19-25, 2005.

CHU, R.S.; TARGONI, O.S.; KRIEG, A. M.; LEHMANN, P.V.; HARDING, C. V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 186, n.10, p. 1623-1631, 1997.

COBEA. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo:Winner, 1996. 259 p.

CORRAL, R.S.; PETRAY, P.B. CpG DNA as a Th-1 promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, Amsterdam, v.19, n.2-3, p.234-242, 2001.

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

COSTA-SILVA, T.A.; MEIRA, C.S.; FERREIRA, I.M.; HIMAROTO, R.M.; PEREIRA, V.L.C. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (AS/s) for *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology** (2008), doi:10.1016/j.exppara.2008.07.015

DARYANI, A.; HOSSEINI, A.Z.; DALIMI, A. Immune responses against excrete/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 123-124, 2003.

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

DEBACHE, K.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; MEVISSSEN, M.; HEMPHILL, A. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, doi:10.1016/j.ijpara.2008.04.001

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.214, n. 8, p.1160-1163, 1999.

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

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

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

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

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

EL-MALKY, M.; SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; YABY, Y.; NOURELDIN, M.S.; SAUDY, N.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. Protective effect of vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 49, n.7, p. 639-646, 2005.

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

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

FRANK, F.M.; PETRAY, P.B.; CARZOLA, S.I.; MUÑOZ, M.C.; CORRAL, R.S.; MALCHIODI, E.L. Use of purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. **Vaccine**, Amsterdam, v.22, n. 1, p.77-86, 2003.

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

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

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

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

GONDIM, L.F.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.; JESUS, E.E.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradizoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, n.1, p.1-7, 2001.

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

HAFID, J.; VINCENT, N.; FLORI, P.; BELLETE, B.; RABERIN, H.; SUNG, R.T.M. Production of antibodies in murine mucosal immunization with *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.128, n. 1-2, p.23-28, 2005.

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

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

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J.L. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.106, n.3-4 , p.247-257, 2005.

INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, London, v.134, n. 13, p.1903-1910, 2007.

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**, Oxford, 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**, New York, v.31, n.13, p. 1523-1534, 2001.

JAAFARI, M.R.; BADIEE, A.; KHAMESIPOUR, A.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.; KHEIRI, M.T.; BARKHORDARI, F.; McMASTER, W.R.; MAHBOUDI, F. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, n. 32, p. 6107-6117, 2007.

JENKINS, M.; PARKER, C.; TUO, W.; VINYARD, B.; DUBEY, J.P. Inclusion of CpG adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 72, n. 3, p. 1817-1819, 2004.

JIANG, W.; BAKER, H.J.; SMITH, B.F. Mucosal immunization with *Helicobacter*, CpG DNA, and cholera toxin is protective. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.1, p. 40-46, 2003.

- KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A.K.; MODAL, 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**, New York, v. 37, n. 3-4, p. 329-339, 2007.
- KLINMAN, D.M.; CURRIE, D.; GURSE, I.; VERTHELYI, D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. **Immunology Reviews**, v. 199, n. 1, p.201-216, 2004.
- KRIEG, A.M. Antiinfective applications of Toll-like receptor 9 agonists. **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v. 4, n. 3, p. 289-294, 2007.
- KRINGEL, H.; DUBEY, J.P.; BESHAN, E.; HECKER, R.; URBAN Jr, J.F. CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 55-66, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LASRI, S.; DE MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 25-32, 2004.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.
- LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W.; AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington DC, v. 13, n.1, p. 84-89, 2006.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.; JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUZA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, London, v. 153, n. 12, p. 366-367, 2003.
- LOWRY, O.H.; ROSENBOROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.
- LUNDÉN, A.; WRIGHT, S.; ALLEN, J.E.; BUXTON, D. Immunization of mice against neosporosis. **International Journal Parasitology**, New York, v. 32, n. 7, p. 867-876, 2002.

MASUDA, T.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; OMATA, Y. Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 *scid* mice. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.149, n. 1-2, p.130-133, 2007.

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

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

MacCANN, C.M.; VYSE, A.J.; SALMON, R.L.; THOMAS, D.; WILLIAMS, D.J.; MacGARRY, J.W.; PEBODY, R.; TREES, A.J. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n.6, p.978-980, 2008.

MILLER, C.; QUINN, H.; RYCE, C.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. **International Journal for Parasitology**, New York, v.35, n.7, p. 821-828, 2005.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

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

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

MOORE, D.P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 87-97, 2005.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, Berlin, v.100, n. 3, p.633-636, 2007.

MULLEN, G.E.D.; AEBIG, J.A.; DOBRESU, G.; RAUSCH, K.; LAMBERT, L.; LONG, C.A.; MILES, A.P.; SAUL, A. Enhanced antibody production in mice to the malaria antigen AMA1 by CpG 7909 requires physical association of CpG and antigen. **Vaccine**, Amsterdam, v.25, n. 29, p.5343-5347, 2007.

MUTWIRI, G.K.; NICHANI, A.K.; BABIUK, S.; BABIUK, L.A. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. **Journal of Controlled Release**, Netherlands, v.97, n.1, p.1-17, 2004.

NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N. SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; BJORKMAN, C. HEMPHILL, A. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 69, n.10, p.6483-6494, 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**, Seoul, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

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

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

NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. **Vaccine**, Amsterdam, v. 19, n. 1314, p. 1710-1716, 2001b.

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

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

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

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

PATITUCCI, A. N.; PHIL, M.; PÉREZ, M. J.; ROZAS, M. A.; ISRAEL, K. F. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, n. 1, p. 252-255, 2001.

PERLÉ, K. D. M.; DEL PIERO, F.; CARR, R. F.; HARRIS, C.; STROMBERG, P. C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy.

**Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, n.3, p. 252-255, 2001.

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

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

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

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

RAMAMOORTHY, S.; SANAKKAYALA, N.; VEMULAPALLI, R.; JAIN, N.; LINDSAY, D.S.; SCHURIG, G.S. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *N.caninum* protective antigens. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 37, n. 13, p. 1531-1538, 2007.

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**, Amsterdam, v.124, n.3-4, p.139-150, 2004.

RODRIGUES, A.A.; GENNARI, S.M.; PAULA, V.S.; AGUIAR, D.M.; FUJII, T.U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R.Z.; DUBEY, J.P. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.129, n.1-2, p.21-24, 2005.

ROMERO, J.J.; PERES, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rica dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.123, n.3-4, p.149-159, 2004.

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

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**, Berlin, v. 87, n. 10, p. 873-877, 2001.

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

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

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

SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A. V.; 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**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 181-195, 2002.

SRINIVASAN, S.; MUELLER, J.; SUANA, A.; HEMPHILL, A. Vaccination with microneme protein NcMIC4 increase mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.93, n.5, p.1046-1055, 2007.

SPEER, C. A.; REDUKER, D. W.; BURGESS, D. E.; WHITMIRE, W. M.; SPLITTER, G. A. Lymphokine-induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultures bovine monocytes. **Infection and Immunity**, Washington DC, v.50, n. 2, p. 566-571, 1985.

SPENCER, J.A.; SMITH, B.F.; GUARINO, A.J.; BLAGBURN, B.L.; BAKER, H.J. The use of CpG as an adjuvant to *Toxoplasma gondii* vaccination. **Parasitology Reserch**, Berlin, v.92, n. 4, p.313-316, 2004.

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

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

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

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

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

VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.; MINEO, T.W.; 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**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 253-260, 2004.

WELTER, A.; MINEO, J.R.; DE OLIVEIRA SILVA, D.A.; LOURENÇO, E.V.; VIERRA FERRO, E.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MARIA DA SILVA, N. BALB/c mice resistant to *Toxoplasma gondii* infection proved to be highly susceptible when previously infected with *Myocoptes musculus* fur mites. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 88, n. 5, p.325-335, 2007.

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

WILLIAMS, D. J. L.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; ELLIS, J.; BJORKMAN, C.; REICHEL, M.P.; TREES, A.J. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infection and Immunity**, Washington DC, v.75, n. 3, p. 1343-1348, 2007.

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

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

ZIMMERMANN, S.; DALPKE, A.; HEEG, K. CpG oligonucleotides as adjuvant in therapeutic vaccines against parasitic infections. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.298, n.1-2, p.39-44, 2008.