



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz Camargo”

**Papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) na resposta imune
celular e humoral durante a infecção por *Neospora caninum***

Flávia Batista Ferreira

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz Camargo”



Papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) na resposta imune celular e humoral durante a infecção por *Neospora caninum*

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

Flávia Batista Ferreira

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2015

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

- F383p
2015
- Ferreira, Flávia Batista, 1987-
Papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na resposta imune celular e humoral durante a infecção por *Neospora caninum* / Flávia Batista Ferreira. - 2015.
79 f. : il.
- Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Citocinas - Teses. 3. Tumor - Fator de necrose - Teses. 4. *Neospora caninum* - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Flávia Batista Ferreira

“Papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) na resposta imune celular e humoral durante a infecção por *Neospora caninum*”

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, 19 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Djalma de Souza Lima Junior – USP/RP

Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo (orientador) – ICBIM/UFU

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus por tudo que fez e tem feito em minha vida;

Aos meus queridos e amados pais Euripedes e Ione pelo carinho, educação,
confiança, amor e incentivo;

Aos meus irmãos Aline, Daniel e Rafael pela amizade, por todos os momentos
inesquecíveis que vivemos juntos e pelo exemplo de pessoas que são;

Ao meu querido e amado esposo André pelo amor, paciência e dedicação durante
todos esses anos juntos.

A todos os meus familiares pelo incentivo, respeito e alegrias vividas.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4.13

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, pelo apoio, incentivo, confiança, ensinamentos e paciência durante todos esses anos de orientação.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Santiago pela confiança, incentivo e sugestões dadas.

Aos meus queridos e grandes amigos Arlindo, Eduardo, Eliézer, Kamilla, Murilo, Nathany, Pollyanna e Tamires pela paciência, pelos momentos descontraídos (como as nossas cantorias), pelos ensinamentos e pela força.

Às minhas “velhas amigas” Karla, Luana, Priscilla, por todos esses anos de amizade, incentivando, apoiando e auxiliando, mesmo que de longe.

Às amigas da Biologia por todos os momentos vividos durante a graduação sempre aguentando minhas manias. Foram quatro anos e meio muito proveitosos ao lado de vocês.

Aos amigos de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia Caroline, Cristina, Lara, Lydiane, Maraísa, Mariana, Maurília, Mylla, Paula, Patricio, Silas, Vanessa Miranda, Vanessa Resende, pela ajuda na realização dos experimentos, companheirismo, pelos conhecimentos compartilhados, pelo ótimo convívio.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Ana Cláudia, Marley e Zilda pelo auxílio na rotina laboratorial.

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

As secretárias do Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas Lucileide e Lucélia, pela disponibilidade em sempre nos ajudar.

As agências CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste trabalho.

RESUMO

O protozoário parasito *Neospora caninum* tem sido associado a abortos em bovinos desde o início da década de 90, onde a infecção gera grandes impactos econômicos na pecuária. TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida rapidamente durante a fase aguda da infecção, desenvolvendo um importante papel na resposta imune contra vários patógenos. Devido à importância desta citocina durante o processo de infecção agudo, este trabalho objetivou verificar o papel de TNF- α durante a infecção por *N. caninum*. Para esta finalidade, foi analisado a resposta imune celular e humoral usando camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes para o receptor 1 de TNF (TNFR1^{-/-}), infectados com taquizoítos de *N. caninum* cepa Nc-1. Foram encontrados um aumento na susceptibilidade de camundongos TNFR1^{-/-} durante a infecção, evidenciado por uma alta mortalidade e aumento na carga parasitária, um mecanismo independente de IL-12 e IFN- γ . Foi observado também que a ação de TNF- α é importante para regular a produção de subclasses de IgG. Camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram um aumento de concentração sérica da subclasse IgG2a, e uma diminuição na produção de IgG1. A partir destas informações, conclui-se que TNF- α apresenta um importante papel na resistência do hospedeiro bem como na produção de subclasses de IgG contra a infecção pelo protozoário *N. caninum*.

Palavras chave: *Neospora caninum*, TNFR1^{-/-}, citocinas.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Neospora caninum* has been associated to abortions in cattle since the early 1990's, and the infection leads to major economic impact to the segment. TNF- α is a proinflammatory cytokine produced quickly during the acute phase of infection, playing an important role in the immune response against various pathogens. Given the importance of this cytokine during acute infectious processes, we here aimed to verify the role of TNF- α during *N. caninum* infection. Therefore, we analyzed the cellular and humoral immune response using C57BL/6 wild type (WT) and genetically deficient mice in receptor 1 of TNF (TNFR1^{-/-}), infected with *N. caninum* tachyzoites of the Nc-1 strain. We found an increase in susceptibility of TNFR1^{-/-} mice, evidenced by higher mortality and increased parasite burden, in an IL-12 and IFN- γ independent mechanism. We also observed that TNF- α is required for regular IgG subclass production. TNFR1^{-/-} mice presented enhanced serum concentration of IgG2a subclass, while IgG1 production was hampered, if compared to WT mice. Gathering this information, we conclude that TNF- α presents an important role in host resistance and IgG subclass production against infection by the protozoan *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*, TNFR1^{-/-}, cytokines.



Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1 Parasito	12
1.2 Hospedeiros	12
1.3 Ciclo de vida.....	13
1.4 Patogênese e Patologia	15
1.5 Resposta imune.....	17
1.6 Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)	20
2. Justificativa.....	23
3. Objetivos.....	26
3.1 Objetivo geral:	27
3.2 Objetivos específicos:.....	27
4. Material e Métodos	28
4.1 Animais.....	29
4.2 Cultivo de células HeLa e <i>N. caninum</i>	29
4.3 Desenho experimental	30
4.4 Preparação de antígenos de <i>N. caninum</i>	31
4.4.1 Antígeno solúvel de <i>N. caninum</i>	31
4.4.2 Antígeno total de <i>N. caninum</i>	32
4.5 Homogenato de órgãos	32
4.6 Determinação da Produção de Citocinas <i>in vivo</i>	32
4.7 Determinação da produção de óxido nítrico.....	34
4.8 PCR em tempo real.....	34
4.9 Análise histopatológica para determinação da inflamação tecidual <i>in vivo</i>	35
4.10 Imunização de camundongos.....	36
4.11 Resposta imune humoral	37
4.11.1 Fenotipagem ex vivo de IgG e suas subclasses	37
4.11.2 Determinação de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses específicos para <i>N. caninum</i> em amostras de soros de camundongos	38
4.11.3 Immunoblotting para análise do perfil de reconhecimento antigênico para NLA – IgG e suas subclasses	39
4.12 Análise estatística	40
4.13 Normas de Biossegurança	41

5. Resultados.....	42
5.1 Camundongos TNFR1 ^{-/-} apresentam maior susceptibilidade a infecção por <i>N. caninum</i>	43
5.2 Animais TNFR1 ^{-/-} apresentam um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por <i>N. caninum</i>	48
5.3 Camundongos TNFR1 ^{-/-} apresentam regulação diferencial na produção de subclasses de IgG	51
6. Discussão	58
7. Conclusão	63
Referências Bibliográficas.....	65



1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Parasito

O protozoário *Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Coccidia, família Sarcocystidae, sendo reconhecido em 1984 na Noruega, infectando cães domésticos com distúrbios neurológicos e doenças musculares resultando em paralisia em filhotes e morte precoce (BJERKAS, MOHN, PRESTUHHUS, 1984), contudo foi formalmente descrito em 1988 por Dubey e colaboradores.

Visto a semelhança morfológica e o desenvolvimento parasitário, *N. caninum* foi classificado erroneamente até 1988 como pertencente ao gênero *Toxoplasma*. Entretanto algumas características como morfologia de cistos teciduais, reatividade sorológica, testes imunohistoquímicos negativos para *T. gondii*, forma de interação com hospedeiros, ciclo de vida dentre outras características serviram para distinguir ambas as espécies (BJERKAS e DUBEY, 1991; DUBEY et al., 1988; HEMPHILL, VONLAUFEN, NAGULESWARAN, 2006; INNES e MATTSSON, 2007).

1.2 Hospedeiros

Infecções por *N. caninum* detém importância em cães e bovinos, contudo, há relatos da presença do parasito em infecções naturais por meio da detecção de anticorpos e isolamento parasitário em carneiros, cabras, cavalos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, veados, alpacas, camelos e galinhas (DUBEY, 2003; GONDIM, 2006; COSTA et al., 2008; MINEO et al., 2011; ROSSI et al., 2011). Enquanto que infecções experimentais

têm sido realizadas com êxito em bovinos, carneiros, cabras, porcos, cães, gatos, camundongos, macacos e pombos (DUBEY, 2002; MINEO et al., 2009).

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), evidências sorológicas de exposição ao parasito foram demonstradas em diferentes populações (NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006; McCANN et al., 2008).

1.3 Ciclo de vida

N. caninum é caracterizado por apresentar ciclo de vida heteroxênico, ou seja, o parasito alterna seu ciclo biológico entre hospedeiros definitivos e intermediários, nos quais ocorrem as fases sexuada e assexuada, respectivamente (Figura 1). Assim como já descrito para *T. gondii*, *N. caninum* é capaz de invadir uma grande variedade de células hospedeiras. O ciclo vital sexuada ocorre apenas em espécies de canídeos (cão, coiote, dingó australiano), já o ciclo assexuada ocorre tanto em canídeos como em outros mamíferos como gatos, porcos, cavalos, carneiros, búfalos, coiotes, raposas, lobos, além de espécies de aves sendo que o parasito pode ser transmitido ao hospedeiro de forma horizontal e/ou vertical (THILSTED e DUBEY, 1989; GONDIM et al., 2004, MINEO, et al., 2009; MINEO et al., 2011; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

O ciclo supracitado é composto por três formas evolutivas: taquizoítos, bradizoítos no interior de cistos teciduais e esporozoítos no interior de oocistos. A fase sexuada inicia-se mediante o contato de canídeos com o parasito, por meio da ingestão de cistos teciduais que formam oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro e disseminados

no ambiente. Já a fase assexuada inicia com a ingestão de oocistos, pelos hospedeiros intermediários (McALLISTER et al., 1998; GOODSWEN et al., 2013). Os taquizoítos são responsáveis pela manifestação clínica da doença conhecida como fase aguda, tal estágio tem como característica parasitos intracelulares obrigatórios que invadem e infectam diferentes tipos de células como macrófagos, células neurais, fibroblastos, endotélio vascular, células musculares e hepatócitos (BARR et al., 1993; DUBEY et al., 2002) proliferando rapidamente. Como forma de adaptação frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, *N. caninum* consegue realizar conversão da forma taquizoíto para bradizoíto (SOUZA et al., 2010; EASTICK e ELSHEIKA, 2010; GOODSWEN et al., 2013).

Bradizoítos formam cistos teciduais e representam formas de latência do parasito que podem persistir por toda vida em um indivíduo sem causar qualquer sinal clínico, podendo ser mais comumente encontrados em tecidos neurais e musculares (DUBEY et al., 1990; GOODSWEN et al., 2013). Já os esporozoítos estão presentes no interior de oocistos podendo ser encontrados em águas e alimentos contaminados, tornando-se infectantes no ambiente por meio de esporulação. Quando ingeridos por hospedeiros intermediários são liberados no aparelho digestivo infectando células intestinais, fibroblastos e leucócitos liberando taquizoítos que disseminam por todo o organismo (INNES, 2007; MONNEY E HEMPHILL, 2014).

A transmissão vertical ocorre por infecção transplacentária de alta eficiência entre mãe e feto (SCHARES et al., 1998; HIETALA e THURMOND, 1999). Este tipo de transmissão podem ser divididos em duas diferentes vias designadas transmissão transplacentária exógena ou endógena. A transmissão exógena ocorre quando vacas prenhas adquirem a infecção após a ingestão de alimentos contaminados com oocistos infectando subsequentemente tecidos fetais. A transmissão endógena ocorre devido a

recrudescência pela reativação e reconversão de bradizoítos em taquizoítos durante a prenhes e subsequente infecção fetal (TREES e WILLIAMS, 2005).

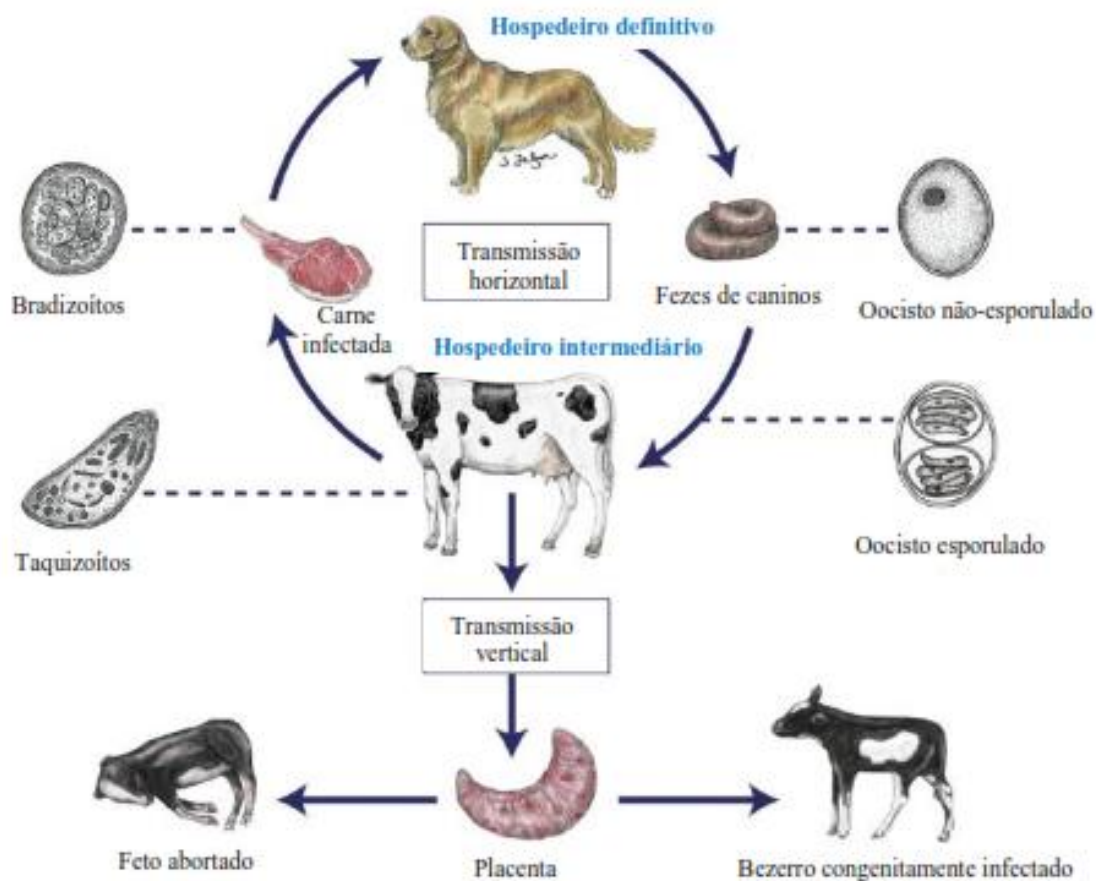


Figura 1: Ciclo Biológico de *N. caninum* (adaptado de Goodswen e colaboradores (2013))

1.4 Patogênese e Patologia

A patogênese da neoporose está associada com a invasão e proliferação intracelular de taquizoítos de *N. caninum*, causando inflamação tecidual (BUXTON, McALLISTER, DUBEY, 2002). Tais lesões são severas o suficiente para causar abortos em hospedeiros infectados. Além disso, há evidências de que a infecção pelo parasito desencadeie a liberação de citocinas pró-inflamatórias e uma resposta do tipo Th1 na

interface materno-fetal, que pode ser prejudicial para gestação (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2005). Ocorrem também danos à placenta materna, ocasionados por taquizoítos devido a interrupção do fornecimento de nutrientes (DUBEY et al., 1992). Esta invasão do parasito nas células hospedeiras conta com a participação de um complexo apical composto por organelas secretoras como roptrias, micronemas e grânulos densos (DUBEY et al., 2002).

N. caninum tem sido isolado de uma variedade de espécies de hospedeiros como cachorros, vacas, carneiros, cabras dentre outros (PÉRES-ZABALLOS et al., 2005; AL-QASSAB, REICHEL, ELLIS et al., 2010). A partir destes isolados foram identificados diferentes cepas apresentando virulência e patogenicidade variável durante a infecção pelo parasito (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al. 2006; REGIDOR-CERRILO et al., 2010).

Em cães domésticos, hospedeiros definitivos (GONDIM et al., 2004), a infecção por *N. caninum* pode causar poliradiculoneurite, encefalite, polimiosite e paralisias, sendo a paralisia dos membros posteriores o sinal mais consistente da neosporose neonatal (DUBEY e SCHARES, 2011).

Bovinos podem ser infectados através da ingestão oral de oocistos contendo esporozoítos, denominada transmissão horizontal, ou pela via transplacentária como um resultado da infecção por oocistos ou por recrudesência da infecção crônica em vacas prenhes (HALL, REICHEL, ELLIS 2005). Os efeitos prejudiciais da neosporose podem se manter presentes por meses ou anos em um rebanho. A infecção em vacas prenhes pode afetar feto e útero, causar abortos e nascimento de bezerros natimortos, além de bezerros recém-nascidos com sinais clínicos ou saudáveis, mas cronicamente infectados (DUBEY, BUXTON, WOUDA, 2006; DUBEY e SCHARES, 2011). A prevalência de *N. caninum* em bovinos está diretamente ligada a infecção em cachorros, devido ao fato desses

animais serem muitas vezes utilizados como ferramentas na criação de gado (DUBEY, 1999).

Apesar de *N. caninum* não causar doenças clínicas em animais imunocompetentes, esporozoítos liberados infectam tecidos intestinais, atravessam o epitélio, atingem os vasos sanguíneos e linfáticos e infectam outras células como macrófagos e linfócitos (HEMPHILL et al., 2013). Estudos *in vitro* utilizando cultura de células intestinais provenientes de cães demonstrou que taquizoítos e bradizoítos de *N. caninum* são capazes de infectar e proliferar nestas células (HEMPHILL et al., 2009). As células infectadas podem transportar estes patógenos intracelulares dos locais de infecção primária facilitando a propagação do parasito no hospedeiro (MINEO et al., 2010).

Uma das importâncias clínicas consequentes da infecção por *N. caninum* são os danos causados no sistema nervoso central (SNC) onde este parasito encontra-se encistado, sendo o cérebro o órgão mais comumente afetado (DUBEY et al., 2004; ELSHEIKHA et al., 2013)

1.5 Resposta imune

A infecção por *N. caninum* é controlada tanto pela resposta imune inata quanto pela adaptativa. Embora a resposta imune humoral participe diretamente na neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, auxiliando no controle da disseminação da infecção, há poucos relatos sobre a participação desse tipo de resposta, havendo maiores informações sobre a resposta imune celular contra *N. caninum* (HEGAB e AL-MUTAWA, 2003; GIGLEY, et al., 2009).

Para que uma infecção seja bem sucedida o parasito deve transpor barreiras físicas, como as espessas junções intercelulares da mucosa intestinal que podem

minimizar a invasão parasitária pela via oral e infectar células intestinais ativando a resposta imune do hospedeiro.

A resposta imune contra *N. caninum* é conhecida por ser predominantemente do tipo Th1, com produção de IFN- γ por células TCD4⁺ e TCD8⁺, adicionalmente é visto que células da imunidade inata como as células natural killer (NK) e NKT também exercem diferentes papéis na imunidade protetora. O rápido recrutamento de macrófagos e células dendríticas para o sítio da infecção melhora potencialmente a resposta imune contra *N. caninum* (DION et al., 2011; ABEA et al., 2014, MONNEY e HEMPHILL 2014). A produção de IFN- γ na resposta imune é dependente de IL-12 produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs), onde na ausência desta citocina pela inativação de macrófagos peritoneais, durante a infecção aguda por *N. caninum*, camundongos apresentam maior mortalidade (NISHIKAWA et al., 2001). A ação eficiente da resposta adaptativa via Th1 contra *N. caninum* está ligada a ativação de células presentes na resposta imune inata por meio de receptores TLR2 (*Toll like receptor* 2) dependente da molécula adaptadora MyD88 (MINEO et al., 2010), sendo MyD88 caracterizada como uma proteína importante na resistência contra a fase aguda da infecção (MINEO et al., 2009).

Na fase aguda da infecção ocorre então a produção de interleucina IL-12 secretada por células dendríticas e macrófagos, responsável pela diferenciação de células TCD4⁺ para a subpopulação Th1, importante em infecções intracelulares. Além disso, tal citocina estimula a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T, sendo assim um mecanismo de grande importância para a sobrevivência do hospedeiro (MINEO et al., 2009). Células TCD8⁺ também são ativadas pela secreção de IL-12 e contribuem significativamente para controlar a infecção aguda, uma vez que produzem IFN- γ , levando à ativação de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8+, liberando taquizoítos

que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos, como anticorpos, complemento, macrófagos ativados e células NK (ALIBERTI, 2005; MINEO et al., 2009; MUNOZ, LIESENFELD e HEIMESAAT, 2011; HEMPHILL et al. 2013).

Outras citocinas tais como TNF- α , IL-10 e TGF- β apresentam importância no controle da proliferação do parasito *in vitro* (JESUS et al. 2013). A atuação de citocinas do tipo Th-2 também são importantes durante a resposta imune contra *N. caninum*, apresentando efeitos inibitórios sobre a atividade de macrófagos bem como a produção de IFN- γ e IL-12 por células apresentadoras de antígenos (MURRAY e WYNN, 2011). O balanço na produção de citocinas do tipo Th1/Th2 exerce papel crucial na resposta imune celular contra a infecção parasitaria, levando à homeostasia. Alguns tipos celulares são importantes para sustentar este balanço Th1/Th2 como linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, células T $\gamma\delta$, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (NISHIKAWA et al., 2003).

Em bovinos tem sido mostrado que citocinas são importantes na modulação da resposta imune na interface materno-fetal (ROSBOTTOM et al., 2007; ALMERÍA et al., 2011; ROSBOTTOM et al., 2011), na qual a resposta do tipo Th1 associada com a infecção pode afetar a gestação e culminar no aborto ou reabsorção fetal, enquanto que a resposta do tipo Th2 pode promover proteção através da produção de IL-4 e IL-10 (QUINN et al., 2004; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014). A sobrevivência do feto está relacionada a sua competência imunológica, ao momento da infecção bem como a virulência da cepa infectante (DUBEY, BUXTON, WOUDE, 2006; WILLIAMS et al., 2009).

A resposta imune humoral também desempenha um papel importante frente à infecção por *N. caninum*. Diferentes citocinas estão ligadas às trocas de classes de anticorpos através da ativação de células B. Como consequência, as células B ativadas expressam IgM e IgD, levando à produção de outros tipos de anticorpos, como IgA, IgE,

IgG e suas subclasses. Trabalhos utilizando camundongos geneticamente deficientes em células B demonstrou a importância destas células durante a infecção por *N. caninum*, onde foi possível observar altas taxas de mortalidade pós-desafio nestes camundongos (AMMANN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Anticorpos específicos podem limitar a proliferação de taquizoítos extracelulares, por meio de neutralização, ativação do complemento e opsonização de parasitos.

Andrianorive e colaboradores (2001) revelaram a possibilidade da presença de três perfis de produção de anticorpos: o primeiro perfil com níveis de IgG2 predominante; o segundo com produção de anticorpos com níveis equivalentes entre IgG1 e IgG2 e o terceiro com predomínio de IgG1 (com níveis de IgM e IgG2 detectáveis). Apesar destes três perfis apresentados, estudos vem demonstrando que durante a infecção por *N. caninum* a produção de anticorpos específicos IgG2 é encontrado em maior índice que IgG1 (FERRE et al., 2005; MOORE et al., 2011).

Apesar do conhecimento sobre a participação de anticorpos no combate a vários patógenos, a participação destas imunoglobulinas deve ser melhor elucidada devido às lacunas funcionais ainda existentes no papel das mesmas durante infecções por *N. caninum*.

1.6 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

TNF foi descoberto em 1975 como uma molécula indutora de necrose de tumores (CARSWELL et al., 1975). Atualmente esta citocina pró-inflamatória é conhecida como a mais pleitrópica de todas as citocinas descritas em mamíferos (SEDDER e McDERMOTT, 2014). TNF- α ainda exerce uma variedade de atividades biológicas incluindo inflamação, proliferação, diferenciação, apoptose e imunomodulação,

promovendo a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (AGGARWAL, GUPTA, BASU, 2012; AGGARWAL e LIMDI 2015) bem como resposta patológicas (choque séptico, caquexia) (DEROUICH-GUERGOUR et al., 2001).

A forma solúvel dessa proteína apresenta 17 kDa sendo encontrada no plasma sanguíneo, que circula através de todo o corpo e confere potentes funções endócrinas – apresentando capacidade de atuar em sítios fisiológicos distantes dos sítios em que foi sintetizado (BARBOSA et al., 2011; FAUSTMAN e DAVIS 2013). Dois distintos tipos de receptores de superfície, receptor de TNF1 (p55) e receptor de TNF2 (p75), agem individualmente ou em sinergismo para mediar a atividade biológica da TNF- α . TNFR1 é expresso constitutivamente na maioria dos tipos celulares, exceto em eritrócitos. Este receptor pode ativar a via apoptótica, via fator nuclear kappa B (NF- κ B) iniciando a maioria das atividades biológicas de TNF (LU, CHEN e WALSH 2014), já TNFR2 é expresso somente em células endoteliais e hematopoiéticas e não está envolvido diretamente na ação apoptótica, porém a estimulação desse receptor induz TNF- α endógeno que subsequente ativa TNFR1 (FINGIEL, et al., 2008; ESPOSITO 2011).

Grell e colaboradores (1998) evidenciaram em seus trabalhos que TNFR1 e não TNFR2 exibiram uma alta afinidade para TNF- α solúvel, demonstrando assim a ação importante de TNFR1 na resposta celular induzida por TNF- α solúvel. Estudos utilizando camundongos deficientes em receptores de TNF- α estabeleceu que TNFR1 é mais importante que TNFR2 para a resistência contra diversos patógenos intracelulares como *T. gondii* e *Leishmania major* (PFEFFER et al., 1993; RUBY, BLUETHMANN, PESCHON, 1997).

TNF- α é expressa por monócitos/macrófagos ativados, células T e NK, além de diversas células não imunes como células endoteliais e fibroblastos (BRIETZKE e KAPCZINSKI 2008). Como demonstrado por Mineo e colaboradores (2010), a produção

de TNF- α está relacionada com a ativação de TLR2/MyD88, onde o uso de animais deficientes para MyD88 e para TLR2 após a infecção resultou em uma baixa produção desta citocina bem como de outras citocinas pró-inflamatórias importantes na resistência do hospedeiro contra a infecção por *N. caninum*. Tal citocina é principalmente encontrada durante a fase aguda de infecções, onde inicia uma cascata de produção de outras citocinas e aumenta a permeabilidade vascular (BARBOSA et al., 2011; CALSAVARA et al., 2014). Tal fato leva a indução da resposta imunológica e inflamatória através do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, permitindo com que TNF- α desempenhe funções importante na resposta inflamatória local (VITALE e RIBEIRO, 2007).

Em infecções causadas por protozoários como *Toxoplasma*, *Leishmania* e *Trypanosoma*, TNF- α tem sido demonstrado como sendo importante para o controle do parasitismo (DEROUICH-GUERGOUR et al., 2001), atuando em sinergismo com IFN- γ na indução de óxido nítrico (NO), complementando a atividade da resposta imune inata contra parasitos intracelulares (BOGDAN et al., 1990; SIBLEY et al., 1991; DIEFENBACH et al., 1998; MANNA et al., 2014). Plitz e colaboradores (1990) evidenciaram em seus estudos que, a ausência de TNF- α ou do receptor de TNF em camundongos desencadeia uma maior susceptibilidade destes animais durante infecções intracelulares. Além disso, foi constatado que animais deficientes no receptor de TNF apresentam maiores danos teciduais e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos de inflamação (GONÇALVES et al., 2001). Adicionalmente, durante a infecção por *N. caninum*, tem sido descrito que TNF- α inibe o crescimento de taquizoítos (YAMANE et al., 2000), bem como o tratamento com a citocina reduz o número de parasitos em células da glia experimentalmente infectadas com *N. caninum* (JESUS et al., 2013).



2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *N. caninum* tem causado grandes perdas econômicas na indústria agropecuária, tanto na exploração leiteira quanto na produção de carne (LARSON et al., 2004; DUBEY e SCHARES, 2011). Mundialmente estima-se uma perda econômica que pode chegar a 2,380 bilhões de dólares por ano decorrente de abortos induzidos pela infecção pelo parasito, no Brasil estima-se uma perda anual de 51,3 milhões de dólares (REICHEL et al., 2013; REICHEL et al., 2014).

A importância econômica da neosporose tem levado a pesquisas no desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento da infecção por *N. caninum*. A recente identificação e caracterização do protozoário ainda não permitiu com que diversos aspectos da resposta imunológica fossem descritos. A vacinação tem sido considerada a melhor estratégia de controle da doença (MANSILLA et al., 2012; UCHIDA et al., 2013; REICHEL et al., 2014), porém a única vacina comercializada (Bovilis Neoguard) foi retirada do mercado devido a sua baixa eficácia de proteção (ROMERO, PEREZ, FRANKENA, 2004, WESTON, HEUER, WILLIAMSON 2011). Assim, elucidar características imunológicas tornam-se importantes para o entendimento e controle da infecção pelo parasito. Modelos murinos são amplamente utilizados para estudar a resposta imune do hospedeiro a *N. caninum*. O uso de camundongos geneticamente deficientes tem sido uma ferramenta crucial no entendimento de diferentes patologias.

Apesar de inúmeros estudos correlacionando a infecção por *N. caninum* com a produção de diferentes citocinas anti e pró-inflamatórias, a participação das mesmas durante a infecção ainda não está bem caracterizada. Estudos avaliando as respostas imunes celulares e humorais são importantes para melhor compreender a dinâmica

parasito-hospedeiro durante a infecção por *N. caninum* e desse modo podem contribuir para o desenvolvimento profilático e terapêutico da neosporose.



3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o papel da citocina TNF- α no desencadeamento de resposta imune celular e humoral protetora contra a infecção pelo protozoário *N. caninum* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a sobrevivência de camundongos selvagens e geneticamente deficientes para o receptor 1 de TNF (TNFR1^{-/-}) durante a infecção com taquizoítos de *N. caninum*;
- Avaliar a produção *in vivo* de citocinas e óxido nítrico durante a infecção por *N. caninum*;
- Determinar a carga parasitária e inflamação tecidual nas fases aguda e crônica em camundongos selvagens e geneticamente deficientes previamente infectados por *N. caninum*;
- Quantificar e qualificar a produção de anticorpos séricos antígeno-específicos das classes IgG e IgM em camundongos selvagens e geneticamente deficientes infectados com taquizoítos de *N. caninum*.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e geneticamente deficientes no receptor 1 de TNF (TNFR1^{-/-}) e interferon gama (IFN- γ ^{-/-}), entre 6 e 8 semanas de idade, foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia, UFU (Uberlândia, Brasil), em um ambiente com condições de umidades e temperatura controlada (22 a 25°C), com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU#052/12).

4.2 Cultivo de células HeLa e *N. caninum*

Células de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25cm² contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Life Technologies Corporatin, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com glutamina (2mM), antibiótico/antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), em estufa a 37°C com 5% CO₂, até atingirem confluência.

Posteriormente as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-1) (DUBEY et al., 1988) e mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas para células, exceto pela adição de SFB. Após lise completa de células, a suspensão de parasitos foi coletada e centrifugada a 45 × g por 1 minuto a 4°C para remoção de restos celulares como previamente descrita (SILVA et al., 2007). O sobrenadante foi coletado e

em seguida centrifugado a $700 \times g$ por 10 minutos a 4°C , o sedimento foi ressuspenso em 1mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS, pH 7,2). Taquizoítos foram contados em câmara hemocitométrica com o auxílio do corante Azul de Tripán 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) sendo utilizados logo em seguida para infecção de camundongos. O restante dos parasitos foram lavados por duas vezes ($700 \times g$ por 10 minutos a 4°C) com PBS, o sedimento final foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos.

4.3 Desenho experimental

Para observação da taxa de mortalidade um número de 10 camundongos por grupo WT e $\text{TNFR1}^{-/-}$ foram infectados pela via intraperitoneal com 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum* cepa Nc-1. Os animais foram monitorados por 30 dias a partir da data de início da infecção. Para análise da fase aguda e crônica da infecção bem como ensaios sorológicos, camundongos WT e $\text{TNFR1}^{-/-}$ ($n=5/\text{grupo}$) foram infectados pela via intraperitoneal com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. A fase aguda da infecção foi analisada por meio da quantificação de citocinas em soros, lavado peritoneal e homogenato de pulmão e fígado (0 e 7 dias após infecção), por meio do ensaio de ELISA e CBA, análise de parasitismo em células de peritônio bem como em tecidos hepáticos e pulmonares (0 e 7 dias após infecção) através do ensaio quantitativo real-time, mensuração de óxido nítrico em lavado peritoneal (0 e 7 dias após infecção) e inflamação tecidual em pulmão (0 e 7 dias após infecção) pela coloração por hematoxilina e eosina. Na fase crônica da infecção foi analisado o parasitismo em tecidos cerebrais de camundongos 30 dias após a infecção por meio de qPCR, bem como análise de inflamação tecidual por coloração com hematoxilina e eosina.

Para a análise da resposta imune humoral por meio de ELISA indireto e *Immunoblotting*, soros de camundongos infectados com 1×10^6 foram coletados 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção, adicionalmente grupos de camundongos WT, TNFR1^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foram imunizados com antígeno total de *N. caninum* por via subcutânea como descrito abaixo para análise de produção de anticorpos por ELISA 0, 15, 30 e 45 dias no decorrer das imunizações. Tal ensaio se faz necessário pela alta susceptibilidade de camundongos IFN- γ ^{-/-} a infecção experimental por *N. caninum* (MINEO et al., 2009).

4.4 Preparação de antígenos de *N. caninum*

*4.4.1 Antígeno solúvel de *N. caninum**

Antígenos solúveis de lisado de *N. caninum* (NLA) foram preparados de acordo com os métodos já descritos por Silva et al. (2007). Suspensões parasitárias foram diluídas em PBS e tratadas com coquetel de inibidores de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça) e submetidas a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido de sonicação durante cinco minutos a 60Hz em banho de gelo. Posteriormente parasitos lisados foram submetidos à centrifugação ($10.000 \times g$, 30 min, 4°C) onde o sobrenadante resultante foi coletado e a concentração proteica quantificada utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (BRADFORD, 1976). Alíquotas de NLA foram armazenados a -20°C até sua utilização nos procedimentos de *Immunoblotting* e ELISA.

4.4.2 Antígeno total de *N. caninum*

Para preparação de antígeno total de *N. caninum* utilizado para imunizações de camundongos WT, TNFR1^{-/-} e IFN^{-/-}, taquizoítos do parasito foram ajustados para 5×10^6 em 200µL (por animal) utilizando PBS juntamente com inibidores de protease (Complete Mini Roche). Posteriormente a solução foi submetida a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. A concentração proteica da solução resultante foi quantificada utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (BRADFORD, 1976). O antígeno foi utilizado imediatamente para imunização dos camundongos.

4.5 Homogenato de órgãos

Para análise da produção de citocinas órgãos de animais WT e TNFR1^{-/-} previamente infectados foram posteriormente coletados e processados. A quantidade de órgãos foi ajustada para 100 mg de tecido (pulmão e fígado) e adicionado aos mesmos 500 µL de solução contendo inibidor de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça). As amostras foram trituradas com o auxílio de um homogeneizador sendo em seguida centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até o momento do uso.

4.6 Determinação da Produção de Citocinas *in vivo*

Produção de citocinas IL-12 e IFN-γ foram mensuradas em lavado de lavado peritoneal e em homogenatos de pulmão e fígado (100mg de tecido) de camundongos previamente infectados, utilizando kits de ELISA comerciais de acordo com protocolos

recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA). Em suma, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específico para cada citocina e incubadas overnight à 4°C. Posteriormente houve o bloqueio de sítios inespecíficos utilizando 10% de SFB em PBS 0.01M (pH7,2) por 1 hora seguido pela adição das amostras a serem testadas à placa. Concomitantemente, curvas padrões das respectivas citocinas testadas foram acrescidas em diluições seriadas. Após 2 horas de incubação anticorpos de detecção biotinilados acrescidos de estreptavidina-peroxidase específicos para cada citocina foram incubados por 1 hora. Entre cada etapa da reação as placas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A reação foi desenvolvida utilizando o substrato enzimático tetrametilbenzidina (TMB) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para interromper a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA) a 450nm sendo a concentração de cada citocina determinada a partir da curva padrão e expressas em pg/ml.

IFN- γ foi mensurado em soros de camundongos previamente infectados por meio do ensaio multiplex *Flex Set Cytometric Bead Array* - CBA (BD Biosciences, San Diego, EUA), de acordo com informações do fabricante. O ensaio foi realizado em tubo FACS (BD Biosciences, San Diego, EUA), onde foi acrescentado 25 μ L de beads de captura; 25 μ L curva padrão ou amostras e 25 μ L anticorpo de detecção. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente foi adicionado 500 μ L do tampão de lavagem e centrifugado (200 $\times g$ / 5 minutos). Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 300 μ L do tampão, a leitura do experimento foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences, EUA). Os dados foram processados e analisados utilizando *software* apropriado (FlowJo, TreeStar Inc., Asland, Oregon, EUA). Concentrações de IL-12

também foram mensurados em amostras de soros pelo método de ELISA, como anteriormente descrito.

4.7 Determinação da produção de óxido nítrico

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

4.8 PCR em tempo real

DNA genômica de *N. caninum* tecidual e do lavado peritoneal foi determinado por PCR em tempo real (qPCR), através do sistema de detecção SYBR green (Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA), como previamente descrito (RIBEIRO, et al. 2009; CARDOSO et al., 2011). Foram utilizados os seguintes pares de primers: Forward: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; Reverse: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3' (Exxtend Biotecnologia, Campinas, Brasil), para detecção da região Nc5 de *N. caninum*. A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido cerebral, pulmonar e hepático e de uma quantidade de 1×10^6 células resultantes do

lavado peritoneal através do método de extração por Trizol (Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA). Inicialmente adicionou-se 500µL de Trizol as amostras e homogeneizou as mesmas utilizando vortex por 10 minutos, posteriormente foi acrescentado 200µL de clorofórmio às mesmas para separação de fases contendo RNA e DNA. As amostras foram novamente homogeneizadas por vortexação e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente seguido por centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi descartada e o DNA contido na fase fenólica foi precipitado com 300µL de etanol a 95%. As amostras foram homogenizadas por inversão dos tubos por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a $2.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante resultante foi descartado cuidadosamente e o pellet lavado duas vezes com 0,1M de citrato de sódio acrescido de 10% de etanol por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 750 µL de etanol 75% e rapidamente as amostras foram centrifugadas novamente a $7.500 \times g$ por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet usado para a detecção de DNA de *N. caninum*. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington DE, EUA) e ajustada para 40 ng/µL com água estéril e livre de DNase (água DEPC).

A quantificação da carga parasitária foi realizada utilizando o equipamento de PCR em tempo real (7500 Real time PCR System, Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) e a carga parasitária foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-1) que foi incluída em cada análise. Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito / µg de DNA total.

4.9 Análise histopatológica para determinação da inflamação tecidual *in vivo*

Amostras do sistema nervoso central e pulmão de camundongos WT e TNFR1^{-/-} previamente infectados foram coletados e fixados em formol 10% tamponado com fosfato por 24 horas, seguido da adição em álcool 70% até serem submetidos ao processo de inclusão em parafina. Após inclusão os órgãos foram cortados (5µm de espessura) e depositados em lâminas microscópicas e posteriormente corados com hematoxilina e eosina para avaliação do infiltrado inflamatório (MINEO, et al 2009). Os cortes foram fotografados utilizando o microscópio invertido automatizado (FSX100, Olympus, Japão).

4.10 Imunização de camundongos

Camundongos C57BL/6, TNFR1^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foram imunizados com antígeno total de *N. caninum* para análise do envolvimento de TNF- α e IFN- γ ^{-/-} na indução da produção de anticorpos. Este procedimento foi feito devido a susceptibilidade de camundongos IFN- γ ^{-/-} a sucumbir à infecção pelo parasito em estudo. A imunização foi realizado utilizando aproximadamente 60µg de antígeno total de *N. caninum* por animal – equivalente a 5×10^6 taquizoítos do parasito por animal. Os animais foram imunizados por via subcutânea com três doses do antígeno em um volume de 200µL por animal, em intervalos de 15 dias. Camundongos foram submetidos à sangria prévia (dia 0) e amostras de sangue foram coletadas aos 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização. Os sangues foram centrifugados a 400×g por 10 minutos sendo o soro coletado e armazenado a -20°C até sua utilização. Baço dos animais WT e TNFR1^{-/-} foram coletados para posterior fenotipagem.

4.11 Resposta imune humoral

4.11.1 Fenotipagem *ex vivo* de IgG e suas subclasses

Para análise de IgG1 e IgG2a expressa em células do baço CD19+ *ex vivo*, camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram imunizados como previamente descrito. 45 dias após a primeira imunizações os animais foram eutanasiados e os baços coletados e posteriormente macerados. Suspensões celulares resultantes foram lavadas e centrifugadas a $400 \times g$ por 10 minutos a 4°C em meio RPMI. O sedimento de células obtidas foi ressuspensionado em tampão de lise de hemácias (0.16 M NH₄Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) e, após cinco minutos de incubação foram lavados por duas vezes em meio RPMI. Após centrifugação o pellet contendo células foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado (meio RPMI incompleto; 200 µM L-glutamina; 10% de soro fetal bovino; 5.10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol) e distribuídos em placas de cultura de 24 poços ($2,5 \times 10^6$ células/ poço) seguido por estimulação com concanavalina-a (Con-A) (2,5 µg/mL) associada a lipopolissacarídeo (LPS) (1 µg/mL) e NLA (25 µg/mL) por 72 horas, sendo posteriormente tratadas com Brefeldina A (1,5 µL/mL). As células foram retiradas das placas, adicionadas em tubos FACS (BD Biosciences, San Diego, EUA) e marcadas como descrito abaixo.

Ensaio de citômetro de fluxo foi realizado para detecção intracelular de imunoglobulinas. Para isto, anticorpos IgG1 anti-camundongo (PE), IgG2a anti-camundongo (PerCP-A), e kits de permeabilização e marcação foram utilizados de acordo com recomendações do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes-NJ, EUA). A determinação de populações celulares (gating), CD-19+ (APC-Cy7) e CD3+ (Pacific Blue) foi realizada com anticorpos monoclonais comerciais (BD). Os experimentos foram

realizados em citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, Franklin Lakes-NJ, EUA) e analisado utilizando o *software* FlowJo X (Tree Star Inc., Asland, Oregon, EUA).

4.11.2 Determinação de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses específicos para *N. caninum* em amostras de soros de camundongos

A cinética de produção de anticorpos IgM, IgG além das subclasses IgG1 e IgG2a específicos para *N. caninum*, foram mensurados por ELISA indireto em soros de camundongos selvagens e geneticamente deficientes previamente infectados e imunizados, conforme descrição prévia (SILVA et al., 2007). Microplacas de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com antígenos de *N. caninum* na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6), e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) acrescido de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-T-M5%) para IgM e IgG total e PBS-T adicionado de 1% de albumina sérica bovina (BSA- Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (PBS-T-BSA1%) para IgG1 e IgG2a, durante 1 hora à temperatura ambiente. Amostras de soros foram diluídas a 1:25 em PBS-T-M5% e incubadas por 1 hora para detecção de IgM e IgG total e 1:25 em PBS-T-BSA1% por 2h para IgG1 e IgG2a, todas as placas foram incubadas a 37°C. Conjugados específicos para cada classe de imunoglobulina- anti-IgM (1:500) e anti-IgG (1:1000) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) diluídas em PBS-TM a 1%, anti-IgG1 (1:4000) e anti-IgG2a (1:2000) de camundongo marcado com biotina (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) diluídas em PBS-T+BSA1% foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. Para a detecção de IgG1 e IgG2a, placas

foram incubadas com streptavidina/peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Entre cada etapa da reação as placas foram lavadas com PBS-T por cinco vezes. A reação foi desenvolvida com 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônica) (ABTS, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, Washington, DC, EUA) e a densidade óptica (DO) determinada a 405 nm em leitor de placas (*SpectraMax* M2e, Molecular Devices, EUA)

4.11.3 Immunoblotting para análise do perfil de reconhecimento antigênico para NLA – IgG e suas subclasses

O perfil cinético de reconhecimento antigênico de IgG e suas subclasses foi analisado pelo método de *immunoblotting* (SILVA, et al. 2007), em soros de camundongos infectados e imunizados com *N. caninum*. 150µg de NLA foi diluído em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M pH6,8, dodecilsulfato de sódio-SDS 4%, azul de bromofenol a 0,2%) e incubados por 5 minutos a 95°C. Posteriormente a amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) sob condições não redutoras (LAEMMLI, 1970). Um volume de 200 µL da solução feita a partir da diluição de NLA foi aplicado no gel em paralelo ao padrão de peso molecular (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA).

Após separação eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,45µm, Millipore, Bedford, EUA) utilizando sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia). Após 2 horas de transferência, as membranas foram retiradas do aparelho, coradas rapidamente com solução Ponceau a 0,5%, cortadas em tiras e colocadas em canaletas apropriadas para

reação. Reatividades inespecíficas presentes nas tiras de membranas foram bloqueadas com PBS-T-M5% por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação e subsequentemente incubadas com amostras de soros de camundongos na diluição de 1:100 em PBS-T-M1% (18 h a 4°C). Conjugados específicos para cada classe de imunoglobulina: anti-IgG (1:1000) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), anti-IgG1 (1:4000) e anti-IgG2a (1:2000) de camundongo marcado com biotina (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) foram adicionados e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Para a detecção de IgG1 e IgG2a, placas foram incubadas com streptavidina/peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente.

A reação foi desenvolvida por adição do substrato enzimático 3,3'-tetrahidroclorato de diaminobenzidina (Stable DAB,- Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) sendo interrompida com água destilada após visualização de bandas de coloração marrom. Entre cada etapa as membranas foram lavadas por seis vezes com PBS-T para retirada de excedentes.

4.12 Análise estatística

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

4.13 Normas de Biossegurança

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

5. Resultados



5. RESULTADOS

5.1 Camundongos TNFR1^{-/-} apresentam maior susceptibilidade a infecção por *N. caninum*

Para avaliar a importância do receptor I de TNF- α na resistência do hospedeiro frente a infecção por *N. caninum*, camundongos WT e TNFR1^{-/-} (n=10/grupo) foram infectados com 1×10^7 taquizoítos (dose letal para 50% dos animais, DL50) de *N. caninum* e monitorados por 30 dias para análise da mortalidade dos mesmos (Figura 2). Observou-se que animais pertencentes aos dois grupos em estudo apresentaram sinais clínicos iniciando no sétimo dia de infecção, porém camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram uma menor resistência a infecção apresentando 100% de mortalidade até o 19º dia de infecção enquanto 50% de animais WT sobreviveram.

Com o objetivo de analisar as causas envolvidas na maior susceptibilidade de animais TNFR1^{-/-} à infecção por *N. caninum* foi determinado a carga parasitária em grupos de animais WT e TNFR1^{-/-} infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. Células de lavado peritoneal, tecido hepático e pulmonar foram coletados para análise da fase aguda da infecção, enquanto tecidos cerebrais foram utilizados para a determinação de parasitismo na fase crônica. O DNA genômico de *N. caninum* foi quantificado através da técnica de qPCR. Durante a fase aguda (7 dias pós-infecção) células do lavado peritoneal (Figura 3A) e tecidos pulmonares apresentaram um aumento de cópias de DNA de *N. caninum* (Figura 3B). Já em tecidos hepáticos (Figura 3C) esse aumento não foi observado. Adicionalmente, em um modelo de estudo da fase crônica 30 dias pós infecção, a carga parasitária no cérebro de camundongos TNFR1^{-/-} também encontrou-se aumentada em relação a seus controles parentais (Figura 3D). As diferenças de carga

parasitária em distintos sítios de infecções foram analisadas pelo teste não paramétrico Mann Whitney onde as amostras não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Inflamações teciduais também foram analisadas a partir de coloração com hematoxilina e eosina em camundongos WT e TNFR1^{-/-} previamente infectados com *N. caninum*, com o objetivo de analisar alterações histológicas nos dois grupos estudados. De acordo com os resultados obtidos, foi observado que camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram maior infiltrado inflamatório em tecidos pulmonares sete dias pós infecção, bem como no sistema nervoso central, quando comparados com camundongos WT (Figura 4).

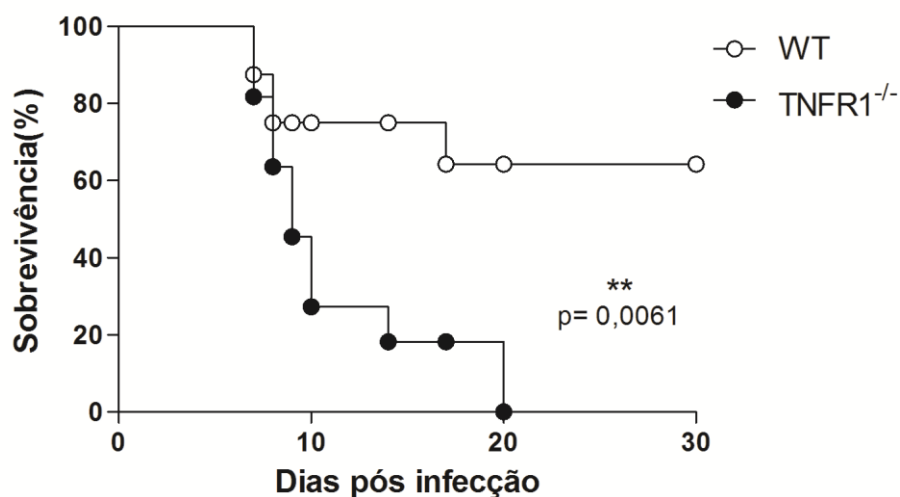


Figura 2. TNF é importante no controle da mortalidade durante a infecção por *N. caninum*. Curva de sobrevida de grupos de camundongos WT e TNFR1^{-/-} (n=10 camundongos/grupo) infectados com 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum*. Os animais foram monitorados durante 30 dias pós infecção para determinação da curva de sobrevida. Diferenças entre grupos foi comparada usando análise de sobrevivência por Kaplan-Meier, através do teste de log-rank.

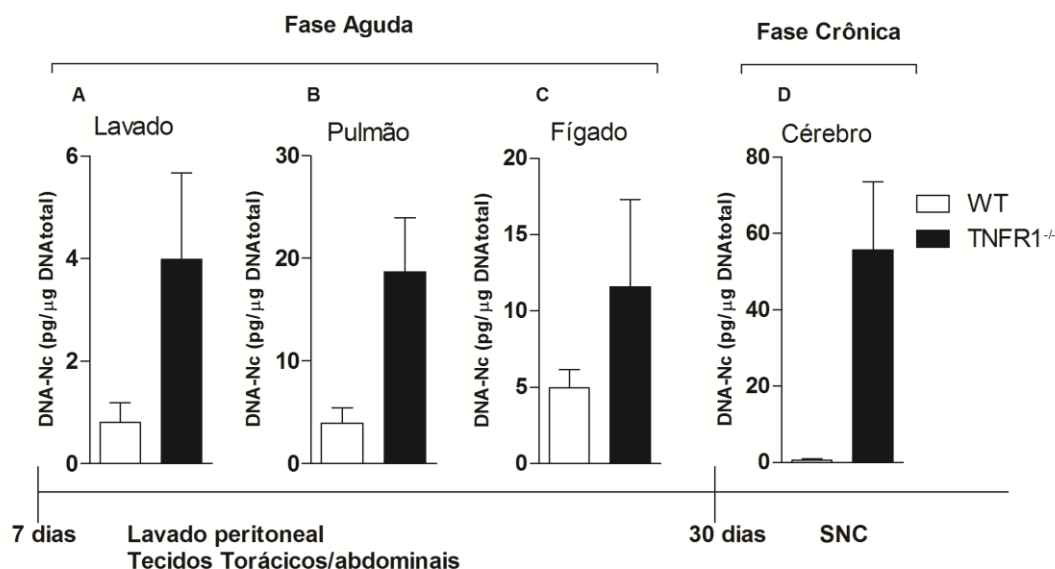


Figura 3. Quantificação em sítios específicos da carga parasitária em animais WT e TNFR1^{-/-}. TNF é requerido no controle da carga parasitária na fase aguda e crônica da infecção por *N. caninum*. Camundongos WT e TNFR1^{-/-} foram infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1) e sacrificados sete dias para coleta de lavado peritoneal, pulmão e fígado e 30 dias para tecido cerebral. Os dados foram obtidos a partir da reação de qPCR pela amplificação do gene Nc5. Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados através do teste de Mann Whitney não apresentando diferenças significativas.

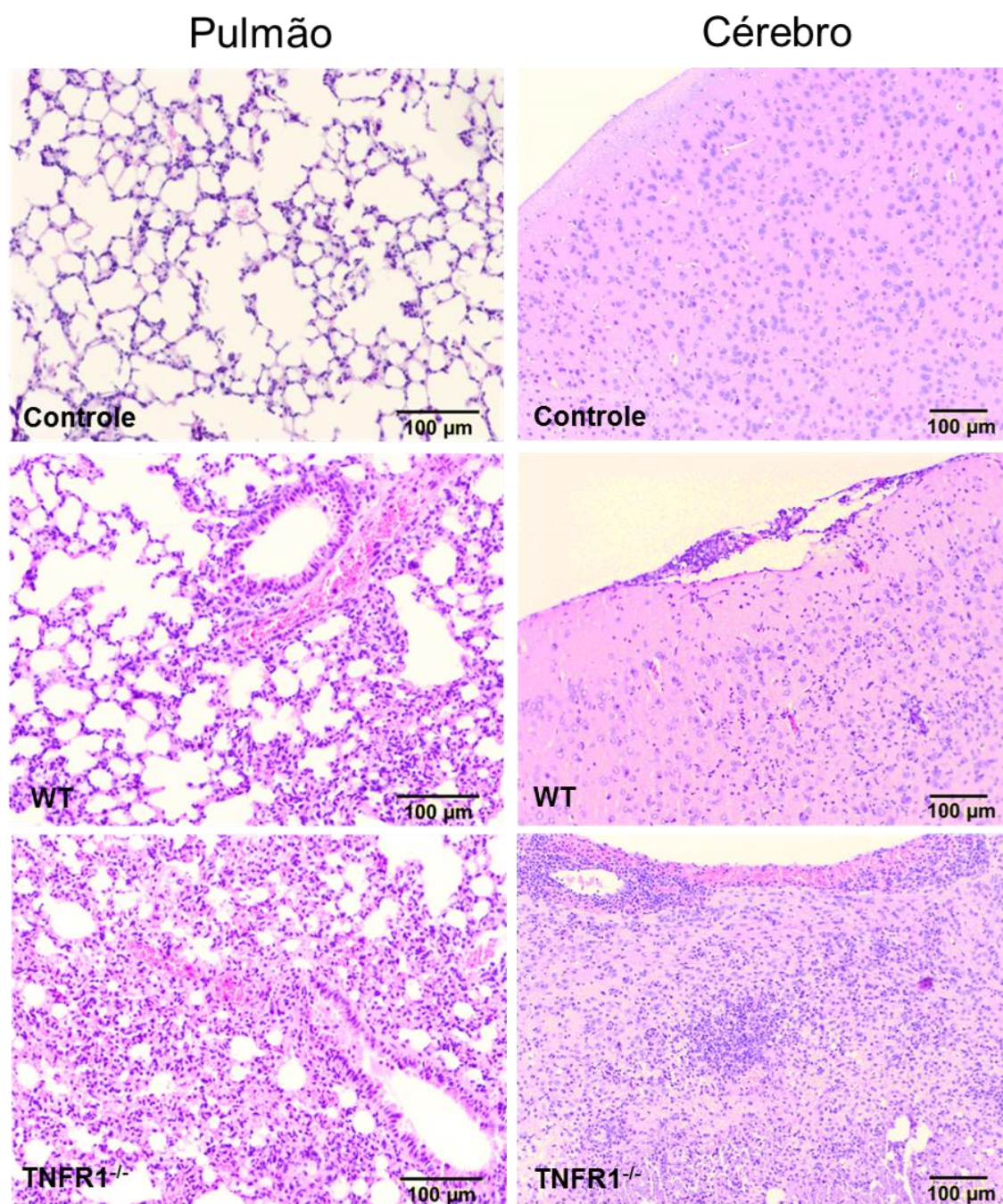


Figura 4. Sinalização de TNF- α via TNFR1 controla os níveis de inflamação teciduais em animais infectados com *N. caninum*. Representação de infiltrados inflamatórios em tecido pulmonar 7 dias pós infecção e tecido cerebral 30 dias pós infecção em animais infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. As imagens foram obtidas a partir da coloração com hematoxilina-eosina de lâminas com cortes histológicos.

5.2 Animais TNFR1^{-/-} apresentam um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por *N. caninum*

Para análise do efeito induzido pela ausência da sinalização de TNF- α na produção de mediadores imunes de padrão Th1, foi determinado a produção de IL-12p40 e IFN- γ em camundongos infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Figura 5). Foi encontrado um aumento significativo tanto nos níveis de IL-12p40 quanto em IFN- γ em fluidos de lavado peritoneal, soros e sobrenadantes de homogenato de pulmão de camundongos TNFR1^{-/-} sete dias pós infecção, quando comparado com camundongos WT. Em homogenato de fígado de animais WT e TNFR1^{-/-} não foram observados diferenças na produção de IL-12p40 e IFN- γ .

Foi analisado também a produção de NO, com o objetivo de relacionar a ação de TNF- α na indução da produção do mesmo. Em amostras de lavado peritoneal, foram observados níveis reduzidos de NO em camundongos TNFR1^{-/-}, se comparado com camundongos WT (Figura 6), demonstrando assim que a ação de TNF está envolvido na produção desta molécula.

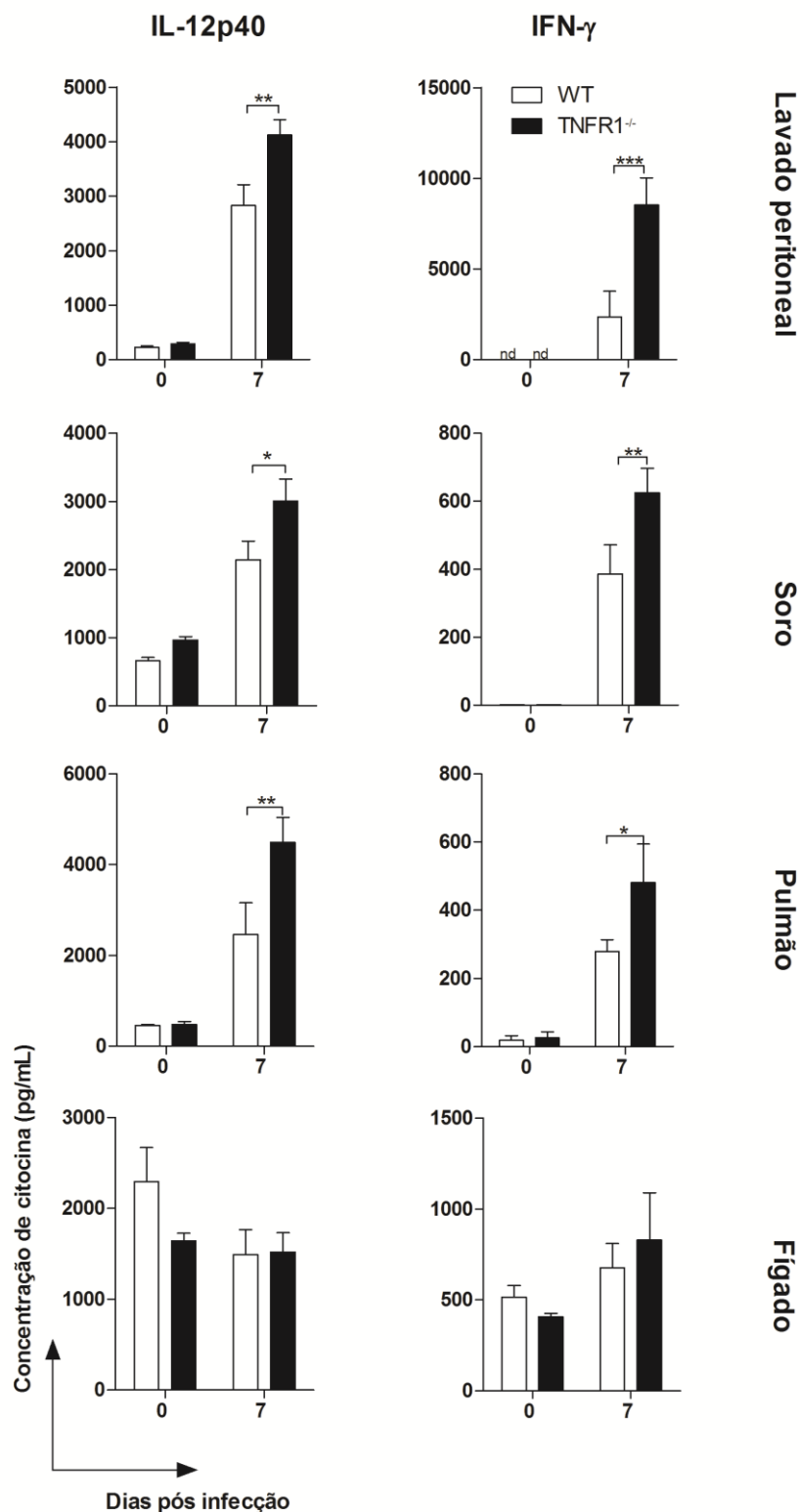


Figura 5. TNFR1^{-/-} apresenta um aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias durante a infecção por *N. caninum*. Grupos de animais WT e TNFR1^{-/-} foram infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1) e analisados. A produção de IFN-γ e IL-12p40 foi mensurada 7 dias pós infecção em lavado peritoneal, soro e homogenato de pulmão e fígado. Os dados foram obtidos a partir da reação de ELISA e CBA. Os valores são expressos como média e \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni).

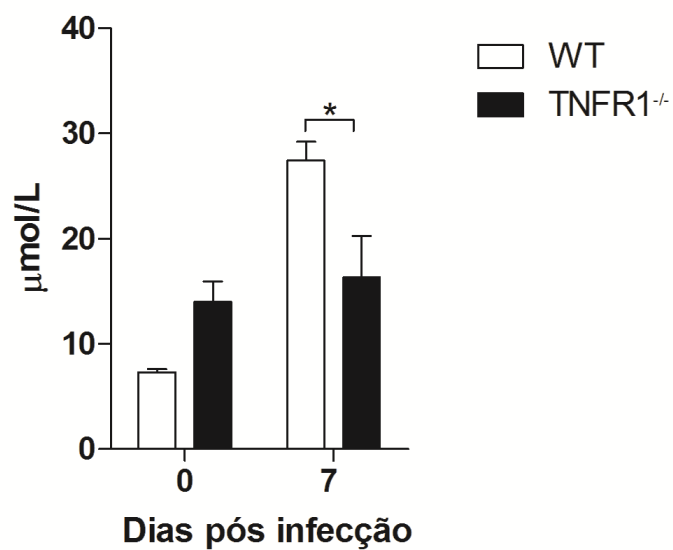


Figura 6. TNFR1^{-/-} apresenta uma menor produção de NO durante a infecção por *N. caninum*. Animais WT e TNFR1^{-/-} foram infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1) e analisados. A produção de NO foi mensurada 7 dias pós infecção em lavado peritoneal. Os valores são expressos como média e \pm SEM, * $P < 0.05$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni).

5.3 Camundongos TNFR1^{-/-} apresentam regulação diferencial na produção de subclasses de IgG

Para análise da resposta imune humoral induzida pela infecção por *N. caninum*, foi mensurado em soros de camundongos WT e TNFR1^{-/-} a produção de anticorpos antígenos específicos contra antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA). Neste sentido, foi analisado a produção cinética de IgM, IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) (Figura 7). De forma geral, camundongos pertencentes aos dois grupos analisados não apresentaram diferença significativa na produção de anticorpos IgM e IgG ao longo do período de 30 dias pós infecção (Figura 7A e 7B). Contudo, foi observado um decréscimo na produção subclasse de anticorpo IgG1 antígeno específica (Figura 7C) acompanhado de um aumento nas concentrações de IgG2a (Figura 7D) em camundongos TNFR1^{-/-}, quando comparado com animais WT.

Anticorpos presentes em soros de animais TNFR1^{-/-} também foram encontrados por reconhecer alguns antígenos solúveis do parasito (Figura 8), apresentando diferenças na quantidade de proteínas reconhecidas entre WT e TNFR1^{-/-}. Em concordância com os resultados de ELISA, camundongos TNFR1^{-/-} reconheceram uma única banda antigênica para IgG1 (Figura 8B), enquanto que anticorpos IgG2a reconheceram um maior número de antígenos específicos (Figura 8C).

Para confirmação dos resultados acima apresentados, foi mensurada a expressão intracelular de IgG1 e IgG2a em células B a partir de baço de camundongos WT e TNFR1^{-/-}. Camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram um menor produção de imunoglobulina IgG1 mediante a infecção por *N. caninum*, (Figura 9), enquanto a produção de IgG2a foi aumentada nestes animais (Figura 10).

Adicionalmente, analisamos se o envolvimento da citocina TNF- α na modulação da produção de anticorpos das subclasses IgG durante a infecção por *N. caninum* é compatível com outra citocina de padrão Th1, sabidamente essencial para a resistência frente a infecção. Para tal finalidade, camundongos WT, TNFRI^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foram imunizados com antígenos totais de *N. caninum*. Amostras de soros destes animais foram coletadas e a cinética de produção de anticorpos específicos IgM, IgG e suas subclasses foram mensuradas (Figura 11). Foi observado que IFN- γ é crítico para a produção de IgG total e suas subclasses, por apresentar uma baixa detecção de tais anticorpos no ensaio de ELISA indireto. Tal fato se mostra distinto do observado em camundongos TNFR1^{-/-}, que exibiram uma diferença na produção das diferentes subclasses de IgG em relação aos controles selvagens.

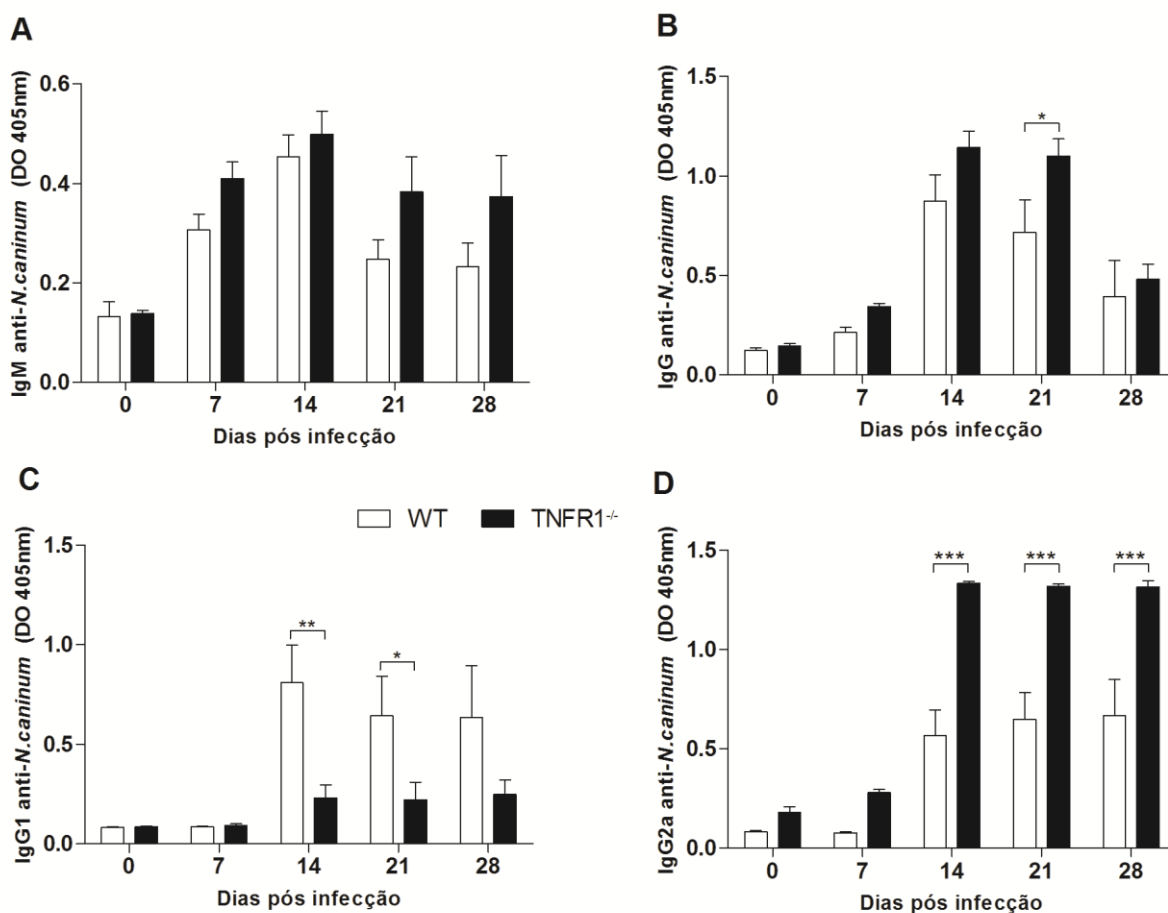


Figura 7. Cinética da produção de anticorpos antígeno específico em animais infectados. Pela técnica de ELISA indireto foi analisado a soro reatividade para anticorpos IgM (A), IgG total (B), IgG1 (C) e IgG2a (D) em animais WT e TNFR1^{-/-} infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1). A produção de anticorpos foi mensurada até 28 dias pós infecção em soros de ambos os grupos. Valores são indicados como densidade optica (DO) a 405nm sendo expressos como média e \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni).

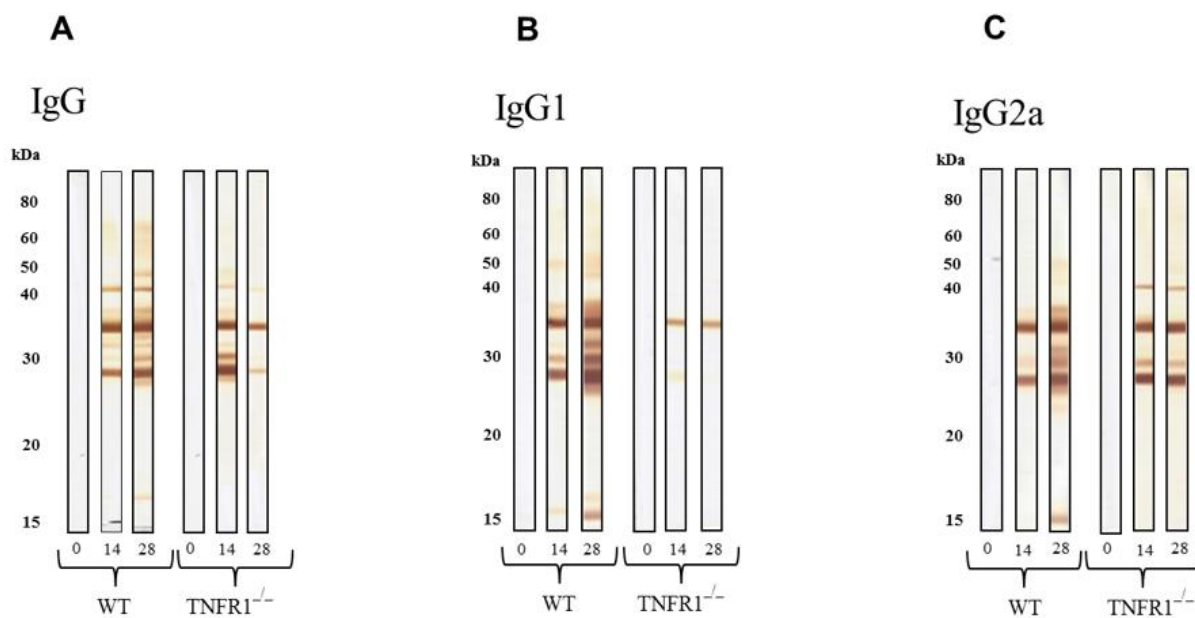


Figura 8. Immunoblotting para detecção de antígenos de *N. caninum*. Representativo de soros de grupos de camundongos WT e TNFR1^{-/-} infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1). O reconhecimento antigênico foi mensurada 0, 14 e 28 dias pós infecção em soros de ambos os grupos. IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C). Marcadores moleculares são indicados em kiloDalton.

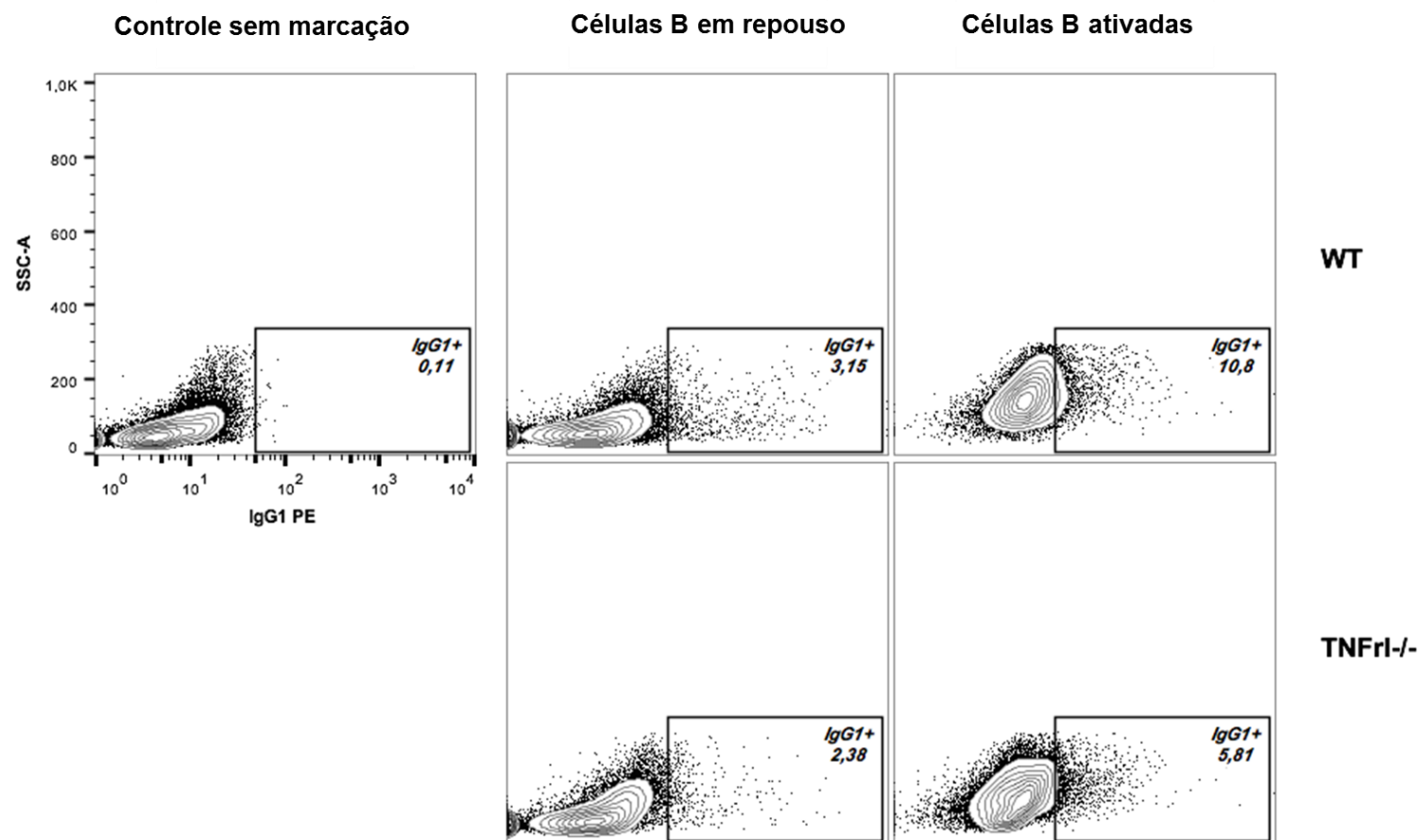


Figura 9. Camundongos WT expressam aumento de níveis intracelulares de anticorpos IgG1. A expressão da produção de anticorpos intracelulares específicos foi mensurada por fenotipagem de células B por análise no citômetro de fluxo

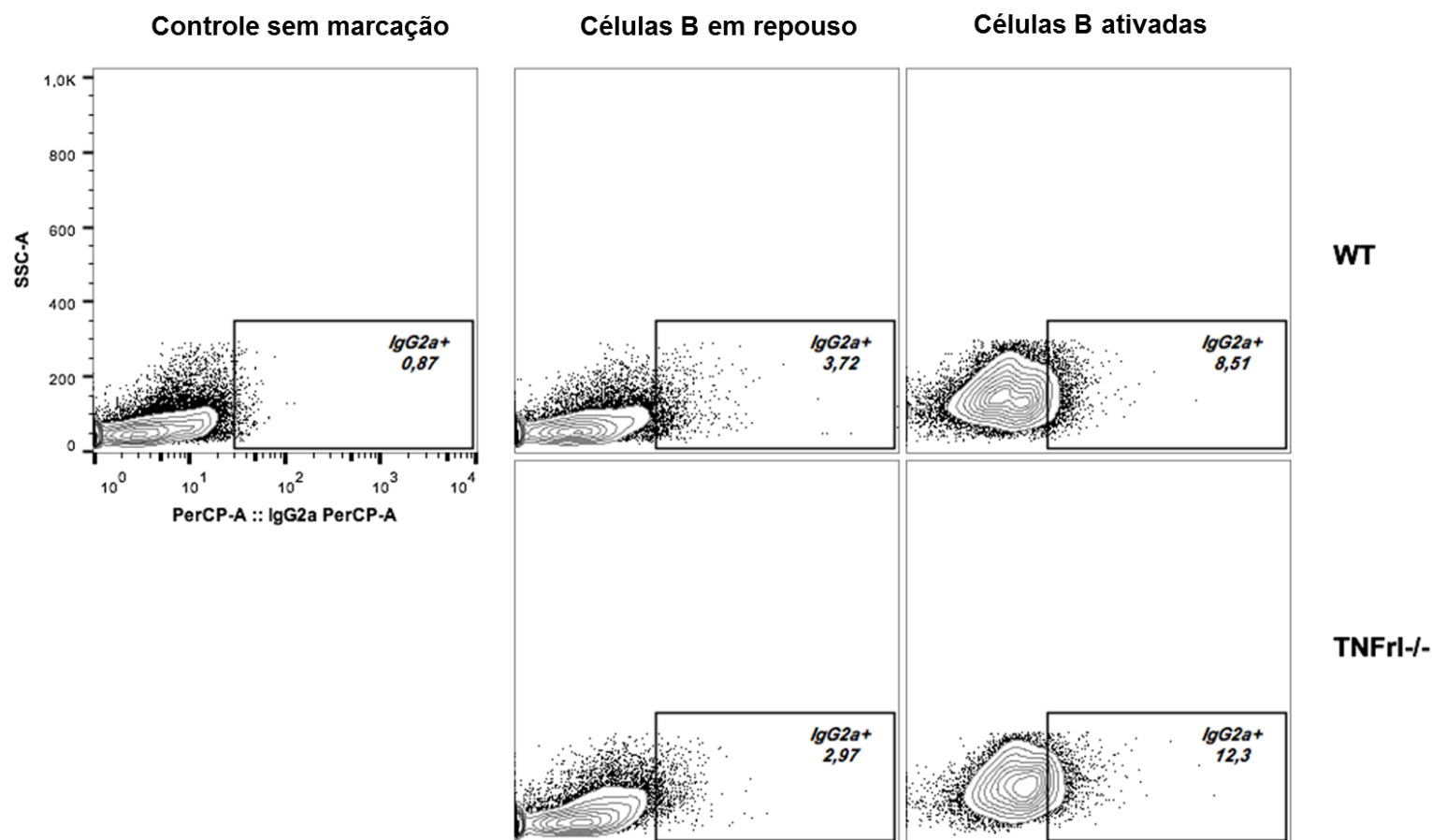


Figura 10. Camundongos TNFR1^{-/-} expressam aumento de níveis intracelulares de anticorpos IgG2a. A expressão da produção de anticorpos intracelulares específicos foi mensurada por fenotipagem de células B por análise no citômetro de fluxo.

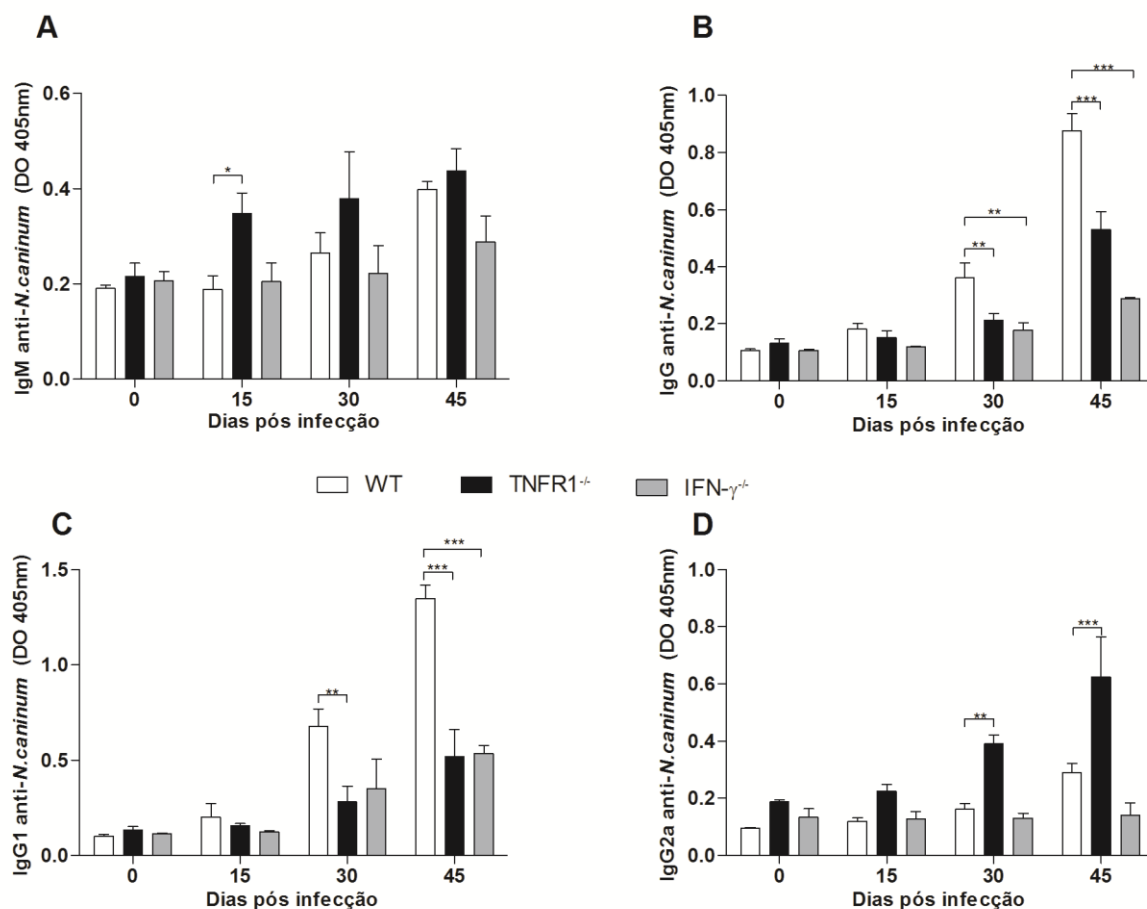


Figura 11. Cinética da produção de anticorpos antígeno específico a partir de animais imunizados. Pela técnica de ELISA indireto foi analisado a soro reatividade para anticorpos IgM (A), IgG total (B), IgG1 (C) e IgG2a (D) em animais WT e TNFR1^{-/-} imunizados com aproximadamente 60μg de antígeno. A produção de anticorpos foi mensurada até 45 dias após a primeira imunização em soros de ambos os grupos. Valores são indicados como densidade óptica (DO) a 405nm sendo expressos como média e ± SEM, *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001 (Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni).

6. Discussão



6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de pesquisas para elucidar tanto o papel da resposta imune celular quanto adaptativa frente a infecção por *N. caninum* é necessário devido ao impacto que a infecção por este parasito causa à produção animal (REICHEL et al., 2014). Devido à estreita relação taxonômica entre *T. gondii* e *N. caninum*, alguns mecanismos da resposta imune em infecções por *T. gondii* podem apresentar um papel similar na proteção do hospedeiro contra *N. caninum* (LEE et al., 2000, RITTER et al., 2002). O uso de animais geneticamente modificados vem facilitando o entendimento da relação patógeno–hospedeiro promovendo avanços em fontes quimioterápicas para a intervenção no desenvolvimento da patogenia.

Pesquisas evidenciaram que TNFR1 é o principal receptor de TNF- α , o qual está associado com a regulação de respostas inflamatórias generalizadas e com a prevenção de danos teciduais através da indução de apoptose sendo um potente regulador funcional de células apresentadoras de antígenos (ZAKHAROVA e ZIELGLER, 2005). Vários estudos demonstraram que TNF- α é fundamental na ativação de macrófagos presentes em quase todos os tecidos, exibindo um importante papel no controle de diversas doenças devido a manutenção da homeostase tecidual ao qual a citocina participa (HAO et al., 2012).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que animais TNFR1^{-/-} infectados com *N. caninum* apresentaram 100% de mortalidade em uma dose letal para 50% dos camundongos (DL50) bem como um aumento tanto na carga parasitária em vários sítios da infecção e maior infiltrado inflamatório nos tecidos destes animais, sugerindo uma falha no controle parasitário em animais TNFR1^{-/-}. Em modelos de infecção por *N. caninum*, tratamentos de células cerebrais bovinas com TNF- α reduziram a proliferação

de taquizoítos do parasito (YAMANE et al., 2000, JESUS et al., 2013). Adicionalmente, estudos utilizando camundongos deficientes para o receptor 2 de TNF (TNFR2^{-/-}) demonstraram uma susceptibilidade parcial para a infecção por *N. caninum*, sendo resistentes a fase aguda e sucumbindo somente 63 dias pós infecção, apresentando 60% de mortalidade em camundongos TNFR2^{-/-} infectados com Nc-1 até as 30^a semana de experimentação (RITTER et al., 2002). Estes autores analisaram também tecidos cerebrais, hepáticos e pulmonares de animais infectados, demonstrando números similares de focos inflamatórios entre os grupos analisados. A partir destes resultados, pode-se deduzir que a sinalização de TNF- α via receptor 1 desempenha um papel relevante na resistência a infecção por *N. caninum* diferentemente do receptor 2.

A importância da citocina TNF- α na fase aguda da infecção por *N. caninum* também foi evidenciada em nosso trabalho. IL-12 e IFN- γ são citocinas importantes para a resistência do hospedeiro durante a infecção por *N. caninum* (HEMPHILL, VONLAUFEN, NAGULESWARAN, 2006; MINEO et al., 2010) e nossos resultados demonstraram que a ausência da ação de TNF- α induziu uma maior produção destas citocinas, possivelmente como um mecanismo de inflamação compensatório. Adicionalmente, estes resultados revelaram que TNF- α não é necessário para que haja a indução destas citocinas que exibem papel chave durante a infecção por *N. caninum*. Estes achados são semelhantes aos encontrados em outros modelos de inflamação, onde camundongos deficientes em TNF- α ou TNFR apresentaram aumento na produção sistêmica de IL-12 e IFN- γ (YAP et al., 1998; CALSAVARA 2014).

A produção de NO em animais deficientes para o receptor 1 de TNF, diferentemente da produção de IL-12 e IFN- γ , foi menor que a produzida por animais WT. Tal fato pode ser explicado por TNF- α apresentar papel sinalizador em resposta anti-parasitária dependente de NO. Experimentos em cultura celular tem demonstrado um

papel crucial tanto de IFN- γ quanto de TNF- α na indução de iNOS, bem como no controle de crescimento de parasitos por macrófagos (SIBLEY et al., 1992; LANGERMANS et al., 1992; YAROVINSKY, 2014; MANNA et al., 2014). Em adição, sabe-se que a neutralização de TNF- α bem como o uso de camundongos deficientes em TNF- α ou no seu receptor, resultou no aumento da susceptibilidade a infecção decorrente da ausência de controle da carga parasitária por óxido nítrico (NO) e uma consequente reativação da infecção por *T. gondii* em animais experimentalmente infectados (GAZZINELLI et al., 1993; SUZUKI, et al., 1994; YAP et al., 1998; SCHLUTER et al., 2003).

Apesar da alta produção de outras citocinas pró-inflamatórias, conhecidas por reduzir a multiplicação parasitária em tecidos de animais infectados (INNES et al., 2007), nós observamos que animais geneticamente deficientes para TNFR1 apresentaram maior carga de DNA de *N. caninum* tanto na infecção aguda quanto na infecção crônica demonstrando assim que TNF- α contribui para redução da carga parasitária.

Citocinas como IFN- γ e TNF- α , entre outras produzidas por células T auxiliares ativadas na presença de patógenos, estão intimamente ligadas com o processo de mudanças de isotipos de anticorpos (INNES e MATTTSSON, 2007). A ausência de TNF- α em nossos estudos demonstrou uma resposta exacerbada do tipo Th1 sendo confirmada pela alta expressão de anticorpos do tipo IgG2a bem como produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias em camundongos TNFR1^{-/-}. Rojo-Montejo e colaboradores (2011) corroboraram com nossos dados demonstrando em seus estudos com neosporose congênita e cerebral que camundongos previamente imunizados apresentaram uma alta resposta imune humoral com produção predominante de IgG1 e uma resposta imune celular dominante pela expressão de IFN- γ , sugerindo que uma mistura de resposta Th1/Th2 pode ser benéfica para limitar a disseminação e gerar uma proteção contra a infecção congênita por *N. caninum*. Em contrapartida outras pesquisas envolvendo

imunizações com taquizoítos inativados pelo frio ou pelo calor em camundongos selvagens revelaram altos níveis de IgG2a demonstrando uma resposta imune do tipo Th1 nestes animais quando comparados com camundongos imunizados com outros tipos de antígenos (KLEVAR et al. 2007; STROHBUSCH et al. 2009; FENG et al. 2010; HEMPHILL et al., 2013).

Estudos em bovinos demonstram que a presença de IFN- γ favorece a produção de anticorpos IgG2, enquanto que a interleucina-4 regula a síntese de anticorpos IgG1 (ESTES et al., 1994; 1995). Pesquisas utilizando bezerros e bovinos revelam que após uma infecção primária ocorre a presença de anticorpos específicos IgM e IgG. Níveis de IgM específicas aparecem duas semanas após a infecção, tendo um declínio após quatro semanas. Já os níveis de IgG aumentam durante a primeira semana de infecção perdurando de três a seis meses pós-infecção primária (DE MAREZ et al., 1999; TREES et al., 2002; WILLIAMS et al, 2000).

Adicionalmente, sabe-se que a neutralização do parasito alvo por anticorpos são importantes para o controle da infecção, podendo causar um distúrbio na maquinaria de invasão do parasito (INNES 2007). Nós demonstramos aqui que durante a infecção por *N. caninum*, TNF- α está intimamente ligada ao balanço da produção de subclasses de IgG porém a maneira exata como este fenômeno pode induzir a resistência a infecção ainda não está claro.

Os resultados aqui apresentados mostraram que TNF- α tem uma ampla participação na resposta contra *N. caninum* por participar tanto de mecanismos envolvidos na resposta imune celular quanto humoral. Entretanto tais mecanismos necessitam ser melhor elucidados.

7. Conclusões



7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente a partir do uso de animais TNFR1^{-/-} conclui-se que:

- TNFR1 é um importante mediador de resistência a infecção por *N. caninum*;
- TNFR1 é importante no controle do parasitismo agudo e crônico durante a infecção por *N. caninum*;
- A ausência da sinalização de TNF- α leva a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, provavelmente como um mecanismo de compensação da resposta imune frente a infecção por *N. caninum*;
- A presença de TNF- α regula a produção de subclasses específicas de anticorpos IgG frente a antígenos solúveis de *N. caninum*.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEA, C.; TANAKAA, S.; IHARAA, S.; NISHIKAWAA, Y. Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice. **Clinical Vaccine Immunology**, p. 2-3, 2014.

AGGARWAL, B.B.; GUPTA, S.C.; KIM, J.H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25years later, a golden journey. **Blood**, v.119, p.651–665, 2012.

AGGARWAL, D.; LIMDI, J.K. Anti-TNF therapy is associated with a reduction in radiation exposure in patients with Crohn's disease. **European Journal of gastroenterology & hepatology**, v.27, p. 13-19, 2015.

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

ALMERÍA, S.; ARAUJO, R.N.; DARWICH, L.; DUBEY, J.P.; GASBARRE, L.C. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, v.33, p.517–523, 2011.

AL-QASSAB, S.; REICHEL, M.P; ELLIS, J.T.; On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. **Diversity**, v. 2, p.411-438, 2010.

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

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

BARBOSA, I.G.; HUGUET, R.B.; MENDONÇA, V.A.; SOUSA, L.P.; NEVES, F.S.; BAUER, M.E.; TEIXEIRA, A.L. Increased plasma levels of soluble TNF receptor1 in patients with bipolar disorder. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 261, p.139-143, 2011.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A.E.; DUBEY, J.P.; ARDANS, A.A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990–1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, p.113–117, 1993.

BJERKAS, I.; DUBEY, J.P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.32, p.407–410, 1991.

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

BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes, **European Journal Immunology**, v.20, p.1131–1135, 1990.

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

BRIETZKE, E.; KAPCZINSKI, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v.32, p. 1355-1361, 2008.

BUXTON, D., MCALLISTER, M.M., DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitology**. v.18, p.546–552, 2002.

CALSAVARA, A.C.; SORIANI, F.M.; VIEIRA, L.Q.; COSTA, P.A.; RACHID, M.A.; TEIXEIRA, A.L. TNFR1 absence protects against memory déficit induced by sepsis possibly through over-expression of hippocampal BDNF. **Metabolic Brains Disease**, Epub ahead of print, 2014.

CARDOSO, M.R.D.; MOTA, C.M.; RIBEIRO, D.P.; SANTAGO, F.M.; CARVALHO, J.V.; ARAUJO, E.C.B.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.O.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O. ArtinM, a d-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**, v.26, p.9183-9193, 2011.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.72, p.3666-3670, 1975.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ANÁIS-SECO, I.; BURGOS, B.M.; RODRIGUES-BERTOS, A.; ADDURIZ, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesion between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 187-191, 2006.

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

DE MAREZ, T.; LIDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKIS, M.C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.1647–1657. 1999.

DEROUICH-GUERGOUR, D.; BRENIER-PINCHART, M.P.; AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. Tumor necrosis factor receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.763-769, 2001.

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type 1 interferon (IFN α /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, v.8, p.77–87, 1998.

DION, S.; GERMON, S.; GUITON, R.; DUCOURNAU, C.; DIMIER-POISSON, I. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**, v.41, p.685-695, 2011.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v.2, p. 230–233, 1990.

DUBEY, J.P.; JANOVITZ, E.B.; SKOWRONEK, A.J. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. **Veterinary Parasitology**, v. 43, p. 137-141, 1992.

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

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

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

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

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.267–289, 2006.

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

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

ELSHEIKHA, H.M.; MCKINLAY, C.L.; ELSAIED, N.A.; SMITH, P.A. Effects of *Neospora caninum* infection on brain microvascular endothelial cells bioenergetics **Parasites & vectors**, v.6, p.1-10, 2013.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, 107-115, 2011.

ESTES, D.M.; CLOSSER, N.M.; ALLEN, G.K.. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. **Cellular Immunology**. v.154 p.287–295, 1994.

ESTES, D.M.; HIRANO, A.; HEUSSLER, V.T.; DOBBELAERE, D.A.; BROWN, W.C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. **Cellular Immunology**, v.163, p.268–279, 1995.

FAUSTMAN, D.L.; DAVIS, M. TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine. **Frontiers in Immunology**, v.4, p.478-485, 2013.

FENG, X.; ZHANG, N.; TUO, W. *Neospora caninum* tachyzoite and antigen-stimulated cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells and spleen cells of naive BALB/c mice. **The Journal of Parasitology**, v. 96, p.717–723, 2010

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n.5, p.1504-1518, 2005.

FIGIEL, I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v.68, p.526-534.

GAZZINELLI, R.T.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v.151, p.3672–3681, 1993.

GIGLEY, J. P.; FOX, B. A.; BZIK D. J. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th-1 host immune responses in the absence of parasite replication. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 1069–1078, 2009.

GONCALVES, N. S.; GHAEM-MAGHAMI, M.; MONTELEONE, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; LEWIS, D.J.; SIMMONS, C.P.; MACDONALD, T.T. Critical role for tumor necrosis factor in controlling the number of lumenal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. **Infection and Immunity**, v.69, p.6651–6659, 2001.

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

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **TRENDS in Parasitology**, v.22, n°.6, 247-252, 2006.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 13, p. 133-150, 2013.

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

GRELL, M.; WAJANT, H.; ZIMMERMANN, G.; SCHEURICH, P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 570-575, 1998.

HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231–241, 2005.

HAO, N. B.; LU, M. H.; FAN, Y. H.; CAO, Y. L.; ZHANG, Z. R.; YANG, S. M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 948098, 2012.

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

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

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; GOLAZ, J.; BURGNER, I. Infection of primary canine duodenal epithelial cell cultures with *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, v.95, p.372-80, 2009.

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

HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1669–1676, 1999.

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

INNES, E. A.; MATTSSON, J.G. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.23 n.2, p.43-44, 2007.

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

JESUS, E.E.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, A.B.; FREIRE, S.M.; TARDY, M.B.; EL-BACHA, R.S.; COSTA, S.L.; COSTA, M.F. Effects of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Experimental Parasitology**, v.133, p.269–274, 2013.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LANGERMANS, J. A. M.; VAN DER HULST, M. E. B.; NIBBEREING, P. H.; HIEMSTRA, P.S.; FRANSEN, L.; VAN FURTH, R. IFN-γ-induced L-arginine-dependent toxoplasmatostatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-α. **The Journal of Immunology**, v.148, p.568, 1992.

LARSON, R.L.; HARDIN, D.K.; PIERCE, V.L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.1597–1604, 2004.

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

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.H.F.; SEGUNDO, G.R.S.; 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**, p. 84-89, 2006.

LU, J.V.; WALSH, C.M. Necroptotic signaling in adaptative and innate immunity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.35, p.33-39, 2014.

MANNA, P.P.; HIRA, S.K.; BASU, A.; BANDYOPADHYAY, S. Cellular therapy by allogeneic macrophages against visceral leishmaniasis: role of TNF- α . **Cellular Immunology**, v.290, p.152-163, 2014.

MANSILLA, F. C.; FRANCO-MAHECHA, O. L.; LAVORIA, M. A.; MOORE, D. P.; GIRALDEZ, A. N.; IGLESIAS, M. E.; WILDA, M.; CAPOZZO, A. V. The immune enhancement of a novel soy lecithin/beta-glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. **Vaccine**, v.30, p.1124–1131, 2012.

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*. **Internation Journal for Parasitology**, v. 28, p.1473-1478, 1998.

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

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.P.; CARRASCO, A.O.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.149-153, 2009.

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

MINEO, T.W.P.; OLIVEIRA, C.J.F.; SILVA, D.A.O.; OLIVEIRA, L.L.; ABATEPAULO, A.R.; RIBEIRO, D.P.; FERREIRA, B.R.; MINEO, J.R.; SILVA, J.S. *Neospora caninum* excreted/secreted antigens trigger CC-chemokine receptor 5-dependent cell migration. **International Journal for parasitology**, v.40, p.797-805, 2010.

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

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

MILLER, C.M.D.; QUINN, H.E.; WINDSOR, P.A.; ELLIS, J.T. Characterization of first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 620-625, 2002.

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

MOORE, D.P.; ECHAIDE, I.; VERNA, A.E.; LEUNDA, M.R.; CANO, A.; PEREYRA, S.; ZAMORANO, P.I.; ODEÓN, A.C.; CAMPERO, C.M. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 245-51, 2011.

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

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

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.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA H.; MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p.811–816, 2001.

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

PÉREZ-ZABALLOS, F.J.; ORTEGA-MORA, L.M.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; NAVARRO LOZANO, V.; GARCÍA-VILLADA, L.; COSTAS, E. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 507-510, 2005.

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, p.278-280, 1999.

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KUENDIG, T.M.; SHAHINIAN, A.; WIEGMANN, K.; OHASHI, P.S.; KRONKE, M.; MAK, T.W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, v.73, p.457-467, 1993.

PLITZ, T.; HUFFSTADT, U.; ENDRES, R.; SCHALLER, E.; MAK, T.W.; WAGNER, H.; PFEFFER, K. The resistance against *Listeria monocytogenes* and the formation of germinal centers depend on a functional death domain of the 55 kDa tumor necrosis factor receptor. **European Journal of Immunology**, v.29, 581-591, 1999.

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, p.723-732, 2004.

REGIDOR-CERRILLO, J.; ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; MEZO, M.; PÉREZ, V.; ORTEGA-MORA, L.M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Veterinary Research**, v.45, p.1-15, 2014.

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

REICHEL, M.P.; McALLISTER, M.M.; WILLIAM, E.P.; CAMPERO, C.; ORTEGA-MORA, L.M.; ELLIS, J.T. Control options for *Neospora caninum*- is there anything new or we going backwards? **Parasitology**, v. 141, p. 1455-1470, 2014.

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

RITTER, D.M.; KERLIN, R.; SIBERT, G.; BRAJE, D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. **Journal of Parasitology**., v.88, p.271-280, 2002.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; MURUGAN-HERNÁNDEZ, V.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 7-16, 2009.

ROJO-MONTEJO, E.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ-MARCOS, S.; PÉREZ-ZABALLOS, F.; LÓPEZ-PÉREZ, I.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Comparative efficacy of immunization with inactivated whole tachyzoites versus a tachyzoite-bradyzoite mixture against neosporosis in mice. **Veterinary parasitology**, v. 138, p.1372–1383, 2011.

ROMERO, J.J.; PEREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.149–159, 2004.

ROSBOTTOM, A.; GUY, C.S.; GIBNEY, E.H.; SMITH, R.F.; VALARCHER, J.F.; TAYLOR, G.; WILLIAMS, D.J. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v.29, p.219–228, 2007.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, H.; KAISER, P.; HARTLEY, C.; SMITH, R.F.; ROBINSON, R.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D.J. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS One**, v.19, e15799, 2011.

ROSSI, G.F.; CABRAL, D.D.; RIBEIRO, D.P; PAJUABA, A.C.A.M.; CORRÊA, R.R.; MOREIRA, R.Q.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O. Evalution of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.252-259, 2011.

RUBY, J.; BLUETHMANN, H.; PESCHON, J.J. Antiviral activity of TNF is mediated via p55 and p75 receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v.186, p.1591-1596, 1997.

SCHLUTER, D.; KWOK, L.Y.; LUTJEN, S.; SOLTEK, S.; HOFFMANN, S.; KORNER, H.; DECKERT, M. Both lymphotoxin alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. **The Journal of Immunology**, v.170, p.6172–6182, 2003.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R., BARWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87–98, 1998.

SEDDER, L.M.; McDERMOTT, M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.25, p.453-472, 2014.

SIBLEY, L.D.; ADAMS, L.B.; FUKUTOMI, Y.; KRAHENBUHL, J.L. Tumor necrosis factor alpha triggers antitoxoplasmal activity in gamma interferon primed macrophages. **The Journal of Immunology**, v.147, p.2350-2355, 1991.

SILVA, D.A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T.W.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.234–44, 2007.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

STROHBUSCH, M.; MULLER, N.; HEMPHILL, A.; MARGOS, M.; GRANDGIRARD, D.; LEIB, S.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. **Parasite Immunology**, v.31, p.366–372, 2009

SUZUKI, Y.; JOH, K.; KWON, O.C.; YANG, Q.; CONLEY, F.K.; REMINGTON, J.S. MHC Class I gene(s) in the D/L region but not the TNF- α gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Journal of Immunology**, 1994; 153: 4649-4654

SYED-HUSSAIN, S.S.; HOWE, L.; POMROY, W.E.; WEST, D.M.; HARDCASTLE, M.; WILLIAMSON, N.B. Vertical transmission in experimentally infected sheep Despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. **Veterinary Parasitology**, In Press, 2015.

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

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis – like abortion in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, v.1, p. 205-209, 1989.

TREES, A.J.; MCALLISTER, M.M.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; SMITH, R.F.; WILLIAMS, D.J.L. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.147–154, 2002.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends of Parasitology**, v. 21, p.558–561, 2005.

UCHIDA, M.; NAGASHIMA, K.; AKATSUKA, Y.; MURAKAMI, T.; ITO, A.; IMAI, S.; IKE, K. Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite antigens, NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic infection. **Parasitology Research**, v.112, p.655–663, 2013.

VITALE, R.F.; RIBEIRO, F.A. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Brazilian Journal of otorhinolaryngology**, v.33, p.117-121, 2007.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; 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**, v.121, p.347–358, 2000.

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

WESTON, J.F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N.B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.103, p.136–144, 2011.

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

YAP, G.S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; SHER, A. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v.160, p.1340–1345, 1998.

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

ZAKHAROVA, M.; ZIELGLER, H.K. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : Inhibition of Il-12 and Il-13 via TNF receptor 1 in Macrophages and dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v.175, p.5024-5033, 2005.