



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”

**Avaliação do papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF)
durante a infecção por *Neospora caninum***

Vanessa Resende Souza Silva

Uberlândia - MG

Agosto – 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”

**Avaliação do papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF)
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.

Vanessa Resende Souza Silva

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

Uberlândia - MG

Agosto – 2015

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

- 2015 Silva, Vanessa Resende Souza, 1991-
Avaliação do papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) durante a infecção por *Neospora caninum*/ Vanessa Resende Souza Silva. – 2015.
70 p.: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. *Neospora caninum* – Teses. 3. Fator de Inibição de Migração de Macrófagos – Teses. 4. Evasão imune – 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

Vanessa Resende Souza Silva

“Avaliação do papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) 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, 17 de agosto de 2015.


Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes – UFTM


Prof. Dra. Tatiana Carla Tomiosso – ICBIM/UFU


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



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus por guiar meus passos, me dar saúde, coragem, persistência e força para superar
obstáculos e conquistar meus objetivos;

Aos meus queridos pais Antonio José e Dilma por todo amor, carinho, incentivo, apoio,
conselhos, educação, dedicação e confiança;

Aos meus irmãos Tatiana e Victor Hugo pela amizade, amor, companheirismo e
cumplicidade;

Ao meu namorado Alex por todo amor, carinho, paciência, companheirismo e compreensão;

A minha família, avós, madrinhas, padrinhos, tios (as) e primos (as) que mesmo à distância
sempre se preocupam comigo e me dão força e carinho para continuar a conquistar meus
sonhos. Em especial ao meu padrinho Walteir (*in memorian*) por todo amor, alegria e carinho
que me transmitia. Sinto muita saudade e estará eternamente em meu coração.

*“Todo saber e todo aumento de nosso saber, em vez de terminar em uma solução, dá antes,
início a nova dúvida.*

Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas.

E a cada resposta nova, nova pergunta se segue.”

(Herman Hesse)

AGRADECIMENTOS

Ao Profº Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo pelos valiosos ensinamentos, apoio, incentivo e paciência que contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao Profº Dr. José Roberto Mineo pela oportunidade, por ser exemplo de profissionalismo, ética e competência.

A Profª. Drª. Fernanda Maria Santiago pela amizade, incentivo e sugestões dadas.

As minhas amigas Sarah e Haline pelo carinho, apoio e pelos momentos de confiança.

Aos amigos André, Arlindo, Cristina, Daniel, Deize, Eduardo, Eliézer, Flávia, Kamilla, Larissa, Lydiane, Murilo, Mylla, Nathália Rabelo, Nathália Assis, Patrício, Pollyana, Stella, Tamires e Vanessa por todo apoio, ensinamentos e pelos momentos descontraídos que amenizam a saudade de casa.

Aos amigos de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia Caroline, Fernando, Heber, Maraísa, Mariana, Maurília, Silas, Vinícius pela ajuda na realização dos experimentos, pelos conhecimentos compartilhados e 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 nos ajudar.

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

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa que exibe uma ampla distribuição mundial, sendo sua importância relacionada ao abortamento induzido em bovinos, levando a perdas econômicas consideráveis. Uma citocina envolvida em resposta a protozoários intracelulares é o fator inibitório da migração de macrófagos (MIF), produzida por diversos tipos de células e que se encontra pré-formada intracelularmente, o que a torna um importante fator em respostas inflamatórias agudas, apresentando papel central na imunidade inata. Devido à escassez de informação sobre a participação de MIF relacionada ao modelo em análise, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel desta citocina frente à infecção por *N. caninum*. Neste sentido, analisamos a produção da citocina e os fenótipos induzidos pela mesma, utilizando camundongos do tipo C57BL/6 selvagem (WT) e geneticamente deficientes em MIF (MIF^{-/-}), infectados de forma parenteral por taquizoítos de *N. caninum*. Mediante a infecção, observamos a produção de MIF em células e fluidos da cavidade peritoneal, baço, pulmão e soro em animais WT. Adicionalmente, observamos que camundongos MIF^{-/-} exibem carga parasitária reduzida durante a fase aguda e crônica da infecção, maior produção de TNF- α e NO, maior inflamação pulmonar, além de um discreto aumento da sobrevivência e recuperação do peso corporal, em comparação aos camundongos selvagens. Foi encontrado que TNF- α está envolvido na secreção de MIF, diferentemente das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF. Conclui-se à partir destes dados que a citocina MIF apresenta um papel modulatório relevante durante a infecção por *N. caninum*, auxiliando na manutenção da eficiência da latência da infecção.

Palavras chave: *Neospora caninum*, MIF, evasão imune

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan of the phylum Apicomplexa, distributed worldwide, and relevant due to induction of abortions in bovine leading to considerable economic loss. MIF is a cytokine known to be involved in response against intracellular protozoa, which is produced by several immune cells, and it is found intracellularly preformed, turning this cytokine an important factor in acute inflammatory response, exhibiting a central role in innate immunity. Considering the lack of information about the role of MIF in this specific model, the present study aimed to evaluate the relevance of this cytokine during an infection by *N. caninum*. We therefore analysed the cytokine production and phenotype induced by itself, using wild type (WT) and genetically deficient in MIF (MIF^{-/-}) C57BL/6 mice, infected with 5x10⁶ tachyzoites of Nc-Liv. Based on this infection it was possible to observe an acute production of MIF in cells and peritoneal cavity fluids, spleen and lungs. We also observed production in serum after 30 days of infection. Additionally, it was demonstrated that MIF^{-/-} mice possesses decreased parasitism during acute and chronic phases of infection. Moreover, it was observed an elevated production of TNF- α and NO and increased pulmonary inflammation in those animals as well as a slight increase in survival and recovery of body weight in comparison to WT mice. It was found that TNF- α is involved in the secretion of MIF, unlike the adapter molecules MyD88 and TRIF. In sum, it is possible to conclude that MIF presents a relevant modulatory role during the establishment of infection by *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*, MIF, immune evasion.

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Parasito.....	12
1.2 Ciclo Biológico	12
1.3 Patogênese e Patologia.....	15
1.4 Importância Epidemiológica.....	16
1.5 Resposta imune	17
1.6 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF)	18
1.6 Papel de MIF em resposta a infecções por parasitos intracelulares	19
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Obtenção dos camundongos	27
4.2 Obtenção de parasitos	27
4.3 Delineamento experimental	28
4.4 Homogenato de órgãos	29
4.5 Quantificação de citocinas	29
4.6 Quantificação de IgG e subclasses específicos para <i>N. caninum</i>	30
4.7 Determinação da produção de óxido nítrico	31
4.8 Determinação da inflamação tecidual.....	31
4.9 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	31
4.10 Análise estatística	32
4.11 Normas de biossegurança	33
5 RESULTADOS	35
5.1 <i>N. caninum</i> induz a produção de MIF.....	35
5.2 Camundongos geneticamente deficientes em MIF possuem um perfil de resistência à infecção por <i>N. caninum</i>	37
5.3 Animais MIF ^{-/-} apresentaram aumento na produção de TNF e óxido nítrico durante a infecção por <i>Neospora caninum</i>	41

5.4 Secreção de MIF durante a infecção por <i>Neospora caninum</i> é parcialmente dependente do receptor I de TNF.....	45
5.5 MIF não participa da produção de anticorpos IgG específicos para <i>Neospora caninum</i>	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	70



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Parasito

Neospora caninum é um protozoário, parasito intracelular obrigatório, causador da neosporose pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia e família Sarcocystidae (DUBEY, J. P., 2003; DUBEY, J. P.; CARPENTER; et al., 1988). Apresenta características morfológicas e biológicas semelhantes ao protozoário *Toxoplasma gondii* (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, J. P. et al., 2002).

N. caninum foi descrito pela primeira vez em 1984 na Noruega, em cães com quadro sugestivo à toxoplasmose, e que apresentavam distúrbios neurológicos e cistos teciduais, entretanto com sorologia negativa para *T. gondii* (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Somente em 1988 *N. caninum* foi reconhecido como uma nova espécie e gênero (DUBEY, J. P.; CARPENTER; et al., 1988). Dubey e colaboradores encontraram características básicas determinantes para distinguir este novo parasito de *T. gondii*, tais como, paralisia predominante dos membros posteriores em cães, cistos teciduais com paredes espessas e testes sorológicos e imunohistoquímicos negativos para *T. gondii* (DUBEY, J. P.; HATTEL; et al., 1988; DUBEY, J. P.; LINDSAY, 1993). Além de diferirem em indução de patologias, estas duas espécies são distintas em suas interações com hospedeiro e ciclo de vida (HEMPHILL et al., 2013; INNES; MATTSSON, 2007).

1.2 Ciclo Biológico

N. caninum apresenta ciclo biológico heteroxeno alternando entre hospedeiros definitivos (reprodução sexuada) e intermediários (reprodução assexuada). Em 1998, cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) foram determinados como hospedeiros definitivos do *N. caninum* devido à reprodução sexuada que ocorre em seu intestino (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999; MCALLISTER et al., 1998). Posteriormente, estudos demonstraram a possibilidade de outros animais desempenharem a função de hospedeiro definitivo, tais como, coiotes (*Canis latrans*), dingos australianos (*Canis lupus dingo*) e lobos (*Canis lupus*), limitando a fase sexuada aos canídeos (GONDIM et al., 2004). A fase assexuada do ciclo de vida do *N. caninum* ocorre em uma ampla faixa de hospedeiros intermediários herbívoros ou

onívoros como em carneiros, cabras, raposas, lobo, alpacas, camelos, veados, cavalos, pardais, porcos e galinhas (DUBEY, S.; ROULIN, 2014; GONDIM et al., 2004; MINEO et al., 2011). Outros possíveis hospedeiros intermediários são os humanos. Embora não haja comprovação direta de infecção por *N. caninum* em humanos, alguns autores relatam evidências da presença de anticorpos específicos contra o parasito em populações de diferentes países, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico (DUBEY, J. P.; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; MINEO et al., 2011; ROBERT-GANGNEUX; KLEIN, 2009).

O ciclo é composto por três formas evolutivas: taquizoítas livres ou em grupos, bradizoítas em cistos teciduais e esporozoítas em oocistos (DUBEY, J. P. et al., 2007).

Oocistos imaturos são eliminados no ambiente por meio das fezes do hospedeiro definitivo infectado. Após 24 a 72 horas sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporulação, por meio do qual os oocistos se tornam infecciosos. Estes podem permanecer viáveis no solo por longos períodos até serem ingeridos por outros hospedeiros (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Os hospedeiros intermediários podem se infectar pela ingestão de oocistos esporulados, presentes em água ou alimentos contaminados. A parede protetora dos oocistos é digerida pelas enzimas digestivas, ocorrendo a liberação dos esporozoítos que penetram no epitélio intestinal ativamente. Este protozoário parasita células nucleadas de forma geral, multiplicando-se por endodiogenia dentro de vacúolos parasitóforos (VP), que são compartimentos intracelulares formados a partir da membrana da célula hospedeira com modificações do parasito que impedem a sua fusão com vesículas endocíticas, e infectam diversos tipos de células, incluindo, células neurais, macrófagos, endotélio vascular e hepatócitos, disseminado por todo o organismo (BARR et al., 1994; DUBEY, J. P., 2003). Os taquizoítas causam uma forte resposta inflamatória responsável pelas manifestações clínicas da doença. Sob a ação da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítas transformam-se em bradizoítos dando início a outra fase do desenvolvimento assexuado (TENTER et al., 2000).

Os bradizoítas se multiplicam lentamente por endodiogenia e formam cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais e tecidos musculares. Estes cistos podem persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica), embora possa ocorrer uma baixa taxa de reativação espontânea (DUBEY, J. P. et al., 1992). O ciclo se completa, com a ingestão de cistos teciduais por um hospedeiro definitivo. Após a ingestão, a parede do cisto é digerida pelas enzimas proteolíticas do estômago, o que leva a liberação dos bradizoítos. Estes

invadem enterócitos e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia), caracterizado pela formação dos esquizontes e liberação dos merozoítas. Inicia-se a fase sexuada (gamogonia) com a produção final de oocistos não esporulados (não infectantes) que são eliminados com as fezes dos canídeos (TENTER et al., 2000).

O parasito também é transmitido da mãe para o feto via placenta, considerada a principal rota de transmissão em bovinos (LINDSAY et al., 1999). Duas formas de transmissão vertical são conhecidas, sendo estas, a endógena e a exógena. A infecção transplacentária endógena é caracterizada pela reativação da infecção materna durante a gestação e subsequente infecção fetal. Já a infecção transplacentária exógena ocorre como resultado da ingestão de oocistos durante a gestação transmitindo a infecção para o feto (DONAHOE et al., 2015; LINDSAY et al., 1999; REICHEL et al., 2014; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

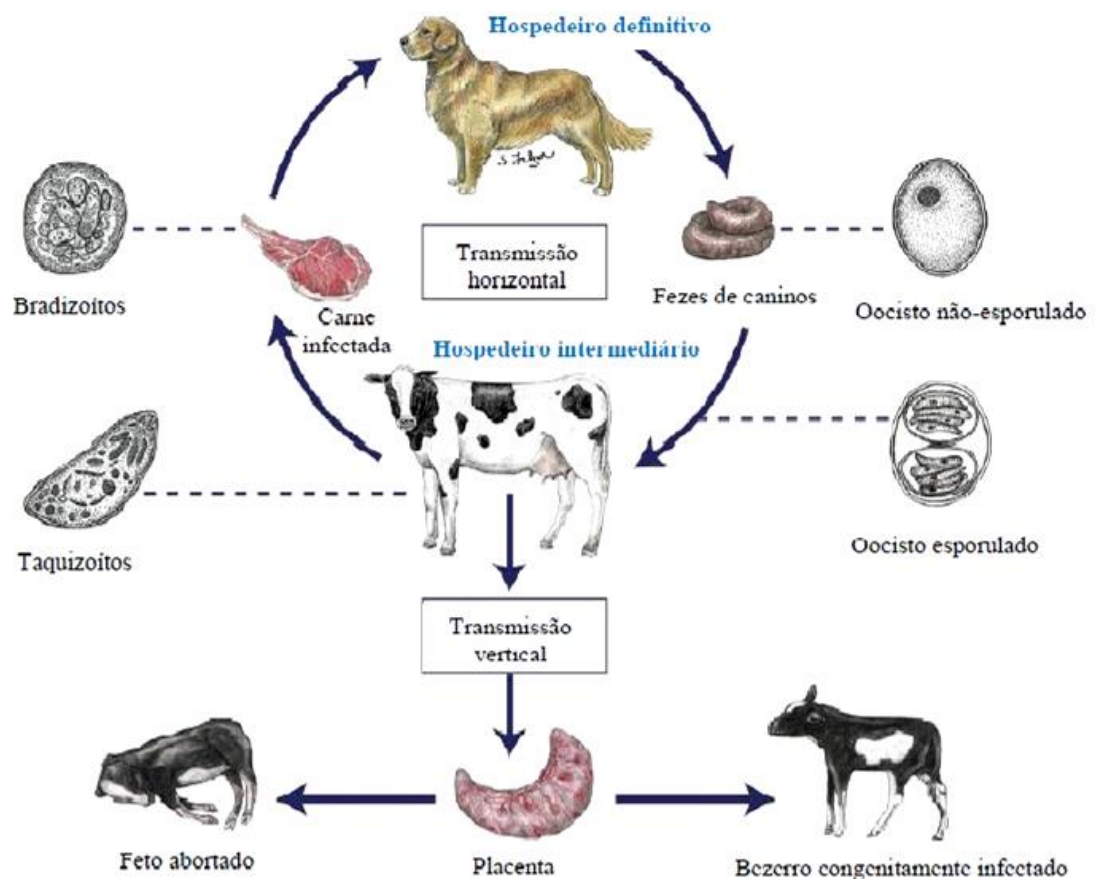


Figura1. Ciclo biológico de *Neospora caninum*. Adaptado de Goodswen e colaboradores (2013).

1.3 Patogênese e Patologia

A patogênese da neosporose está associada com a invasão celular, evento semelhante entre os parasitos do filo Apicomplexa. Este processo é rápido, dinâmico, complexo e envolve uma série de proteínas que são liberadas de micronemas, roptrias e grânulos densos (LERICHE; DUBREMETZ, 1990).

O processo de invasão celular pode ser resumido em três etapas. Inicialmente ocorre a adesão do parasito à célula hospedeira de forma aleatória envolvendo antígenos de superfície imunodominantes (SAG). Após esta adesão, o parasito posiciona sua extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para dar origem ao vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas dos parasitos são secretadas. Em seguida, proteínas de roptrias (ROP) são liberadas para formar uma associação com organelas da célula hospedeira, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao vacúolo parasitóforo. Por fim, proteínas dos grânulos densos (GRA) modificam a membrana do VP, o que contribui para a remodelação e maturação do vacúolo e desenvolvimento do parasito (NAKAAR et al., 2003; SINAI; WEBSTER; JOINER, 1997).

Durante todo o processo de invasão, *N. caninum* é capaz de produzir danos aos hospedeiros devido à atividade replicativa de taquizoítas (DUBEY, J. P.; DE LAHUNTA, 1993). Está amplamente distribuído em vários animais, embora provoque doença clínica importante em cães e bovinos (DUBEY, J. P., 2003).

A neosporose canina pode ocorrer em qualquer fase da vida, sendo que a doença se manifesta com mais frequência em cães jovens. A infecção causa encefalite, polimiosite podendo progredir para a paralisia e até falência cardíaca (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; DUBEY, J. P., 2003). Polimiosite é mais comum em cães de cinco semanas a seis meses de idade infectados via placenta e apresentam como sinais clínicos paralisia dos membros posteriores, atrofia muscular e fraqueza cervical. Cães adultos são mais susceptíveis a desenvolverem encefalomielite, incluindo paresia dos membros posteriores, convulsões, ataxia e alterações oculares como sinais clínicos da doença (BUXTON et al., 2002; DONAHOE et al., 2015; REICHEL; ELLIS, 2009).

N. caninum tem sido relatado como uma das maiores causas de falhas reprodutivas em bovinos em todo o mundo. Os efeitos prejudiciais induzidos pela infecção dependem da idade gestacional que vacas prenhes se tornam soropositivas. Quando há infecção no primeiro

trimestre de gestação é provável que ocorra reabsorção ou mumificação do feto. No segundo trimestre de gestação a sequela mais comum é o aborto, principal manifestação clínica observada na neosporose. Já, em caso de infecção no terceiro trimestre gestacional pode ocorrer o nascimento de bezerros com sinais clínicos ou saudáveis, mas cronicamente infectados. Os sinais clínicos mais frequentes em animais jovens são ataxia, paralisia de membros posteriores e perda de consciência (DUBEY, J. P., 2003; INNES et al., 2005; WILLIAMS et al., 2007).

1.4 Importância Epidemiológica

A neosporose está amplamente distribuída no mundo, sendo relatada a ocorrência do parasito em todos os continentes (DUBEY, J. P. et al., 2007). *N. caninum* exibe acentuada importância econômica devido a perdas consideráveis na agropecuária, principalmente em bovinos, relacionadas à queda na produção de leite e de carne, por isso vem sendo extensivamente estudado nos últimos anos (DUBEY, J. P.; SCHARES, 2011; LARSON; HARDIN; PIERCE, 2004). Estima-se uma perda econômica mundial de até 2,4 bilhões de dólares por ano em decorrência de abortos provocados por *N. caninum* (REICHEL et al., 2014). Em países como Canadá, Suíça e Estados Unidos o rebanho leiteiro é o setor que sofre maiores perdas econômicas. No Brasil, as taxas de prevalência da neosporose em bovinos variam 7,6 a 30,13%, sendo que a soroprevalência de neosporose na região do Triângulo Mineiro foi estimada em 17%. Um dos obstáculos para o controle da neosporose é que o fato das infecções serem perenes, ou seja, pode haver reagudização da infecção (MINEO et al., 2011; REICHEL et al., 2014).

Os cães possuem grande importância epidemiológica. Em muitos casos são utilizados como ferramentas na criação de gado, e conseqüentemente, contaminam o ambiente com oocistos presentes em suas fezes aumentando a prevalência de *N. caninum* em bovinos (KING et al., 2011). Além disso, cães podem ter contato com fetos abortados de bovinos e se tornarem infectados.

A vacinação parece ser o meio mais viável economicamente para controlar a neosporose. No entanto, após a retirada da única vacina comercial (Bolivis Neoguard) do mercado, devido a sua baixa eficácia, reduziu-se ainda mais as opções disponíveis para o controle de *N. caninum* (WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012; WILLIAMS et al., 2007). Devido à grande importância econômica da neosporose, pesquisas no sentido de

desenvolver estratégias para a prevenção e para o tratamento de infecções causadas por este protozoário têm sido realizadas.

Trabalhos recentes têm focado no desenvolvimento de vacinas como opção economicamente promissora, incluindo vacinas com o parasito inativado (ROJO-MONTEJO et al., 2009), uso de subunidades nativas (MANSILLA et al., 2012; MOORE et al., 2011), antígenos de *N. caninum* recombinantes (HEMPHILL et al., 2013; UCHIDA et al., 2013) e vacinas utilizando o parasito vivo (ROJO-MONTEJO et al., 2009; WEBER et al., 2013).

1.5 Resposta imune

Os mecanismos de defesa do hospedeiro para combater o *N. caninum* envolve tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (BUZONI-GATEL et al., 2006; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, e por isso, a imunidade mediada por células é fundamental, com a participação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* (NK), porém a resposta imune humoral também participa do controle da infecção neutralizando e destruindo taquizoítas extracelulares (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Após a infecção via oral, os enterócitos e as junções intercelulares são a primeira barreira para impedir o estabelecimento do parasito. Quando os enterócitos são infectados secretam moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO), citocinas que ativam células natural killer (NK) induzindo a produção de interferon- γ (IFN- γ) e quimiocinas que recrutam macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos e as células dendríticas funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) através de receptores do tipo Toll (TLRs) (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; MARCAIS et al., 2013; MINEO et al., 2010).

As APCs ativadas produzem interleucina 12 (IL-12) que resulta na ativação e diferenciação de células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de citocinas essenciais para a sobrevivência do hospedeiro como IFN- γ (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006). A resposta do tipo Th1 é mais eficiente pelo reconhecimento das moléculas de *N. caninum* por TLR2 dependente da molécula adaptadora MyD88, proteína importante na resistência contra o parasito (MINEO et al., 2010). IFN- γ ativa células efectoras (macrófagos e células dendríticas) a controlar a replicação do parasito através da produção de intermediários reativos do oxigênio e de nitrogênio que bloqueiam o metabolismo do parasito,

ou a eliminação deste através da liberação de fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos ativados, mantendo uma resposta imune protetora contra *N. caninum* (BUZONI-GATEL et al., 2006). Células T CD8⁺ são ativadas pela IL-12 que auxiliam no controle da infecção, por meio da destruição de células infectadas, permitindo que taquizoítas fiquem acessíveis a mecanismos imunológicos, tais como anticorpos, complemento, células NK e macrófagos ativados (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

1.6 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF)

Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) foi descrito como uma linfocina derivada de células T, a qual promove a inibição randômica da migração de macrófagos permitindo que os macrófagos fiquem no local da lesão em reações de hipersensibilidade do tipo tardia, estudada por David (1966); Bloom e Bennett (1966). Desde sua descoberta, as funções de MIF foram negligenciadas e só a partir de 1989 que suas atividades biológicas começaram a ser esclarecidas devido à clonagem do DNA complementar de MIF humano (WEISER et al., 1989).

Aos poucos foram sendo descobertas funções diversas e intrigantes de MIF no sistema imunológico (CALANDRA; ROGER, 2003). Segundo alguns autores, embora MIF tenha sido uma das primeiras citocinas descritas, deverá se tornar uma das últimas a ser completamente entendida (KIM et al., 2000).

MIF é secretada por uma grande variedade de células, não somente relacionada à resposta imune, como em células parietais do estômago, camada epitelial da pele, trato gastrointestinal e geniturinário, células β -pancreáticas, glândula pituitária (CALANDRA; ROGER, 2003; MAASER et al., 2002; WAEBER et al., 1997). Também é produzida por macrófagos, monócitos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e basófilos (LUE et al., 2002).

MIF encontra-se pré-formada e armazenada intracelularmente, precisando apenas de um estímulo para ser liberada, o que a torna um relevante fator em respostas inflamatórias agudas (CALANDRA; ROGER, 2003). Foi demonstrado também que a secreção de MIF é mediada pela proteína p115 associada ao Golgi (MERK et al., 2009). Estresse, infecções e estímulos imunológicos, como as citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF e glicocorticóides são fatores que estimulam a secreção de MIF (MARTINEY et al., 2000; ROSADO JDE; RODRIGUEZ-SOSA, 2011).

MIF é um ligante de CD74 e CD44, com ativação mediada por tirosina quinase (MEYER-SIEGLER; VERA, 2005). Além disso, MIF pode ser endocitado pela célula alvo sem necessidade de se ligar a uma proteína de membrana (CALANDRA; ROGER, 2003). Assim, ativa a cascata de fosforilação da via de sinalização por quinase reguladora do sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) (LUE et al., 2002; MITCHELL et al., 1999). A fosforilação de ERK1/2, que é dependente de proteína quinase A, ativa a fosfolipase A2 e promove a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂). A ativação dessa via ERK1/2 é capaz de sobrepor o efeito imunossupressor de glicocorticóides (MITCHELL et al., 1999). Entretanto, já foi visto o papel imunossupressor de PGE₂ ao induzir a produção de citocinas do perfil Th2, como um mecanismo de fuga utilizado por alguns patógenos favorecendo a persistência da infecção (BARBOSA et al., 2014). MIF participa da ativação do fator de transcrição NF-κB, devido sua atuação na superexpressão de *TLR4* e, conseqüentemente, indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (ROGER et al., 2001).

Outras funções foram atribuídas a esta citocina pleiotrópica (CALANDRA et al., 1994). Possui duas atividades catalíticas relevantes sendo a tautomerase e oxirredutase. Além de possuir um papel central na resposta inata, é um importante fator da resposta imune adaptativa, pois regula linfócitos T, induz secreção de interleucinas e produção de anticorpos por estimulação antigênica (SUN et al., 1996; SUZUKI; KANAGAWA; NISHIHIRA, 1996). MIF também se correlaciona com formação de tumores, crescimento celular e inflamação por modular a apoptose mediada por proteína supressora de tumor, p53 (HUDSON et al., 1999). Outra função desta citocina está associada à indução da expressão de quimiocinas, moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) (DEMIR et al., 2003; FERRO et al., 2008). Também há evidências de que MIF possa atuar como um mediador anti-inflamatório através da via Jab-1 e bloquear a expressão de genes pró-inflamatórios (KLEEMANN et al., 2000).

1.6 Papel de MIF em resposta a infecções por parasitos intracelulares

MIF é altamente expresso na maioria das infecções parasitárias intracelulares desempenhando um papel central nas respostas imunes e inflamatórias, o que levou vários pesquisadores a estudar esta citocina. Vários estudos demonstraram que o MIF pode desempenhar tanto um papel protetor quanto um papel nocivo na resposta imune frente a

diferentes agentes patogênicos, porém várias informações ainda precisam ser esclarecidas (BOZZA et al., 2012; ROSADO JDE; RODRIGUEZ-SOSA, 2011).

O papel de MIF na infecção por *T. gondii*, parasito estreitamente relacionado ao *N. caninum*, já é bem descrito. Sabe-se que MIF é uma importante citocina envolvida no controle de *T. gondii* sistemicamente e também na interface materno-fetal (BOZZA et al., 2012; CASTRO et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2011; CHAISAVANEYAKORN et al., 2002; DE OLIVEIRA GOMES et al., 2011; FERRO et al., 2008; FLORES et al., 2008; ROSADO JDE; RODRIGUEZ-SOSA, 2011). Rosado e Rodriguez-Sosa (2011) observaram que camundongos BALB/c knockout para MIF desafiados com cepas de *T. gondii* (RH e ME49) apresentaram maior quantidade de cistos no cérebro, taxa elevada de macrófagos peritoneais infectados e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 β , TNF- α , IL-18, IFN- γ) e óxido nítrico quando comparados com camundongos selvagens. Também observaram alteração na função das células dendríticas, que diminuíram a produção de TNF- α e IL-12. Flores e colaboradores (2008) também demonstraram que MIF induz macrófagos infectados por *T. gondii* a produzirem TNF- α e IL-12, além de melhorar sua atividade microbicida devido à produção de óxido nítrico. Adicionalmente, é capaz de regular a expressão do receptor de quimiocina CCR5, conduzindo a migração dos macrófagos para o local da infecção. Cavalcanti e colaboradores (2011) evidenciaram que camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes em MIF, infectados com a cepa ME49 de *T. gondii*, tiveram uma redução de citocinas TNF- α e IFN- γ com consequente diminuição da resposta inflamatória sistêmica e dos danos teciduais. Dessa maneira, MIF parece estar envolvido não somente na indução de uma resposta pró-inflamatória para manter um perfil de resposta Th1, mas também regula a expressão de metaloproteinases como a MMP-9 e o remodelamento do tecido através de TGF- β .

Essa citocina tem um potencial fator no processo de inflamação na placenta quando infectadas por patógenos. Explantes placentários estimulados com o Antígeno Solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg), aumentaram a produção de MIF. E a sua liberação induz expressão de ICAM-1, que conduz a adesão de monócitos (THP-1) sobre a superfície dos explantes placentários (FERRO et al., 2008). Castro e colaboradores (2013) também demonstraram que células trofoblásticas (BeWo) e monócito (THP-1) infectadas por *T. gondii* secretam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias para controlar a infecção. Portanto, durante a gravidez MIF contribui na eliminação do parasito. No entanto, foi demonstrado em outro estudo que explantes de terceiro trimestre de gestação possuem um aumento da

susceptibilidade à infecção, sugerindo que as variações na regulação MIF durante a gestação têm um papel importante na infecção por *T. gondii* (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2011). Em um estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2014), verificou-se a sinalização intracelular desencadeada por MIF em modelo de células trofoblásticas infectados com *T. gondii*. Neste estudo, observaram que baixos níveis de MIF ativa a fosforilação de ERK1 / 2 e consequentemente aumenta a produção de PGE₂. Porém, a PGE₂ foi identificado como causa importante de imunossupressão, sendo um importante fator para persistência de *T. gondii* na interface materno-fetal. No entanto, o controle do parasitismo ocorreu apenas a concentrações elevadas de MIF, demonstrando ser um sistema dose-dependente.

MIF possui um papel controverso na malária, uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Alguns estudos indicam o papel deletério de MIF em infecção por *Plasmodium chabaudi adami*. Camundongos BALB/c infectados com este parasito apresentaram concentrações elevadas de MIF no plasma, associando esta citocina com a gravidade da anemia e supressão da eritropoiese. Também, camundongos deficientes em MIF, infectados com *Plasmodium chabaudi adami*, apesar de apresentarem uma curva de parasitemia semelhante aos animais controles, exibiram anemia menos grave e maior sobrevivência (MALU et al., 2011; MARTINEY et al., 2000; MCDEVITT et al., 2006). Entretanto, Awandare et al. (2007) observaram, em um estudo realizado na África, que MIF protege o hospedeiro durante infecções com *Plasmodium falciparum*. Além disso, Fernandes e colaboradores (2008) perceberam que pacientes com infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* apresentaram aumentos significativos de MIF, TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IgM no sangue periférico, indicando que MIF participa na resposta inflamatória contra estes parasitos.

Em relação a neosporose, há poucos trabalhos relacionando MIF com esta doença. Carvalho e colaboradores (2010) demonstraram que após uma infecção in vitro por *Neospora caninum*, tanto células cervicais uterinas humanas (HeLa) quanto células BeWo expressaram níveis elevados de MIF. As células BeWo apresentaram índice de infecção menor, diminuição da lise celular com níveis mais elevados de TGF- β do que as células HeLa. Adicionalmente, foi realizado tratamento prévio com TNF- α e observado o níveis aumentados de MIF em ambas as células, sugerindo o papel desta citocina contra resistência do parasito na placenta. Deste modo, essas informações reforçam a idéia que MIF pode ter uma importante ação em infecções por *Neospora caninum*.

A decorative graphic consisting of a vertical line and a horizontal line intersecting at a point. The vertical line is positioned to the left of the horizontal line, and the intersection point is slightly to the left of the center of the horizontal line.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa que causa grande impacto econômico na agropecuária devido aos abortos, mortalidade neonatal em bovinos e queda na produção de leite, além de causar várias doenças clínicas em cães (DUBEY, J. P.; SCHARES, 2011; LARSON et al., 2004). Estima-se que anualmente a perda econômica chegue a 2,4 bilhões de dólares associado a abortos induzidos pela infecção (REICHEL et al., 2014).

Devido à grande importância econômica da neosporose e após a retirada da única vacina comercial (Bovilis Neoguard) do mercado, têm sido realizadas pesquisas no sentido de desenvolver estratégias para a prevenção e para o tratamento de infecções caudas por este protozoário (MANSILLA et al., 2012; WESTON et al., 2012).

A compreensão dos processos que levam à invasão e o desenvolvimento intracelular de *N. caninum*, bem como o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune contra este patógeno são cruciais para o desenvolvimento de tratamentos eficazes, capazes de protegerem da infecção.

Desde a descoberta de MIF em 1966, diferentes estudos tem reportado sua relevância significativa para diversos grupos de pesquisa, os quais tem investigado a resposta imunológica contra a infecção por parasito intracelular (ROSADO JDE; RODRIGUEZ-SOSA, 2011). O reconhecimento desta molécula desencadeia vias de sinalização que influenciam na resposta do hospedeiro e na progressão da doença. Além disso, a citocina é amplamente expressa e encontra-se pré-formada intracelularmente, o que a torna um importante fator nas respostas inflamatórias agudas e como um mediador central na imunidade inata (CALANDRA; ROGER, 2003).

Considerando a necessidade de melhor compreender a participação de citocinas durante a infecção por *N. caninum* e visto importância cada vez mais reconhecida de MIF na interação parasito-hospedeiro e na modulação da resposta imune do hospedeiro frente a inúmeros patógenos, este trabalho é proposto com a finalidade de avaliar as respostas imunes celulares e humorais para melhor compreender os mecanismos imunológicos desencadeados pelo protozoário *N. caninum*, com a intenção de se desenvolver medidas profiláticas que auxiliem no controle da infecção causada por este protozoário e de seus efeitos deletérios a bovinocultura.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do MIF durante a infecção experimental de camundongos pelo protozoário *Neospora caninum*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel de MIF na produção de citocinas e óxido nítrico durante a infecção por *N. caninum*;
- Avaliar a importância de MIF no parasitismo e inflamação tecidual durante as fases aguda e crônica da infecção;
- Avaliar o papel de MIF na sobrevivência e morbidade de camundongos frente à infecção por taquizoítas de *N. caninum*;
- Avaliar o papel das proteínas adaptadoras MyD88 e TRIF e a via de sinalização TNF na indução de MIF;
- Quantificar a produção de anticorpos séricos antígeno-específicos das classes IgG e IgM em camundongos selvagens e geneticamente deficientes infectados com taquizoítas de *N. caninum*.



Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos camundongos

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e com depleções para genes-alvo do presente estudo ($MIF^{-/-}$, $TNFR1^{-/-}$, $MyD88^{-/-}$, e $TRIF^{-/-}$) com seis a oito semanas de idade, machos, foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foram mantidos no CBEA com água e ração *ad libitum*, em condições padronizadas de temperatura e umidade (22 a 25°C). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Conselho pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU#052/12) (anexo).

4.2 Obtenção de parasitos

As células de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em frascos de cultura celular em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad-CA, EUA) em atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C até atingirem a confluência como descrito anteriormente (RIBEIRO et al., 2009). Neste momento, as células foram infectadas com taquizoítos do isolado Nc-Liv (BARBER et al., 1995) de *N. caninum* e foram mantidos em passagens regulares, sendo estes replicados em uma nova monocamada a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4 °C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado, centrifugado (700 x g, 10 minutos, 4 °C) e ressuspendido com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2). Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripan a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Suspensões parasitárias foram armazenadas a -20 °C até a preparação do antígeno solúvel de *N. caninum* ou foram utilizados para a infecção dos animais.

O antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) foi preparado de acordo com métodos já descritos por Silva et al. (2007). Suspensões parasitárias foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (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 a 60 Hz em banho de gelo por cinco minutos. Em seguida, parasitos lisados foram centrifugados (10.000 x g, 30 min, 4 °C), o sobrenadante foi coletado e a sua concentração proteica determinada pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Alíquotas de NLA foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização em reações de ELISA.

4.3 Delineamento experimental

Para os ensaios de sobrevivência, camundongos WT e MIF^{-/-} (10 camundongos por grupo) foram infectados pela via intraperitoneal com 1x10⁷ taquizoítos viáveis de *N. caninum*, isolado Nc-Liv. Os animais foram monitorados diariamente quanto à perda de peso, durante 30 dias. Para análise da secreção de MIF nas fases aguda e crônica da infecção por *N. caninum*, camundongos WT (n=5/grupo) foram infectados via intraperitoneal com 5x10⁶ taquizoítos de *N. caninum*. A citocina MIF foi mensurada por meio de ELISA em lavado peritoneal, células do lavado peritoneal, homogenato do pulmão, homogenato do baço e soro (0, 1 e 7 após a infecção) e em homogenato de tecido cerebral e soro (30 dias após a infecção).

Procedimento similar foi adotado para análise da fase aguda e crônica da infecção em camundongos WT e MIF^{-/-} (n=5/grupo). A fase aguda da infecção foi analisada por meio da quantificação de citocinas em soros, lavado peritoneal e homogenato de pulmão (0 e 7 dias após infecção), por meio do ensaio de ELISA e CBA. A análise de parasitismo em células de peritônio bem como em pulmonares (0 e 7 dias após infecção) foi realizada por meio do ensaio quantitativo PCR real-time. A mensuração de óxido nítrico em lavado peritoneal (0, 1 e 7 dias após infecção) foi realizado pelo método de Griess e a inflamação tecidual em pulmão (0 e 7 dias após infecção) pela coloração por hematoxilina e eosina. Na fase crônica da infecção foi mensurado citocinas no soro e homogenato de tecido cerebral pela técnica de ELISA. O parasitismo e a análise de inflamação em tecidos cerebrais de camundongos 30 dias após a infecção foram realizados por meio de qPCR e por coloração com hematoxilina e eosina, respectivamente. Para a análise da resposta imune humoral por meio de ELISA indireto, soros de camundongos WT e MIF^{-/-} (n=5/grupo) infectados com 5x10⁶ taquizoítos de *N. caninum* foram coletados 0, 7, 15 e 30 dias após a infecção. Para verificar vias envolvidas na secreção de MIF durante a infecção por *N. caninum*, lavado peritoneal de

animais WT, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} e TNFRI^{-/-} (n=5/grupo) foram coletados após 7 dias de infecção.

4.4 Homogenato de órgãos

Para a análise da produção de citocinas de camundongos WT e MIF^{-/-} saudáveis e infectados com *N. caninum*, órgãos foram coletados e processados. A massa de tecido foi normalizada para 100 mg (pulmão, baço e cérebro), diluídos em 500 µL de coquetel de inibidor de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça). As amostras, em banho de gelo, foram trituradas com auxílio de um homogeneizador e submetidas a centrifugação (10.000 x g por 15 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C até sua utilização no procedimento de ELISA.

4.5 Quantificação de citocinas

As citocinas MIF, IL-12p40, IFN-γ, TNF foram mensuradas em lavado peritoneal, homogenato de pulmão e homogenato de cérebro pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes (BD Biosciences, San Diego, EUA e R&D Systems Inc., EUA). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Costar®, Corning Laboratories Inc., Nova Iorque, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específico para cada citocina e incubadas overnight. Após lavagem das placas com PBS-Tween e etapa de bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras teste foram adicionadas. Paralelamente, foram adicionadas curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes. Após 2 horas de incubação, anticorpos de detecção biotinilados e conjugados com estreptavidina-peroxidase 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). As placas foram reveladas utilizando o substrato enzimático tetrametilbenzidina (TMB) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para bloquear a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*SpectraMax* M2e, Molecular Devices, EUA) a 450 nm e os valores expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão. O limite de detecção para as citocinas IL-12p40, IFN-γ, TNF foi de 2000 pg/mL, já para a citocina MIF foi de 8000 pg/mL.

IFN- γ e TNF- α foram mensurados em soros de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com o parasito por meio do ensaio multiplex *Flex Set Cytometric Bead Array* – CBA (BD Biosciences, San Diego, EUA), de acordo com o fabricante. Em tubo FACS (BD Biosciences, San Diego, EUA) foi adicionado 25 μ L de beads de captura, 25 μ L curva padrão ou amostras e 25 μ L de anticorpo de detecção. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente foi acrescentado 500 μ L do tampão de lavagem e submetidos à centrifugação (200 x g por 5 minutos). Após, o sobrenadante foi desprezado, adicionado 300 μ L do tampão e foi realizada a leitura do experimento no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences, EUA).

4.6 Quantificação de IgG e subclasses específicos para *N. caninum*

O método de ELISA indireto foi utilizado para determinar a produção de anticorpos IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2a específicos para *N. caninum* em soros de camundongos WT e MIF^{-/-} previamente infectados, conforme descrição prévia (SILVA et al., 2007). Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com antígenos NLA (10 μ g/mL) diluído em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6), e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram bloqueadas 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 IgG total e PBS-T a 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. Posteriormente, amostras de soros foram diluídas a 1:25 em PBS-T-M5% e incubadas por 1 hora para detecção de IgG total e 1:25 em PBS-T-BSA1% por 2h para IgG1 e IgG2a, e incubadas a 37°C. Amostras de soros controles positivos (soros de animais experimentalmente infectados com *N. caninum*) e soros controles negativos (soros de animais não imunes) também foram adicionados. Em seguida, conjugados específicos para cada classe de imunoglobulina 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-benzotiazolína-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)

4.7 Determinação da produção de óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico (NO) dos animais WT e MIF^{-/-} infectados com *N. caninum* foram mensurados em lavado peritoneal através de kit comercial de detecção de NO (R&D Systems Inc., EUA). Este método tem como princípio a conversão enzimática de nitrato para nitrito por nitrato redutase. Em placa de 96 poços foi acrescentado 50µL de amostra paralelamente a curva padrão, seguido pela adição de NADH e nitrato redutase (incubação por 30 minutos a 37 °C). A quantidade de NO foi detectada por reação colorimétrica utilizando reagente de Griess após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*SpectraMax* 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 Determinação da inflamação tecidual

Amostras do pulmão e do sistema nervoso central de camundongos WT e MIF^{-/-} previamente infectados foram coletadas em formol 10% tamponado com fosfato por 24 horas, seguido da substituição por álcool 70% e submetidas a procedimentos padrão de inclusão em parafina. Posteriormente, os órgãos emblocados em parafina foram cortados a 5 µm de espessura e depositados em lâminas microscópicas para serem coradas com hematoxilina e eosina para avaliação do infiltrado inflamatório (MINEO et al., 2009). Os cortes foram fotografados utilizando o microscópio invertido automatizado (FSX100, Olympus, Japan).

4.9 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

DNA genômico a partir de tecidos de camundongos WT e MIF^{-/-} previamente infectados com *N. caninum* foi extraído mediante precipitação salina (cloreto de sódio), como descrita anteriormente com algumas modificações (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Resumidamente, 100 mg de tecido foram congeladas com nitrogênio líquido e trituradas com

ajuda de um cadinho de porcelana. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 500 µl de tampão NLB (10 mM de Tris-HCl, 400 mM de NaCl e 2 mM de Na₂EDTA, pH 8,2), tratadas com proteinase K (200 µg / mL) e SDS a 1% e incubadas a 55 °C por no mínimo 3 horas. Amostras de lavado peritoneal foram centrifugadas a 4000 x g durante 10 minutos antes da incubação com proteinase K. O DNA foi purificado com 0,8 ml de clorofórmio e precipitado com etanol absoluto. Após centrifugação a 12000 x g durante 15 minutos, o sedimento foi lavado com 1 ml de etanol a 75% e ressuspensão em água estéril. As amostras foram armazenadas a -70 °C.

Os pares de primers utilizados para detecção da região Nc5 de *N. caninum* (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002) foram: Forward (5'-ACTGGAGGCACGCTGAACAC-3') e Reverse (5'-AACAATGCTTCGCAAGAGGAA-3'). Para a normalização da quantidade de DNA genômico do hospedeiro nas amostras, o gene de GAPDH do camundongo foi escolhido (BARENCO et al., 2014). A sequência do primer para Forward GAPDH-F foi 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG-3', e o primer Reverse de GAPDH-R foi 5'-CAGTG TAGCCCAAGATGCCC-3'. As reações para os genes Nc5 e GAPDH foram realizadas com tubos separados. Em ambos os casos, a mistura de PCR (volume total de 25 µl) continha *master mix* (GoTaq qPCR, Promega, Madison, WI, EUA), 10 pmol de cada primer e 100 ng e 5 ng de molde de DNA para a sequência de gene de Nc5 e GAPDH, respectivamente. As curvas de diluição (fator de diluição x 10) para ambas as sequências foram preparados a partir de *N. caninum* e DNA genômico de camundongos extraído separadamente e usada para quantificação absoluta. Todas as amostras foram realizadas em triplicada. A amplificação, aquisição de dados e análise de dados foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (StepOne Plus, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e os valores de ciclo limiar (CT) foram exportados para análise.

4.10 Análise estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Dados foram expressos em média e erro padrão da média e analisados pelo teste *one-way* ANOVA, conjuntamente com o *post-test* de comparação múltipla de Bonferroni para comparar pares selecionados de grupos. Teste de Mann Whitney também foi utilizado. Taxas de sobrevivência foram estimadas utilizando método de Kaplan-Meier sendo a curva de

sobrevida comparadas através do teste Log-rank (Mantel-Cox). Todos os resultados serão considerados estatisticamente significantes para um nível de $p < 0,05$.

4.11 Normas de biossegurança

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 *N. caninum* induz a produção de MIF

Considerando que a produção de MIF não é restrita às células do sistema imune e apresenta uma ampla distribuição tecidual, mensuramos a concentração desta citocina por ELISA nas fases aguda (1 e 7 dias) e crônica (30 dias) da infecção por *N. caninum*. Camundongos WT foram infectados intraperitonealmente com 5×10^6 taquizoítos do isolado Nc-Liv de *N. caninum* (Figura 2). Observamos que há um aumento significativo na concentração de MIF no baço após 1 dia de infecção (Figura 2A); no fluido peritoneal (Figura 2B), nas células peritoneais (Figura 2C) e no homogenato do pulmão (Figura 2D) após 7 dias de infecção. Em amostras de soro (Figura 2E) com 1 e 7 dias de infecção e de homogenato de cérebro (Figura. 2F) com 30 dias não foram observados diferenças na secreção de MIF. Já no soro (Figura. 2G) após 30 dias de infecção é possível observar a secreção de MIF durante a infecção por *N. caninum*.

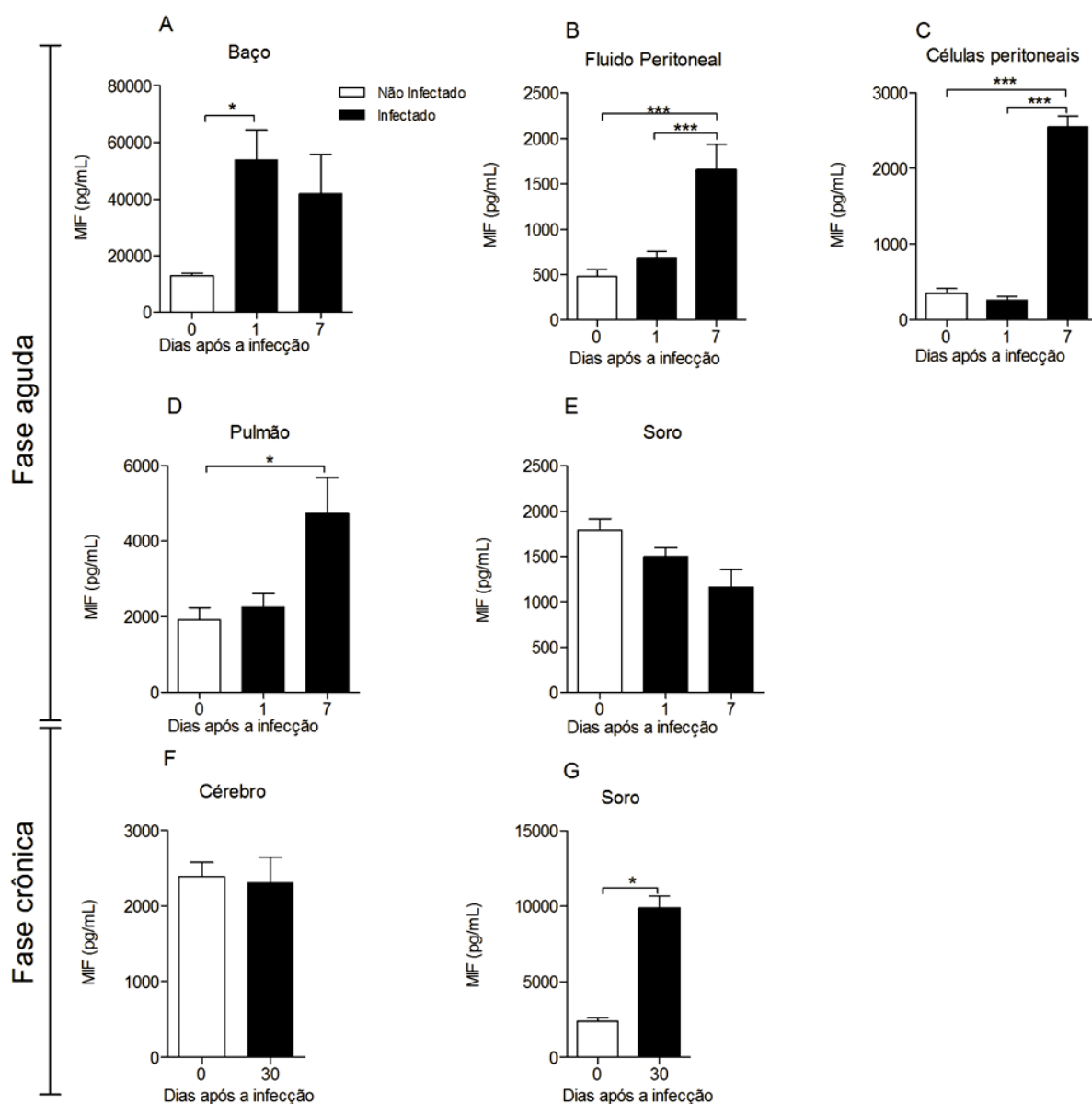


Figura 2: Concentração de MIF em diferentes sítios durante a infecção por *N. caninum*. Camundongos WT foram infectados via intraperitoneal com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-Liv). A concentração de MIF foi mensurada por ELISA 1 e 7 dias pós infecção em amostras de (A) homogenato de baço, (B) fluido peritoneal, (C) células peritoneais, (D) homogenato de pulmão e (E) soro e 30 dias pós infecção em amostra de (F) homogenato de cérebro e (G) soro. Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Two Way Anova seguido pelo pós teste de Bonferroni e teste de Mann Whitney).

5.2 Camundongos geneticamente deficientes em MIF possuem um perfil de resistência à infecção por *N. caninum*

Com a intenção de determinar a importância de MIF durante a infecção por *N. caninum*, camundongos WT e MIF^{-/-} foram desafiados com dose letal para 50% dos animais (DL50) de 1x10⁷ taquizoítos viáveis de *N. caninum*. Após o desafio, os animais foram acompanhados diariamente, por 30 dias, para análise da mortalidade (Figura 3A) e morbidade (Figura 3B). Observamos que camundongos MIF^{-/-} apresentaram discreto aumento da sobrevivência e perda de peso menos acentuada, em comparação com camundongos WT.

Para o acompanhamento da infecção, camundongos WT e MIF^{-/-} foram infectados com uma dose sub-letal de taquizoítos de *N. caninum* (Figura 4). Para análise da carga parasitária, o DNA genômico de *N. caninum* foi quantificado de diferentes tecidos relativos ao genoma do hospedeiro. Observamos que durante a fase aguda da infecção, há diminuição de DNA de *N. caninum* em células do lavado peritoneal (Figura 4A) e no tecido pulmonar (Figura 4B) de camundongos MIF^{-/-} em relação a animais WT. Além disso, observamos que na fase crônica da infecção a carga parasitária no cérebro (Figura 4C) de camundongos MIF^{-/-} também foi menor do que em animais WT. Esses resultados mostram que MIF contribui para a proliferação do parasito durante a fase aguda da infecção e/ou no estabelecimento de latência durante a fase crônica.

O estado inflamatório dos tecidos também foi verificado através da análise histopatológica (Figura 5). As alterações existentes em tecido pulmonar após 7 dias de infecção e em tecido do sistema nervoso central após 30 dias de infecção nos grupos WT e MIF^{-/-} infectados com *N. caninum* foram analisadas em tecidos corados por hematoxilina e eosina. A análise histológica demonstra que camundongos deficientes em MIF apresentam uma exacerbação dos processos inflamatórios decorrentes da infecção quando comparados com animais WT, sendo exemplos destas observações a diminuição dos espaços alveolares nos pulmões, bem como aumento do infiltrado inflamatório mononuclear no tecido cerebral de camundongos MIF^{-/-}.

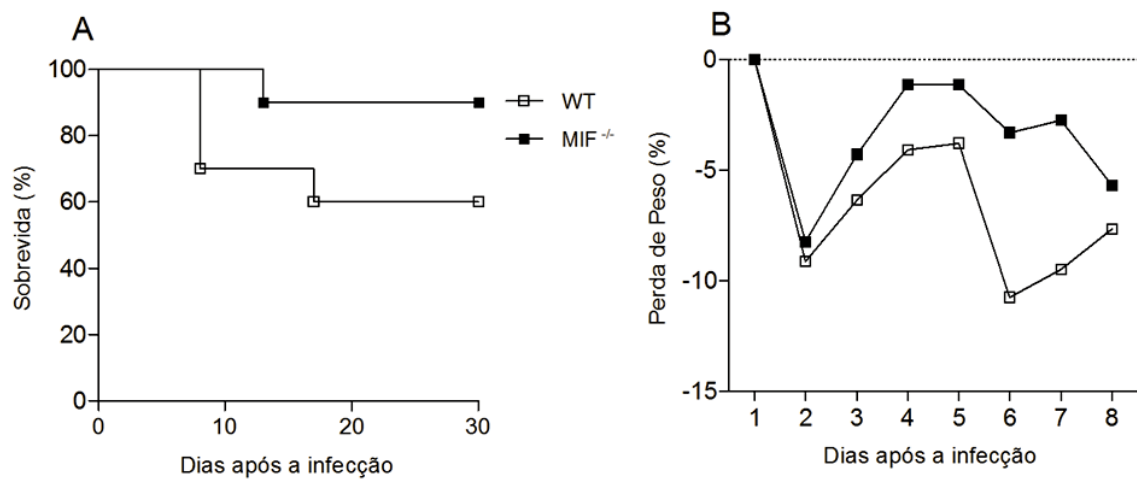


Figura 3. Deficiência em MIF aumenta a resistência do hospedeiro contra a infecção por *Neospora caninum*. Animais WT e MIF^{-/-} (n= 10 animais/ grupo) foram infectados via intraperitoneal com 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum*. Os animais foram acompanhados por 30 dias para determinação da (A) sobrevivência e (B) perda de peso. Os grupos foram comparados usando análise de sobrevivência por Kaplan-Meier, através do teste de log-rank. Os dados não apresentaram diferenças significativas.

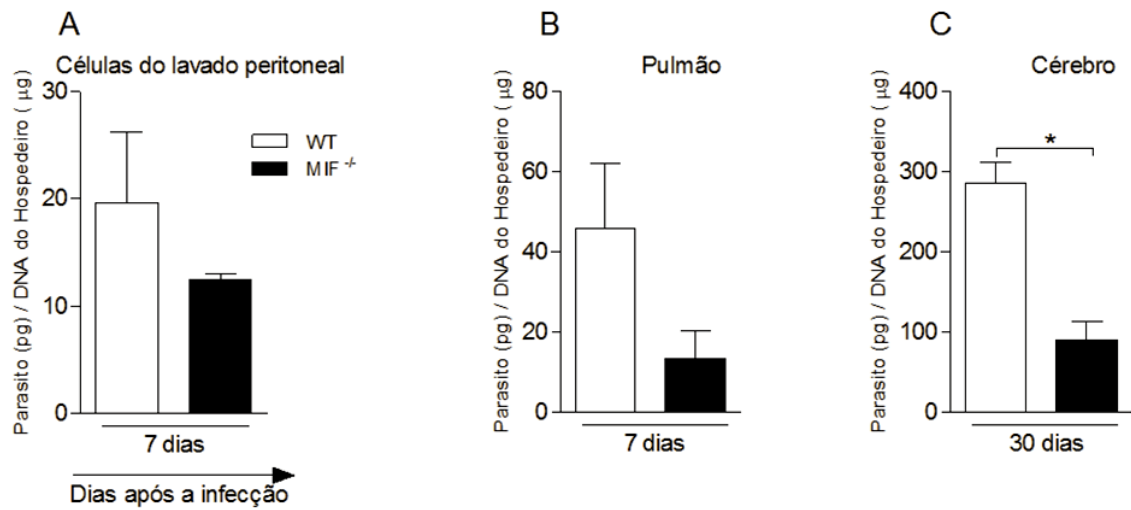


Figura 4. Quantificação da carga parasitária em camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com *Neospora caninum*. Camundongos WT e MIF^{-/-} (n= 10 animais/ grupo) foram infectados via intraperitoneal com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* e coletados após 7 dias de infecção (A) células do lavado peritoneal e (B) tecido pulmonar e após 30 dias de infecção (C) tecido do sistema nervoso central. Os dados foram obtidos através de qPCR pela amplificação do gene Nc5 e normalização com gene GAPDH de camundongo (controle). Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM) *p<0.05 (teste de Mann Whitney).

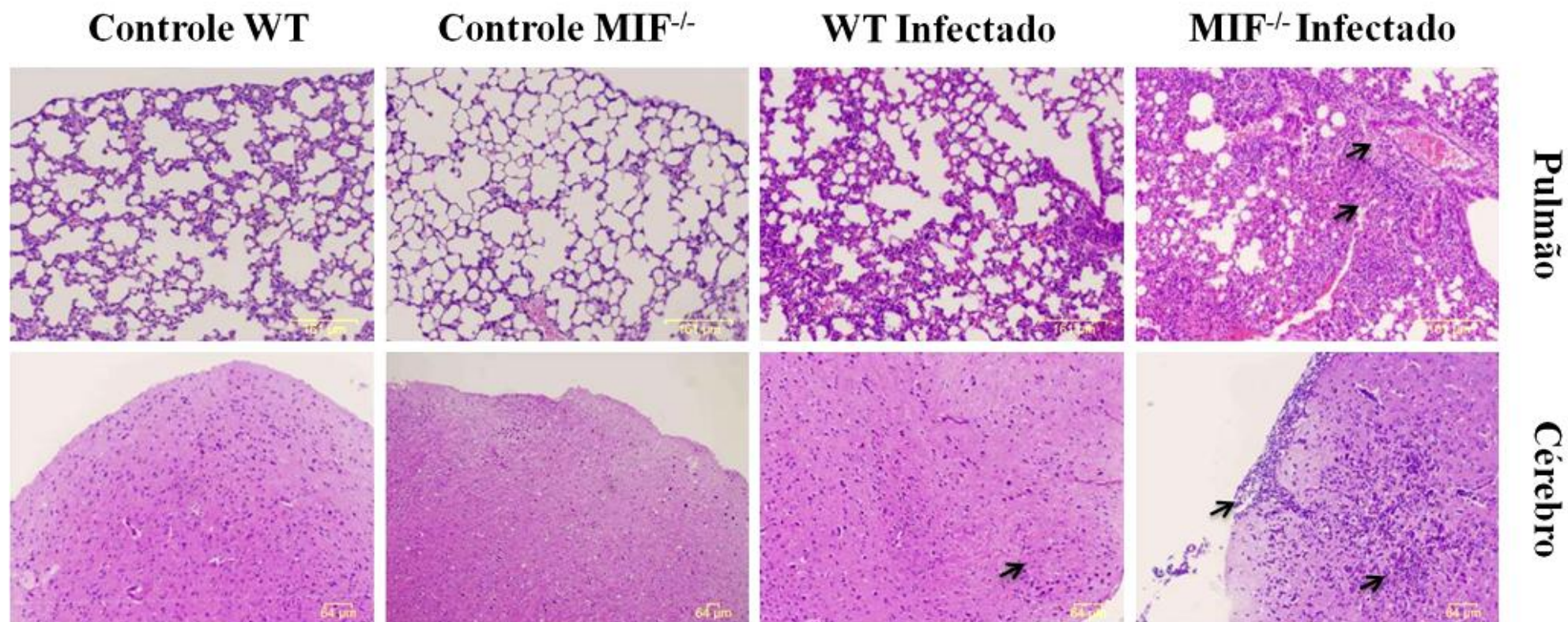


Figura 5. A ausência de MIF agrava o quadro inflamatório observado no pulmão, fígado e cérebro de camundongos durante a infecção por *Neospora caninum*. Análise histológica em amostras de tecido pulmonar após 7 dias de infecção e em amostras tecido do sistema nervoso central após 30 dias de infecção de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. As setas indicam locais com a presença de infiltrados inflamatórios.

5.3 Animais MIF^{-/-} apresentaram aumento na produção de TNF e óxido nítrico durante a infecção por *Neospora caninum*

Com o intuito de analisar o padrão de resposta celular induzido na ausência de MIF durante a infecção por *N. caninum*, foi avaliada a produção dos principais mediadores de uma resposta imune do tipo Th1, sendo eles IL-12p40, IFN- γ , TNF- α na fase aguda (Figura 6) e crônica (Figura 7) da infecção e também foi mensurada a produção de óxido nítrico (Figura 8). Foi encontrado um aumento significativo de TNF- α em amostras do lavado peritoneal de animais MIF^{-/-}, porém não observamos diferenças na produção desta citocina no pulmão, soro e cérebro. Também observamos que os níveis de IL-12p40 e IFN- γ não apresentaram alterações significativas em amostras de camundongos WT e MIF^{-/-}, tanto fase aguda quanto na fase crônica da infecção. Observamos também o aumento nos níveis de NO em camundongos MIF^{-/-} após 24 horas de infecção.

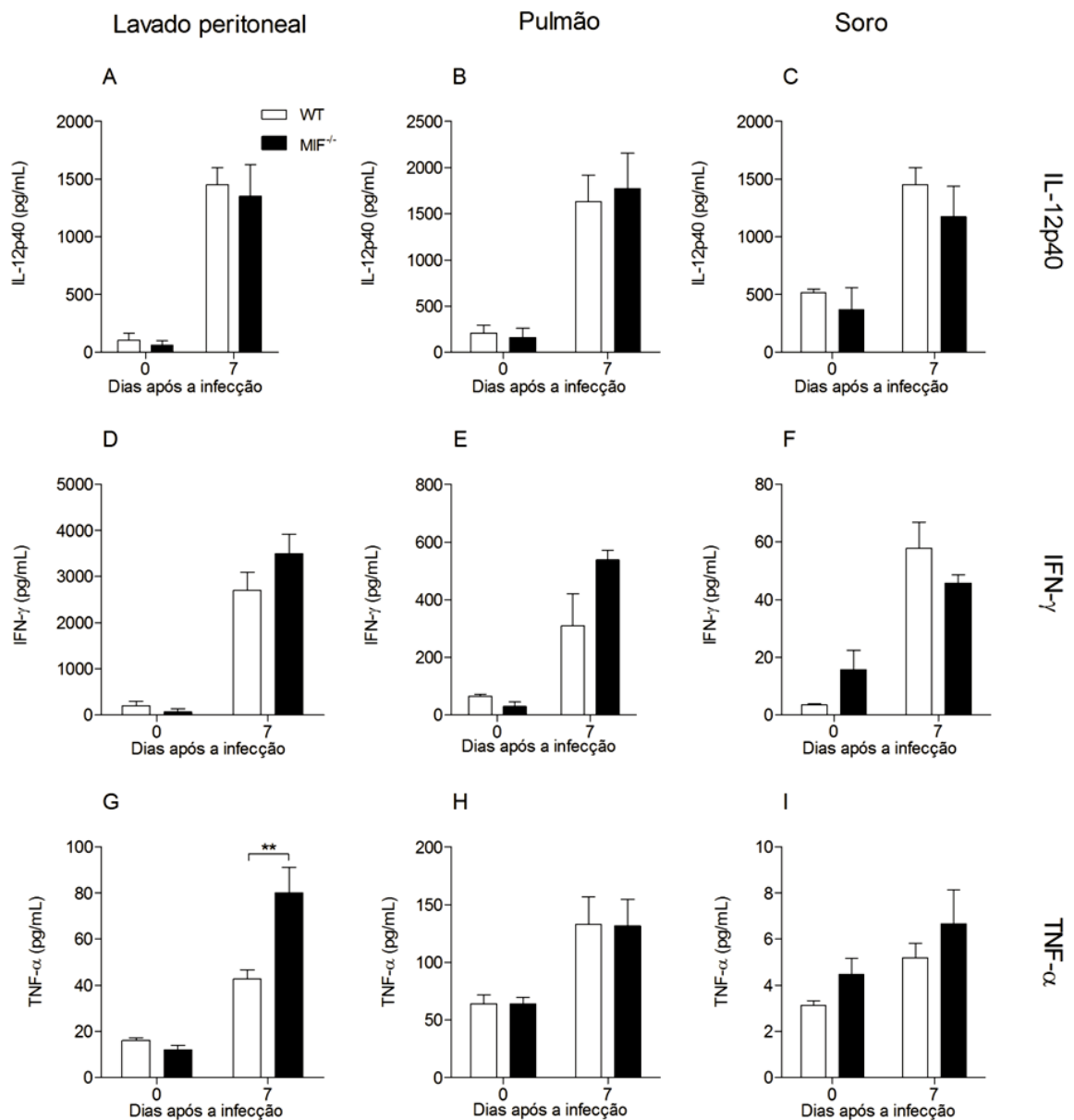


Figura 6. Produção diferencial de citocinas durante fase aguda da infecção com *N. caninum*. Camundongos WT e MIF^{-/-} foram infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*, sendo mensurado a quantidade de IL-12p40, IFN- γ e TNF- α em (A, D, G) lavado peritoneal, (B, E, H) homogenato de pulmão e (C, F, I) soro após 7 dias de infecção. Os dados foram obtidos a partir de reações de ELISA e CBA. Os valores são expressos como média e \pm SEM, ** $p < 0,001$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni).

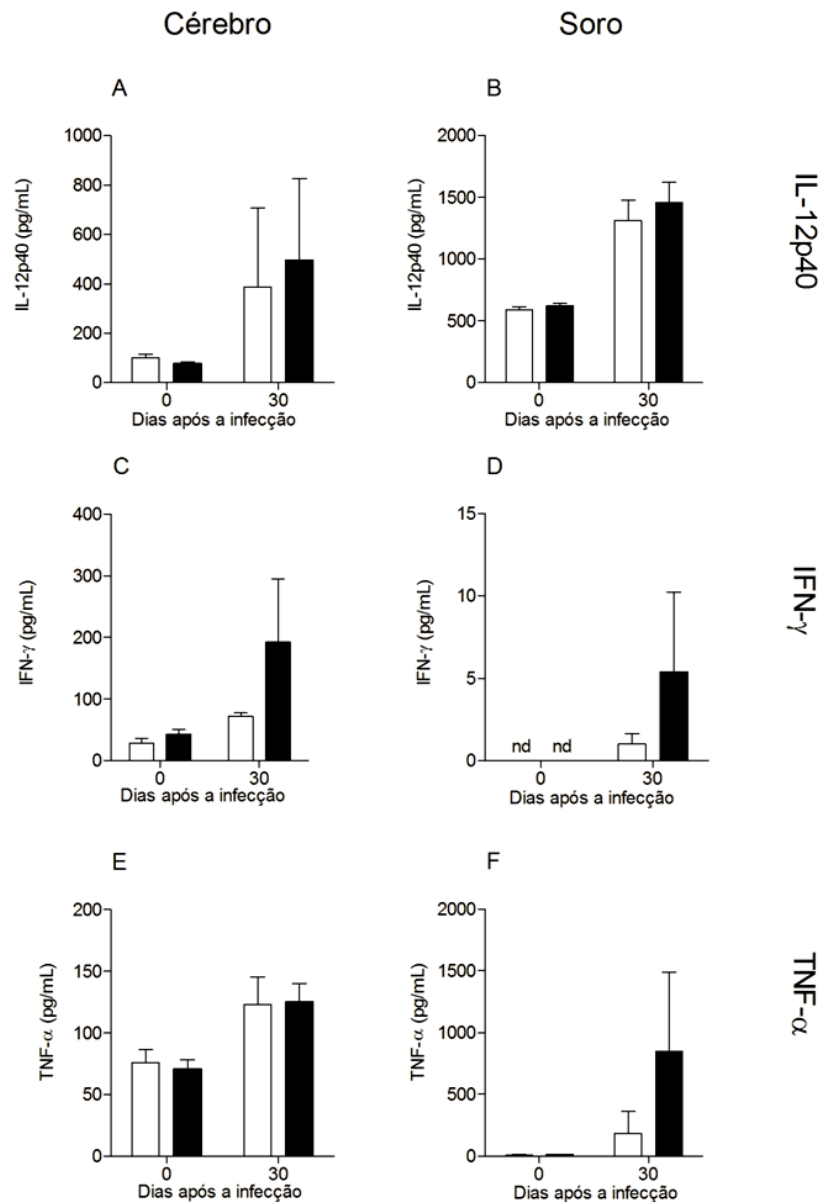


Figura 7. Produção diferencial de citocinas durante fase crônica da infecção com *N. caninum*. Camundongos WT e MIF^{-/-} foram infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*, sendo mensurada a quantidade de IL-12p40, IFN- γ e TNF- α em (A, C, E) homogenato de cérebro e (B, D, F) soro após 30 dias de infecção. Os dados foram obtidos a partir de reações de ELISA. Os valores são expressos como média e \pm SEM (Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni). Os dados não apresentaram diferenças significativas.

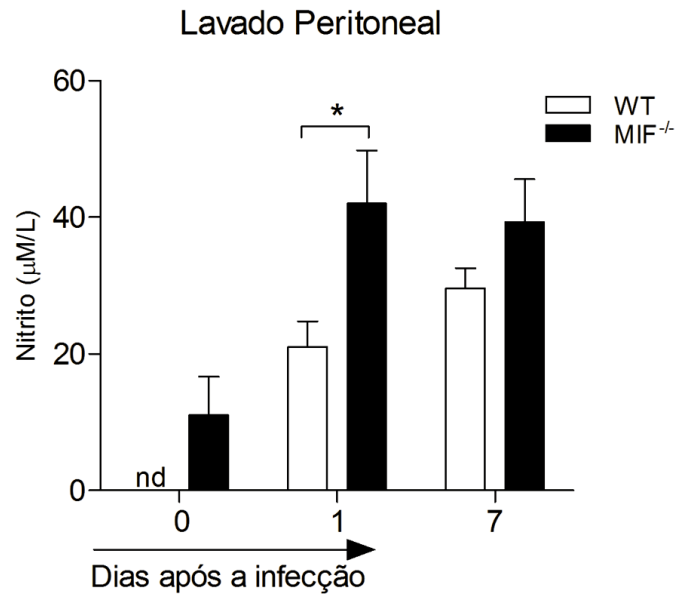


Figura 8. Produção diferencial de óxido nítrico na fase aguda da infecção por *N. caninum*. Amostras de lavado peritoneal foram obtidas de animais WT e MIF^{-/-} infectados por 24 horas e 7 dias com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. A análise da concentração de nitrito foi realizada por ensaio de Griess. Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0.05$ (Two Way Anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).

5.4 Secreção de MIF durante a infecção por *Neospora caninum* é parcialmente dependente do receptor I de TNF

Com o intuito de verificar vias de sinalização que influenciam a secreção de MIF durante a infecção por *N. caninum*, camundongos WT, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} e TNFRI^{-/-} foram infectados com dose sub-letal de taquizoítos de *N. caninum* (Figura 9). Após 7 dias de infecção, amostras de lavado peritoneal foram coletadas para dosagem da citocina MIF pela técnica de ELISA. Observou-se que a produção de MIF é independente da sinalização por moléculas adaptadoras responsáveis pela sinalização dos receptores do tipo *Toll* (TLR), uma vez que a concentração de MIF aumentou em camundongos MyD88^{-/-} e manteve-se intacta em animais TRIF^{-/-} durante a infecção por *N. caninum* (Figuras 9A e 9B). Já camundongos TNFRI^{-/-} produziram níveis reduzidos de MIF no peritônio após uma semana de infecção, evidenciando a participação desta via de sinalização na secreção da citocina em análise.

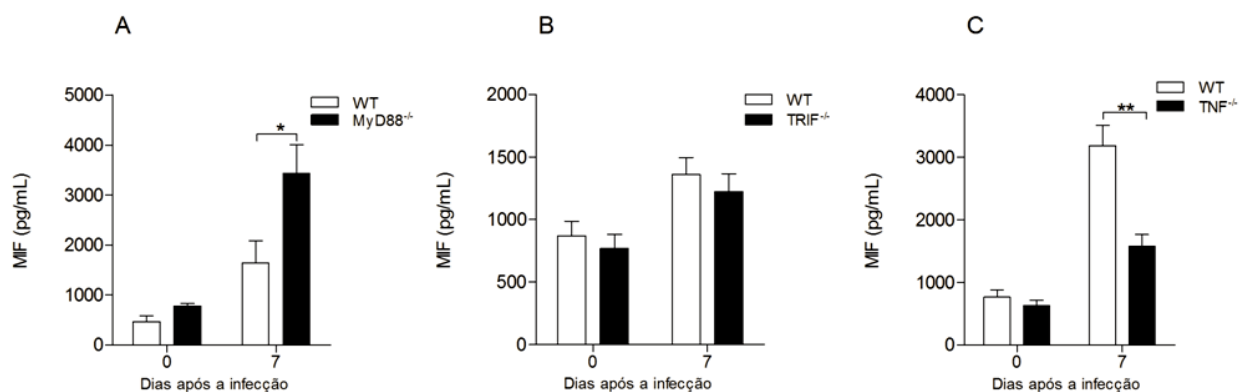


Figura 9. Vias de sinalização envolvidas na secreção de MIF durante a infecção por *Neospora caninum*. Animais WT, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} e TNFRI^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 5x10⁶ taquizoítos de *N. caninum* (Nc-Liv). Os níveis da citocina MIF foram mensurados em amostras de lavado peritoneal após 7 dias de infecção através da técnica de ELISA. Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM). *p<0.05, **p<0,001 (Two Way Anova seguido pelo pós teste de Bonferroni).

5.5 MIF não participa da produção de anticorpos IgG específicos para *Neospora caninum*

Objetivando verificar a cinética de reconhecimento de anticorpos antígeno-específicos durante a infecção por *N. caninum*, mensurou-se a presença de IgG e suas subclasses específicas para NLA em soros de camundongos WT e MIF^{-/-} durante diferentes dias de infecção (Figura 10). De forma geral, camundongos pertencentes aos dois grupos tiveram um pico de produção aumentado no décimo quinto dia e que se mantiveram até os 30 dias de infecção. Os grupos WT e MIF^{-/-} não apresentaram diferença significativa na produção de anticorpos IgG e suas subclasses ao longo do período analisado.

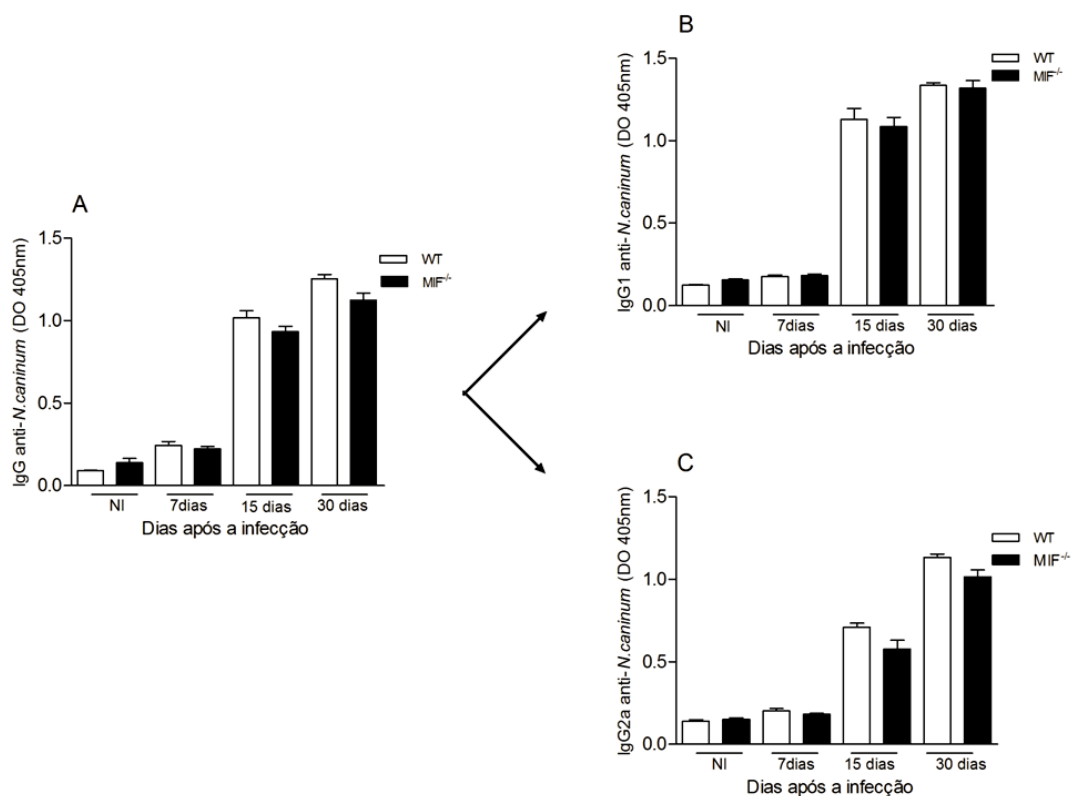


Figura 10. Cinética diferencial da produção de anticorpos IgG antígeno-específicos em camundongos infectados com *Neospora caninum*. Pela técnica de ELISA indireto foi analisado a sororreatividade para anticorpos (A) IgG total, (B) IgG1 e (C) IgG2a em animais WT e MIF^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-Liv). A produção de anticorpos foi mensurada até 30 dias após infecção em soros de ambos os grupos. Valores são indicados como densidade óptica (DO) a 405nm e expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM) (Two Way Anova seguido pelo pós teste de Bonferroni). Os dados entre animais WT e MIF^{-/-} não apresentaram diferenças significativas.

6 DISCUSSÃO

N. caninum é o causador da neosporose, e devido aos abortos que provoca em bovinos, causa grande impacto econômico em indústrias de corte e de leite podendo gerar por ano perdas de 2,4 bilhões de dólares. A alta prevalência e importância econômica da neosporose impulsiona o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes contra este parasito (REICHEL et al., 2014). Neste sentido, pesquisas se mostram necessárias para compreender a relação parasito-hospedeiro e elucidar o papel da resposta imune durante a infecção por *N. caninum*. Assim, o presente estudo buscou avaliar o papel da citocina MIF na modulação da resposta imune por *N. caninum*.

Fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pleiotrópica importante nas respostas inflamatórias envolvendo parasitos intracelulares. Estudos mostraram que esta citocina pode promover tanto um papel protetor quanto deletério na resposta imune contra diferentes patógenos (ROSADO JDE; RODRIGUEZ-SOSA, 2011). Vários trabalhos apontam a importância de MIF para a resistência do hospedeiro contra o *Toxoplasma gondii*, o qual possui uma ligeira relação com *N. caninum* (BOZZA et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2011; DUBEY, J. P.; CARPENTER; et al., 1988; FLORES et al., 2008). No entanto, há falta de trabalhos que demonstrem mecanismo ativado por MIF durante uma infecção por *N. caninum*.

O presente estudo avaliou a secreção de MIF em diferentes sítios durante a fase aguda e crônica da infecção por *N. caninum* e observou-se que sua concentração aumenta com a infecção e também com o tempo da infecção. Os resultados demonstram uma função moduladora de MIF durante uma infecção aguda por *N. caninum* em células e fluido da cavidade peritoneal, baço e pulmão. Tem sido observado em outros estudos, a presença de MIF não apenas em células do sistema imunitário, mas também em vários tecidos que estão em contato direto com o ambiente natural do hospedeiro. Uma característica notória e relevante é que MIF encontra-se pré-formada intracelularmente, o que a torna um importante fator nas respostas inflamatórias agudas e como um mediador central na imunidade inata contra diversos patógenos (CALANDRA; ROGER, 2003).

Durante o estudo, foi observado que animais MIF^{-/-} infectados com *N. caninum* apresentaram um ligeiro aumento na sobrevivência e perda de peso menos acentuada bem como uma diminuição da carga parasitária em ambas as fases aguda e crônica da doença, quando comparados com camundongos do tipo selvagem. Também, ao analisar a patologia do

pulmão e cérebro, observou-se que animais MIF^{-/-} apresentam maior inflamação nestes órgãos, sugerindo que o maior controle da infecção é dependente de um processo inflamatório mais intenso. Sabe-se que a alta produção de citocinas pró-inflamatórias reduz a multiplicação parasitária em tecidos de animais infectados (INNES et al., 2007), fato observado em nosso estudo. Em modelo de infecção por *Plasmodium chabaudi adami*, parasito protozoário intracelular causador da malária, Malu e colaboradores (2011) observaram que infecções por este parasito são mais eficientemente controladas em camundongos BALB/c deficientes para MIF ou neutralizados para esta citocina. Sendo também observada a indução significativa da secreção de MIF durante a infecção. Em um outro estudo com este mesmo parasito, foi observado níveis elevados de MIF no plasma, associando essa citocina com a gravidade da anemia, supressão da eritropoiese e aumento da mortalidade (MARTINEY et al., 2000). A partir desses resultados, pode-se deduzir que MIF desempenha um importante papel modulatório na resposta imune desencadeada por protozoários. Resultados distintos foram encontrados por Flores e colaboradores (2008) ao estudarem a função de MIF em infecções por *T. gondii*. Apesar de maiores danos serem encontrados no fígado de animais MIF^{-/-} do que em animais selvagens, eles observaram que animais BALB/c MIF^{-/-} foram mais suscetíveis à infecção pelas cepas RH e ME49 de *T. gondii*, além de animais WT apresentarem aumento de TNF- α , IL-12 e melhor atividade microbicida devido à produção de óxido nítrico. Cavalcanti e colaboradores (2011) encontraram resultados semelhantes aos encontrados por Flores e colaboradores (2008). Evidenciaram que camundongos C57BL/6 knockout para MIF infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* tiveram uma redução de citocinas TNF- α e IFN- γ com consequente diminuição da resposta inflamatória sistêmica e dos danos teciduais. Apesar dos resultados contraditórios encontrados, sabe-se que além de diferir-se em características de indução de patologias, *N. caninum* e *T. gondii* também se distinguem em suas interações com o hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013; INNES et al., 2007).

Adicionalmente, estudos mostram que MIF participa na regulação de citocinas envolvidas em infecções por parasitas intracelulares (ROSADO JDE; RODRIGUEZ-SOSA, 2011). Os nossos resultados mostram que a produção das citocinas IL-12 e IFN- γ não foram significativamente diferentes entre animais WT e deficientes em MIF. No entanto, verificou-se que a produção de TNF- α foi significativamente aumentada associada com um aumento da produção de NO em animais MIF^{-/-}. Estes resultados explicam o aumento da inflamação pulmonar e cerebral encontrada em animais deficientes para MIF. Adicionalmente, o presente estudo avaliou possíveis vias relacionadas a secreção de MIF e observou-se que as proteínas

adaptadoras dos TLRs, MyD88 e TRIF, não são necessárias para a produção da citocina. Sabe-se que para a indução eficiente da resposta Th1 em infecções contra *N. caninum*, a molécula adaptadora MyD88 é ativada por TLR2 em células apresentadoras de antígeno, que por sua vez produzem IL-12p40, elevando os níveis de IFN- γ (MINEO et al., 2010).

Estudos evidenciam que MIF é liberada de macrófagos quando estimulados por LPS, IFN- γ e TNF- α (CALANDRA et al., 1994). O presente estudo demonstra essa relação em animais TNFR1^{-/-} infectados com *N. caninum* que apresentaram redução de MIF, mostrando que a liberação desta citocina é dependente de TNF- α . Já em animais deficientes em MIF há um aumento de TNF- α , demonstrando que a produção de TNF- α não é dependente de MIF. Provavelmente, este aumento de TNF- α pode ser um mecanismo compensatório para estimular MIF na ausência de sua expressão. Em trabalhos prévios demonstrado por Mineo e colaboradores (2010), a produção de TNF- α está relacionada com a ativação de TLR2/MyD88, em que o uso de animais deficientes para MyD88 e para TLR2 após a infecção resultou em uma baixa produção desta citocina, na resistência do hospedeiro contra a infecção por *N. caninum*.

Além disso, MIF pode ser endocitado e translocado através da membrana endossomal e ativar a cascata de fosforilação da via de sinalização por quinase reguladora do sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) e promover a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) (LUE et al., 2002; MITCHELL et al., 1999). Também já foi evidenciado que MIF é capaz de desencadear a fosforilação da MAPK p38 (TERRAZAS et al., 2011). Em estudos prévios foi demonstrado que camundongos infectados com *T. gondii* produziram altos níveis de PGE₂ e que esta produção estava envolvida com o aumento da carga parasitária e inibição de citocinas IL-6 e TNF- α (ABDALLA et al., 2008). Nesse sentido, nossos resultados pressupõem que provavelmente a via de sinalização ERK1/2 em animais MIF^{-/-} não é ativada, consequentemente PGE₂ não é produzida o que permite o aumento de TNF- α associado a um aumento de NO e controle da infecção por *N. caninum*. 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 (LANGERMANS et al., 1992; SIBLEY et al., 1991; YAROVINSKY, 2014).

Em um estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2014) foi verificado a sinalização intracelular desencadeada por MIF em um modelo de células trofoblásticas infectados com *T. gondii*. Eles mostraram que baixos níveis de MIF ativa a fosforilação de ERK1 / 2 e aumenta a produção de PGE₂. Além disso, a PGE₂ foi identificado como uma

causa importante de imunossupressão, sendo um fator importante para a persistência de *T. gondii* na interface materno-fetal. No entanto, o controle do parasitismo ocorreu apenas em concentrações elevadas de MIF, demonstrando que o controle da infecção é dose-dependente da citocina MIF.

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; MATTSSON, 2007). Apesar de TNF- α estar elevado em animais MIF^{-/-}, o presente estudo não observou diferenças na produção de anticorpos entre os grupos estudados.

Estudos anteriores têm descrito proteínas semelhantes à MIF tanto em relação à estrutura quanto a função em protozoários tais como *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii* e *N. caninum*, e parecem ser responsável por evasão e regulação imunológica (ALAM et al., 2011; KAMIR et al., 2008; SOMMERVILLE et al., 2013). Miller e colaboradores (2012) observaram o homólogo de MIF para *Plasmodium yoelli* (PyMIF) em todo o ciclo de vida do parasito. PyMIF parece ser importante para o desenvolvimento do parasito na fase que infecta o fígado do hospedeiro. Já Sun e colaboradores (2012), demonstraram que em pacientes infectados com *Plasmodium spp.*, MIF do parasito é detectável na circulação e sua quantidade no hospedeiro relaciona-se com a parasitemia, quantidade de MIF humano e níveis de citocina. Adicionalmente, foi demonstrado por Sommerville e colaboradores (2013) que *T. gondii* possui proteínas semelhantes à MIF no seu genoma que podem modular as respostas imunes do hospedeiro e manter sua sobrevivência. A produção de recombinante TgMIF facilitou um melhor entendimento desta proteína. Desse modo, foi demonstrado que TgMIF estimula a via ERK/MAPK para induzir a produção de IL-8 e recrutamento de neutrófilos, que servem para limitar a gravidade da infecção, mas também facilitam a disseminação do parasito para tecidos e término do ciclo de vida. Em relação ao *N. caninum*, Qu e colaboradores (2013) foram os primeiros a caracterizarem MIF deste protozoário (NcMIF) e observaram alta similaridade (87%) com MIF de *T. gondii* (TgMIF). Nenhum NcMIF recombinante apresentou atividade de tautomerase e oxirredutase. A ausência de atividade pode ser devido a deficiência de ligação de NcMIF ao receptor CD74. A produção diferencial de NcMIF por isolados de *N. caninum* sugere que esta molécula seja mediadora das interações parasito-hospedeiro. Também, em ensaio de imunomicroscopia observou-se a presença de NcMIF em roptrias, micronema e grânulos densos, além de ser encontrado em preparações de antígeno excretado e secretado reforçando o possível papel desta molécula como moduladora

da resposta imune do hospedeiro. Os resultados do presente estudo evidenciam uma modulação por MIF do hospedeiro na resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *N. caninum*, promovendo aumento na carga parasitária, favorecendo o curso da infecção. Possivelmente, a proteína MIF do parasito pode desempenhar um papel na progressão da parasitemia e na evasão da resposta imune do hospedeiro (RICHARDSON et al., 2009).

Assim, os resultados presentes neste trabalho sugerem que MIF apresenta um papel modulador relevante, sendo importante para o curso da infecção por *N. caninum*. No entanto, pesquisas ainda são necessárias para melhor elucidar o papel MIF na resposta imune desencadeada por *N. caninum*.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- MIF modula negativamente a resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *N. caninum*, promovendo aumento na carga parasitária;
- *N. caninum* induz a secreção de MIF durante a infecção;
- A citocina MIF regula negativamente TNF- α e NO frente à infecção por *N. caninum*;
- Não há envolvimento das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF na secreção de MIF;
- A concentração de MIF nos sítios de infecção é parcialmente dependente da via de sinalização de TNFRI;
- A citocina MIF não mostrou influência na produção de anticorpos IgG e suas subclasses específicas a antígenos solúveis de *N. caninum*.



Referências

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E.; SILVA, K. T.; CASTRO, E. C.; REIS, M. A.; MICHELIN, M. A. Trypanosoma cruzi: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. **Experimental parasitology**, v. 118, n. 4, p. 514-21, Apr 2008.
- ALAM, A.; GOYAL, M.; IQBAL, M. S.; BINDU, S.; DEY, S.; PAL, C.; MAITY, P.; MASCARENHAS, N. M.; GHOSHAL, N.; BANDYOPADHYAY, U. Cysteine-3 and cysteine-4 are essential for the thioredoxin-like oxidoreductase and antioxidant activities of Plasmodium falciparum macrophage migration inhibitory factor. **Free radical biology & medicine**, v. 50, n. 11, p. 1659-68, Jun 1 2011.
- AWANDARE, G.A.; OUMA, Y.; OUMA, C. Role of mono-cyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. **Infect Immun**, 2007. 75(1): 201-10.
- BARBER, J. S.; HOLMDAHL, O. J.; OWEN, M. R.; GUY, F.; UGGLA, A.; TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of Neospora caninum (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Ugglá). **Parasitology**, v. 111 (Pt 5), p. 563-8, Dec 1995.
- BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W.; FERRO, E. A. Susceptibility to Toxoplasma gondii proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-62, Mar 2014.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the nonhuman primate. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 71, n. 2, p. 236-42, Aug 1994.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-4, 1984.
- BLOOM, B. R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**, v. 153, n. 3731, p. 80-2, Jul 1966.

BOZZA, M. T.; MARTINS, Y. C.; CARNEIRO, L. A.; PAIVA, C. N. Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 413052, 2012.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-52, Dec 2002.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 4, p. 535-44, Apr 2006.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; MITCHELL, R. A.; BUCALA, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 6, p. 1895-902, Jun 1 1994.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 10, p. 791-800, Oct 2003.

CARVALHO, J.V.; ALVES, C.M.; CARDOSO, M.R. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol**, 2010. 40(14): 1629-37.

CASTRO, A. S.; ALVES, C. M.; ANGELONI, M. B.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; SILVA, D. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W.; FERRO, E. A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240-7, Mar 2013.

CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J. S.; MADI, K.; FEIJO, D. F.; ASSUNCAO-MIRANDA, I.; SOUZA, H. S.; BOZZA, M. T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25259, 2011.

CHSAVANEEYAKORN, S.; MOORE, J. M.; OTHORO, C.; OTIENO, J.; CHAIYAROJ, S. C.; SHI, Y. P.; NAHLEN, B. L.; LAL, A. A.; UDHAYAKUMAR, V. Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 9, p. 1371-5, Nov 1 2002.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-8, Apr 2002.

DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 56, p. 72-7, 1966.

DE OLIVEIRA GOMES, A.; DE OLIVEIRA SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; DE FREITAS BARBOSA, B.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU, L. R.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 6, p. 2792-801, Jun 2011.

DEMIR, Y.; CHEN, Y.; METZ, C.; RENZ, H.; HEEGER, P. S. Cardiac allograft rejection in the absence of macrophage migration inhibitory factor. **Transplantation**, v. 76, n. 1, p. 244-7, Jul 15 2003.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; SLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-38, Aug 2015.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, 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.; MODRY, 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, n. 8, p. 929-46, Jul 2002.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, May 1 1988.

DUBEY, J. P.; DE LAHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied parasitology**, v. 34, n. 4, p. 229-33, Nov 1993.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-63, Nov 15 1988.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology today**, v. 9, n. 12, p. 452-8, Dec 1993.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 5, p. 709-13, Sep 1 1992.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, Aug 4 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-67, Apr 2007.

DUBEY, S.; ROULIN, A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 3, p. 327-38, May 2014.

FERNANDES, A.A.; CARVALHO, L.J.; ZANNINI, G.M. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. **Clin Vaccine Immunol**, 2008. 15(4): 650-8.

FERRO, E. A.; MINEO, J. R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D. A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L. R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 1, p. 50-8, Jan 2008.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E. P.; LENG, L.; SANCHEZ, Y.; JUAREZ, I.; SATOSKAR, A. A.; SHENOY, A. S.; TERRAZAS, L. I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 10, p. 3661-71, Oct 2008.

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-61, Feb 2004.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and**

Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, v. 13, p. 133-150, 2013.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and experimental medicine**, v. 3, n. 2, p. 84-105, Sep 2003.

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.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 3, p. 261-78, Sep 2006.

HUDSON, J. D.; SHOAIBI, M. A.; MAESTRO, R.; CARNERO, A.; HANNON, G. J.; BEACH, D. H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 10, p. 1375-82, Nov 15 1999.

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E.; BUXTON, D. Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5495-503, Jul 26 2007.

INNES, E. A.; MATTSSON, J. G. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 2, p. 43-4; discussion 44-5, Feb 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, n. 1-2, p. 29-36, Oct 18 2005.

KAMIR, D.; ZIEROW, S.; LENG, L.; CHO, Y.; DIAZ, Y.; GRIFFITH, J.; MCDONALD, C.; MERK, M.; MITCHELL, R. A.; TRENT, J.; CHEN, Y.; KWONG, Y. K.; XIONG, H.; VERMEIRE, J.; CAPPELLO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; WALKER, J.; BERNHAGEN, J.; LOLIS, E.; BUCALA, R. A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. **Journal of immunology**, v. 180, n. 12, p. 8250-61, Jun 15 2008.

KIM, Y. G.; HUANG, X. R.; SUGA, S.; MAZZALI, M.; TANG, D.; METZ, C.; BUCALA, R.; KIVLIGHN, S.; JOHNSON, R. J.; LAN, H. Y. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in experimental uric acid nephropathy. **Molecular medicine**, v. 6, n. 10, p. 837-48, Oct 2000.

KING, J. S.; JENKINS, D. J.; ELLIS, J. T.; FLEMING, P.; WINDSOR, P. A.; SLAPETA, J. Implications of wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in Australia. **Veterinary journal**, v. 188, n. 1, p. 24-33, Apr 2011.

KLEEMANN, R.; RORSMAN, H.; ROSENGREN, E.; MISCHKE, R.; MAI, N. T.; BERNHAGEN, J. Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 24, p. 7183-93, Dec 2000.

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN FURTH, R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. **Journal of immunology**, v. 148, n. 2, p. 568-74, Jan 15 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1597-604, May 15 2004.

LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. **Parasitology research**, v. 76, n. 7, p. 559-62, 1990.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-33, May 1999.

LUE, H.; KLEEMANN, R.; CALANDRA, T.; ROGER, T.; BERNHAGEN, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 4, p. 449-60, Apr 2002.

MAASER, C.; ECKMANN, L.; PAESOLD, G.; KIM, H. S.; KAGNOFF, M. F. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. **Gastroenterology**, v. 122, n. 3, p. 667-80, Mar 2002.

MALU, D. T.; BELANGER, B.; DESAUTELS, F.; KELENDJI, K.; DALKO, E.; SANCHEZ-DARDON, J.; LENG, L.; BUCALA, R.; SATOSKAR, A. R.; SCORZA, T. Macrophage migration inhibitory factor: a downregulator of early T cell-dependent IFN-gamma responses in *Plasmodium chabaudi adami* (556 KA)-infected mice. **Journal of immunology**, v. 186, n. 11, p. 6271-9, Jun 1 2011.

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, n. 6, p. 1124-31, Feb 1 2012.

MARCAIS, A.; VIEL, S.; GRAU, M.; HENRY, T.; MARVEL, J.; WALZER, T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 450, 2013.

MARTINEY, J. A.; SHERRY, B.; METZ, C. N.; ESPINOZA, M.; FERRER, A. S.; CALANDRA, T.; BROXMEYER, H. E.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 2259-67, Apr 2000.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-8, Sep 1998.

MCDEVITT, M. A.; XIE, J.; SHANMUGASUNDARAM, G.; GRIFFITH, J.; LIU, A.; MCDONALD, C.; THUMA, P.; GORDEUK, V. R.; METZ, C. N.; MITCHELL, R.; KEEFER, J.; DAVID, J.; LENG, L.; BUCALA, R. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 5, p. 1185-96, May 15 2006.

MERK, M.; BAUGH, J.; ZIEROW, S.; LENG, L.; PAL, U.; LEE, S. J.; EBERT, A. D.; MIZUE, Y.; TRENT, J. O.; MITCHELL, R.; NICKEL, W.; KAVATHAS, P. B.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. **Journal of immunology**, v. 182, n. 11, p. 6896-906, Jun 1 2009.

MEYER-SIEGLER, K. L.; VERA, P. L. Substance P induced changes in CD74 and CD44 in the rat bladder. **The Journal of urology**, v. 173, n. 2, p. 615-20, Feb 2005.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988.

MILLER, J. L.; HARUPA, A.; KAPPE, S. H.; MIKOLAJCZAK, S. A. *Plasmodium yoelii* macrophage migration inhibitory factor is necessary for efficient liver-stage development. **Infection and immunity**, v. 80, n. 4, p. 1399-407, Apr 2012.

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.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 352-5, Dec 15 2011.

MINEO, T. W.; OLIVEIRA, C. J.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and cell biology**, v. 88, n. 8, p. 825-33, Nov-Dec 2010.

MINEO, T. W.; BENEVIDES, L.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Vet. Res.**, v. 40, n. 4, p. 32, Jul-Aug 2009.

MITCHELL, R. A.; METZ, C. N.; PENG, T.; BUCALA, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 25, p. 18100-6, Jun 18 1999.

MOORE, D. P.; ECHAIDE, I.; VERNA, A. E.; LEUNDA, M. R.; CANO, A.; PEREYRA, S.; ZAMORANO, P. I.; ODEON, A. C.; CAMPERO, C. M. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Veterinary parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 245-51, Feb 10 2011.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 269-85, Mar 2011.

NAKAAR, V.; NGO, H. M.; AARONSON, E. P.; COPPENS, I.; STEDMAN, T. T.; JOINER, K. A. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 11, p. 2311-20, Jun 1 2003.

QU, G.; FETTERER, R.; JENKINS, M.; LENG, L.; SHEN, Z.; MURPHY, C.; HAN, W.; BUCALA, R.; TUO, W. Characterization of *Neospora caninum* macrophage migration inhibitory factor. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 246-56, Oct 2013.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum*--how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International journal for parasitology**, v. 39, n. 11, p. 1173-87, Sep 2009.

REICHEL, M. P.; MCALLISTER, M. M.; POMROY, W. E.; CAMPERO, C.; ORTEGA-MORA, L. M.; ELLIS, J. T. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1455-70, Sep 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, n. 19, p. 2570-9, Apr 28 2009.

RICHARDSON, J. M.; MORRISON, L. S.; BLAND, N. D.; BRUCE, S.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C.; WALKINSHAW, M. D. Structures of *Leishmania* major orthologues of macrophage migration inhibitory factor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 380, n. 3, p. 442-8, Mar 13 2009.

ROBERT-GANGNEUX, F.; KLEIN, F. Serologic screening for *Neospora caninum*, France. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 6, p. 987-9, Jun 2009.

ROGER, T.; DAVID, J.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 920-4, Dec 20-27 2001.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; BLANCO-MURCIA, J.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary research**, v. 40, n. 5, p. 49, Sep-Oct 2009.

ROSADO JDE, D.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. **International journal of biological sciences**, v. 7, n. 9, p. 1239-56, 2011.

SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; FUKUTOMI, Y.; KRAHENBUHL, J. L. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. **Journal of immunology**, v. 147, n. 7, p. 2340-5, Oct 1 1991.

SINAI, A. P.; WEBSTER, P.; JOINER, K. A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. **Journal of cell science**, v. 110 (Pt 17), p. 2117-28, Sep 1997.

SOMMERVILLE, C.; RICHARDSON, J. M.; WILLIAMS, R. A.; MOTTRAM, J. C.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J.; HENRIQUEZ, F. L. Biochemical and immunological

characterization of *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12733-41, May 3 2013.

SUN, H. W.; SWOPE, M.; CINQUINA, C.; BEDARKAR, S.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R.; LOLIS, E. The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. **Protein engineering**, v. 9, n. 8, p. 631-5, Aug 1996.

SUZUKI, H.; KANAGAWA, H.; NISHIHIRA, J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. **Immunology letters**, v. 51, n. 3, p. 141-7, Jul 1996.

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**, v. 208, n. 3-4, p. 150-8, Mar 15 2015.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, Nov 2000.

TERRAZAS, C. A.; HUITRON, E.; VAZQUEZ, A.; JUAREZ, I.; CAMACHO, G. M.; CALLEJA, E. A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK. **International journal of biological sciences**, v. 7, n. 9, p. 1298-310, 2011.

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, n. 2, p. 655-63, Feb 2013.

WAEBER, G.; CALANDRA, T.; RODUIT, R.; HAEFLIGER, J. A.; BONNY, C.; THOMPSON, N.; THORENS, B.; TEMLER, E.; MEINHARDT, A.; BACHER, M.; METZ, C. N.; NICOD, P.; BUCALA, R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4782-7, Apr 29 1997.

WEBER, F. H.; JACKSON, J. A.; SOBECKI, B.; CHOROMANSKI, L.; OLSEN, M.; MEINERT, T.; FRANK, R.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 20, n. 1, p. 99-105, Jan 2013.

WEISER, W. Y.; TEMPLE, P. A.; WITEK-GIANNOTTI, J. S.; REMOLD, H. G.; CLARK, S. C.; DAVID, J. R. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 19, p. 7522-6, Oct 1989.

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, n. 2-3, p. 136-44, Feb 1 2012.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; ELLIS, J.; BJORKMAN, C.; REICHEL, M. P.; TREES, A. J. Immunization of cattle with live tachyzoites of Neospora caninum confers protection against fetal death. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1343-8, Mar 2007.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109-21, Feb 2014.



ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 087/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 052/12

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

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

.

Uberlândia, 26 de Setembro de 2012

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