



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



**PAPEL DO ADAPTADOR INDUTOR DE INTERFERON- β CONTENDO DOMÍNIO
TIR (TRIF) NA RESISTÊNCIA DE CAMUNDONGOS
A INFECÇÃO POR *Neospora caninum***

VANESSA DOS SANTOS MIRANDA

Uberlândia – MG

Fevereiro - 2016



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



**PAPEL DO ADAPTADOR INDUTOR DE INTERFERON- β CONTENDO DOMÍNIO TIR
(TRIF) NA RESISTÊNCIA DE CAMUNDONGOS
A INFECÇÃO POR *Neospora caninum***

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Vanessa dos Santos Miranda
Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

UBERLÂNDIA – MG
2016

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

- M672p Miranda, Vanessa dos Santos, 1992-
2016 Papel do adaptador indutor de Interferon-β contendo domínio TIR
(TRIF) na resistência de camundongos a infecção por Neospora
caninum / Vanessa dos Santos Miranda. - 2016.
 79 f.
- 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 - Teses. 3. Imunidade - Teses.
4. Receptores de células - 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



ICBIM

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



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



Vanesssa dos Santos Miranda

"PAPEL DO ADAPTADOR INDUTOR DE INTERFERON- β CONTENDO DOMÍNIO TIR (TRIF) NA RESISTÊNCIA DE CAMUNDONGOS A INFECÇÃO POR *Neospora caninum*"

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 19 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Djalma de Souza Lima Junior – USP

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU

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

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado condições de lutar e oportunidades de alcançar os objetivos pretendidos, por me guiar e estar sempre presente na minha vida;

A meus pais, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para que eu conseguisse realizar meus sonhos, me ensinaram a ter valores e a valorizar tudo que eles puderam me proporcionar e ao meu irmão, sempre meu amigo e companheiro;

Ao meu esposo Gustavo, que se manteve presente nos momentos difíceis me dando força, apoio e sendo sempre muito compreensivo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Mineo por participar ativamente do meu processo de aprendizado, com valiosos conselhos que me fizeram ter mais vontade de prosseguir na pesquisa científica;

A Profª Fernanda Maria Santiago, pelos anos de amizade, confiança e por ter me ensinado as primeiras técnicas laboratoriais;

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, por ter sido o primeiro a me abrir as portas do laboratório de Imunologia e me dar oportunidades de continuar;

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, Mylla, Flávia, Caroline, Cristina, Murilo, Eliézer, Tamires, Lydiane, Vanessa Resende, Patrício, Mariana, Maraísa, Silas, Vinicius e Carol Salomão, pelos conhecimentos compartilhados e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e os momentos difíceis mais toleráveis;

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Ana Cláudia, Marley e Zilda e ao secretário Max, pela boa vontade em sempre nos ajudar;

Às agências financeiras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste trabalho e pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	<i>Neospora caninum</i> e seus hospedeiros.....	11
1.2	Morfologia e ciclo biológico.....	11
1.3	Patogênese e sinais clínicos	14
1.4	Controle da neosporose.....	16
1.5	Resposta imune	17
1.6	Molécula indutora de interferon- β com domínio TIR (TRIF) e sua via de sinalização.....	19
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Experimentos <i>in vitro</i>	29
4.1.1	Manutenção de células HeLa e taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>	29
4.1.2	Obtenção de camundongos.....	29
4.1.3	Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)	30
4.1.4	Extração de RNA celular para ensaios de expressão gênica.....	30
4.1.5	Síntese do cDNA por transcrição reversa	31
4.1.6	PCR em tempo real (qPCR) para análise de expressão gênica	32
4.1.7	Parasitismo <i>in vitro</i> por Citometria de Fluxo	33
4.1.8	Tratamento de BMDMs com as citocinas recombinantes IFN- α e IFN- β e estímulo com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	33
4.2	Experimentos <i>in vivo</i>	34

4.2.1 Delineamento experimental.....	34
4.2.2 Homogenato de órgãos.....	34
4.2.3 Quantificação de citocinas	35
4.2.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO).....	36
4.2.5 ELISA indireto para IgG e suas subclasses anti- <i>N. caninum</i>	36
4.2.6 <i>Western blotting</i>	37
4.2.7 PCR em tempo real para análise do parasitismo tecidual	38
4.2.8 Análise histopatológica	39
4.2.9 Ensaio de Sobrevida.....	39
4.3 Análise estatística.....	39
4.4 Normas de Biossegurança.....	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Macrófagos TRIF ^{-/-} apresentam a expressão gênica reduzida de TRIF, IFN- α e IFN- β quando comparados a BMDMs WT.....	42
5.2 TRIF atua como um importante modulador da produção de citocinas em macrófagos infectados com <i>Neospora caninum</i>	44
5.3 O tratamento de macrófagos TRIF ^{-/-} com IFN- α reestabelece a produção de IL-12p40 na infecção por <i>N. caninum</i>	46
5.4 TRIF é importante para indução de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 e produção de anticorpos IgG anti- <i>N. caninum in vivo</i>	49
5.5 A presença de TRIF limita a replicação parasitária e a inflamação tecidual	55
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO 1 – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal.....	79

RESUMO

Neospora caninum é um parasito intracelular que tem como hospedeiro definitivo o cão e outros mamíferos, especialmente bovinos, como hospedeiros intermediários. Economicamente, a neosporose é uma doença de grande importância na medicina veterinária por induzir relevantes sinais clínicos, como abortos em bovinos e paralisia neuromuscular em cães. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da molécula adaptadora TRIF da via de sinalização dos TLRs na resistência contra a infecção por *N. caninum*. Para isso, experimentos *in vitro* com macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) obtidos de camundongos do tipo selvagem (WT) e TRIF knockout ($\text{TRIF}^{-/-}$) estimulados com taquizoítos e infecções *in vivo* foram realizadas a fim de se investigar a produção de citocinas e anticorpos, parasitismo celular e tecidual, alterações histológicas durante diferentes fases da infecção e análise de sobrevida. Nós observamos que BMDMs $\text{TRIF}^{-/-}$ apresentaram reduções significativas na produção de citocinas inflamatórias em relação a macrófagos WT. Adicionalmente, foi visto que as concentrações de NO, IL-12p40, IFN- γ e TNF foram diminuídas no lavado peritoneal e nos pulmões de camundongos $\text{TRIF}^{-/-}$, enquanto que IL-2, IFN- γ , TNF e IL-17 foram reduzidas no soro desses animais em comparação aos WT. Alta carga parasitária foi encontrada nas células peritoneais, pulmões e cérebro durante as fases aguda e crônica da infecção, associada com alterações teciduais inflamatórias significativas nos pulmões. Além disso, camundongos $\text{TRIF}^{-/-}$ tiveram uma taxa de sobrevida 2 vezes menor quando comparada aos animais WT. Concluindo, nossos resultados mostram que TRIF é requerido para a resistência contra a infecção induzida por *N. caninum*, regulando a produção de citocinas chave do perfil Th1 de resposta imune e participando no controle do parasitismo tecidual e das lesões inflamatórias oriundas desta infecção.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, TRIF, resposta imune inata, TLRs, via de sinalização.

ABSTRACT

Neospora caninum is an intracellular parasite that has the dog as its definitive host and other mammals, especially cattle, as intermediate hosts. Economically, neosporosis is an important disease in Veterinary medicine due to the induction of relevant clinical signs, as abortions in cattle and neuromuscular paralysis in dogs. The aim of this study was to evaluate the role of the TLR adaptor protein TRIF in the resistance against *N. caninum* infection. For this, *in vitro* experiments with bone marrow derived macrophages (BMDMs) from C57BL/6 wild-type (WT) and TRIF knockout ($\text{TRIF}^{-/-}$) mice, stimulated by tachyzoites and *in vivo* infections, were performed in order to investigate the production of cytokines and antibodies, cellular and tissue parasitism, histological changes during different phases of infection and survival analysis. We observed that $\text{TRIF}^{-/-}$ BMDMs presented notable defects in inflammatory cytokine production in relation to WT macrophages. Additionally, we found that the concentration of NO, IL-12p40, IFN- γ and TNF were decreased in peritoneal fluids and lungs of $\text{TRIF}^{-/-}$ mice, while IL-2, IFN- γ , TNF and IL-17 were reduced in sera of these animals compared to WT mice. Higher parasite burden was observed in peritoneal cells, lungs and brain during the acute and chronic phases of infection, which were associated with inflammatory changes in the analyzed tissues, while $\text{TRIF}^{-/-}$ mice survival rate decreased 2-fold compared to WT. In conclusion, our results show that TRIF is required for resistance against the infection induced by *N. caninum*, regulating the production of key Th1 cytokines and participating in the control of the tissue parasitism and inflammatory lesions induced against the parasite.

Key-words: *Neospora caninum*, TRIF, Innate immune response, TLRs, Signaling pathway.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum* e seus hospedeiros

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa e é o agente causador da neosporose. Canídeos têm sido descritos como seus hospedeiros definitivos - por exemplo, cães, coiotes, lobos e dingos australianos, enquanto bovinos, ovinos, caprinos, veados, cavalos, búfalos asiáticos e outras espécies de sangue quente agem como seus hospedeiros intermediários (KING et al., 2010; ALMERIA; LOPEZ-GATIUS, 2013; DUBEY et al., 2011; REICHEL et al., 2013; DONAHOE et al., 2015; REICHEL et al., 2015; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

Neospora caninum está intimamente relacionado com o parasito *Toxoplasma gondii*, e tem sido estudado nas últimas décadas por ser uma das principais causas de doença neuromuscular em cães e repetidos abortos em bovinos, gerando grandes perdas econômicas em setores de corte e de leite (REICHEL et al., 2013). A espécie *N. caninum*, foi descrita primeiramente em 1984 em cães com encefalomielite severa que não possuíam anticorpos contra *T. gondii*. Não havia, entretanto, diferenciação biológica entre as espécies *N. caninum* e *T. gondii* até 1988, quando a partir de então, Dubey e colaboradores isolaram e caracterizaram o parasito, identificando-o como *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988).

1.2 Morfologia e ciclo biológico

Neospora caninum se caracteriza por apresentar um ciclo de vida heteroxeno, com fases assexuada e sexuada, sendo que a reprodução assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários e a fase sexuada ocorre nos hospedeiros definitivos. Durante o seu ciclo, o parasito apresenta três principais estágios: taquizoítos, bradizoítos em cistos teciduais e esporozoítos em oocistos, sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão da neosporose (DUBEY; SCHARES, 2011; EIRAS et al., 2011).

Os taquizoítos representam a forma proliferativa do parasito e são capazes de invadir e replicar em diferentes tipos celulares, *in vivo* e *in vitro* (HEMPHILL; AGUADO-MARTINEZ; MULLER, 2015). São ovoides, redondos ou em forma de meia-lua, com o núcleo na posição

central ou terminal, e medem de 3 a 7 μm x 1 a 5 μm , dependendo do estágio de crescimento e divisão, e do plano de corte nos tecidos.

Para sobreviver dentro do hospedeiro, *N. caninum* desenvolveu um conjunto de mecanismos que direcionam diversas respostas adaptativas, desse modo, sob pressão fisiológica e/ou do sistema imune, o parasito consegue realizar conversão de formas taquizoítas em bradizoítos, como forma de adaptação (EASTICK; ELSHEIKHA, 2010; HEMPHILL et al., 2015).

Em um hospedeiro imunocompetente, acontecem por volta de 20 divisões das formas taquizoítas antes da sua diferenciação em bradizoítos (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013), os quais possuem multiplicação lenta, caracterizam a fase crônica da doença e são encontrados em cistos teciduais no tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo, nervos), na retina e no músculo esquelético nos diversos hospedeiros (DUBEY; BUXTON; WOUDE, 2006).

Os bradizoítos medem cerca de 6,5 x 1,5 μm , apresentam forma alongada (DUBEY; THULLIEZ, 2005), um núcleo subterminal e de 6 a 12 ropertyias (DUBEY et al., 2002). Cerca de 20 a 100 bradizoítos ficam inclusos em cistos teciduais, que geralmente são redondos ou ovais, podendo medir até 107 μm . A espessura da parede do cisto de *N. caninum* geralmente é de 1 a 2 μm , podendo medir até 4 μm , provavelmente dependendo do tempo de infecção. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro, enquanto nos bezerros com neosporose congênita, os cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal (DUBEY et al., 2006).

Os esporozoítos são o produto final da fase sexuada, alongados e possuem dimensão de 6,5 x 2,0 μm . Durante o processo de esporulação, eles se desenvolvem dentro dos oocistos, que são esféricos e medem de 10 à 11 μm de diâmetro. Os oocistos esporulam, se tornam infectantes após três dias no ambiente, e contêm dois esporocistos (medindo cada um 8,4 x 6,1 μm), cada um com quatro esporozoítos cada (DUBEY et al., 2002).

O ciclo da neosporose (**Figura 1**) se inicia pela ingestão por canídeos de cistos presentes nos tecidos de presas ou ingestão por outros hospedeiros de oocistos contidos na água e alimentos. Os cistos e oocistos passam por digestão químico-enzimática no estômago e duodeno, liberando as formas infectantes na luz intestinal. Os esporozoítos são liberados no trato digestivo invadindo as células epiteliais, leucócitos e fibroblastos e se multiplicam por endodiogénia,

formando vacúolos que rompem as células hospedeiras quando estão repletos de taquizoítos (GOODSWEN et al., 2013). Os parasitos migram para o tecido linfóide associado à mucosa intestinal e são disseminados para todo o organismo por meio da circulação linfática, sanguínea e por via ascendente por tecidos nervosos periféricos (MINEO; CARRASCO; et al., 2009).

Após alguns ciclos de multiplicação do parasito e pela pressão exercida pelo sistema imune do hospedeiro, taquizoítos dão origem a bradizoítos e formam novos cistos teciduais (GOODSWEN et al., 2013). Quando os cistos são ingeridos por hospedeiros definitivos, bradizoítos são liberados, invadem células epiteliais do intestino delgado e culminam com o desenvolvimento da fase sexuada (gamogonia) com produção final de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos) que são eliminados com as fezes.

No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados. Dessa forma, a transmissão horizontal do *N. caninum* para os bovinos e demais hospedeiros intermediários pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais ou pela ingestão de oocistos, através de água ou alimentos contaminados (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 2003).

A transmissão transplacentária ou congênita foi demonstrada em bovinos e em cães infectados experimentalmente (DUBEY et al., 1992). No caso dos bovinos, diversos estudos demonstram que esta é considerada a via de transmissão mais importante, podendo ocorrer por diversas gerações (BENAVIDES et al., 2012; DE MAGALHAES et al., 2014; GOODSWEN et al., 2013; REGIDOR-CERRILLO et al., 2015). Além disso, outras rotas secundárias de transmissão horizontal como lactogênica, venérea ou inseminação artificial têm sido investigadas (MASUDA et al., 2007; MOSKWA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2014; SERRANO-MARTINEZ et al., 2007).

N. caninum também passa por um ciclo de vida em animais silvestres, os quais seriam reservatórios do parasito para disseminação em animais domésticos, entretanto, a importância desta forma de transmissão ainda não está bem elucidada (DONAHOE et al., 2015).

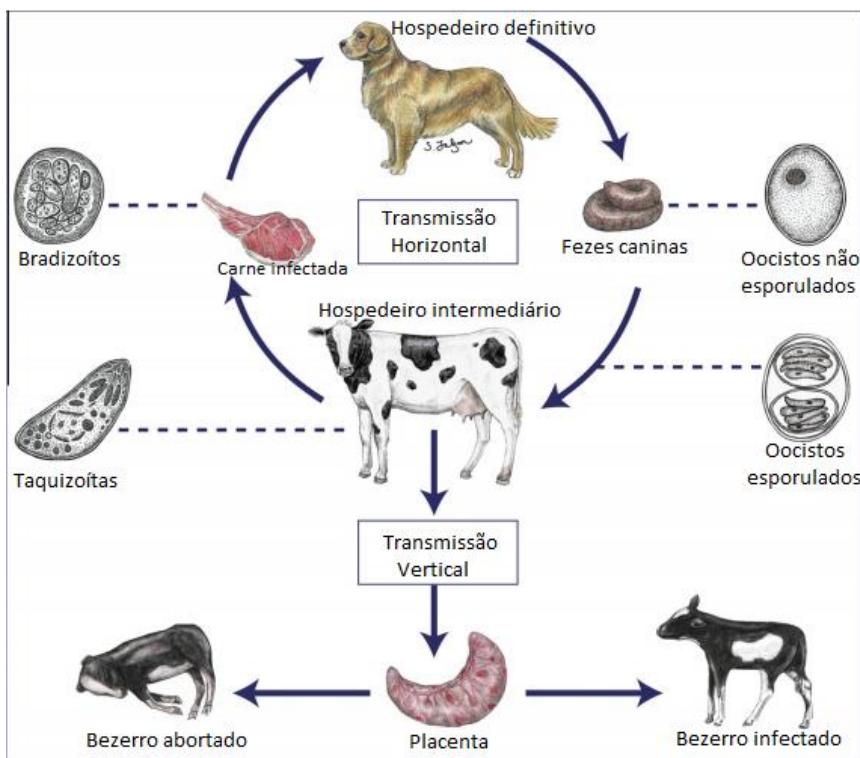


Figura 1 – Ciclo biológico de *Neospora caninum*. O ciclo de vida completo heteroxeno inclui tanto a replicação sexuada quanto assexuada. A transmissão horizontal ocorre através de oocistos e cistos teciduais: Canídeos são infectados por comer carne contaminada. Os oocistos são excretados e persistem no ambiente por períodos de tempo desconhecido. O hospedeiro intermediário é infectado pela ingestão de pastos contaminados com fezes ou pela água, ou por comer cistos teciduais. Transmissão vertical: taquizoítas podem ser transmitidos via transplacentária. (Adaptado de Goodswen et al., 2013).

1.3 Patogênese e sinais clínicos

Os parasitos do filo Apicomplexa são intracelulares obrigatórios e invadem as células hospedeiras por um mecanismo extremamente bem sucedido. Esta invasão é o principal evento na patogênese da infecção por *N. caninum*, e conta com a participação de um complexo apical composto por roptrias, micronemas e grânulos densos, os quais promovem a adesão e invasão do parasito nas células hospedeiras levando à lesões teciduais (DUBEY et al., 2002).

A invasão celular pelo estágio infectante do parasito é composta por vários processos. Primeiramente ocorre uma interação entre o parasito e a célula hospedeira, envolvendo várias proteínas de superfície imunodominantes (NcSAG1 e NcSRS2). Depois disso, o parasito sofre uma reorientação para que sua proeminência apical entre em contato com a superfície celular, ocasionando uma invaginação de membrana para a formação do vacúolo parasitóforo, secretando

várias proteínas de micronemas (MIC1, 2, 3 e 4), que possuem função de adesinas e formam uma junção do tipo irreversível (*tight junction*). Após a formação desta junção, o taquizoíto é envolto pelo vacúolo parasitóforo, com a participação do seu citoesqueleto, resultando na invasão celular propriamente dita (NAGULESWARAN; MULLER; HEMPHILL, 2003).

Como a membrana celular é a mesma que forma o vacúolo parasitóforo, o mesmo não se funde com os lisossomos. Posteriormente, ocorre a secreção de proteínas de roptrias (ROP 1 e 2) no interior do vacúolo parasitóforo, a fim de estender a membrana do mesmo para que se possa formar uma associação com as organelas celulares do hospedeiro. Finalmente, a membrana do vacúolo é modificada pelas proteínas de grânulos densos (GRA- 1, 2 e 7), contribuindo para a maturação do vacúolo parasitóforo e formação de uma rede de membrana metabolicamente ativa, que promove o crescimento do parasito no interior do vacúolo. Os taquizoítos se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo por endodiogenia, até subsequente lise celular e liberação de novos taquizoítos, que se encontram livres para infectar vários tecidos e células (NAGULESWARAN et al., 2003).

Devido à rápida multiplicação de taquizoítos na fase aguda, o agente pode causar a morte celular, com consequentes lesões necróticas em poucos dias, acarretando problemas neuromusculares, como encefalomielite em filhotes caninos e deformidades congênitas em membros de bovinos, e provavelmente em outros hospedeiros intermediários.

N. caninum pode causar aborto tanto em gado de corte como de leite, do 3º mês até o final da gestação, sendo mais comum entre o 5º e o 6º mês, podendo ocasionar morte, reabsorção, autólise fetal dentro do útero, natimortos e recém-nascidos em fase crônica da doença (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES, 2011).

Nos fetos, a infecção é sistêmica, com áreas de inflamação na maioria dos órgãos. A morte fetal resulta provavelmente de dois mecanismos principais. O primeiro, e mais comum, é a insuficiência cardíaca associada à miocardite e necrose do miocárdio. A evidência da insuficiência cardiovascular é o edema do feto (anasarca) e necrose hepática. O segundo mecanismo do aborto é a placentite com necrose do epitélio coriônico da placenta, e separação das vilosidades coriônicas das carúnculas do endométrio. Embora as lesões do cérebro sejam importantes, a infecção do sistema nervoso pode não ser o principal fator de morte fetal ou aborto (DUBEY; LINDSAY, 1996).

A neosporose canina ocorre geralmente como infecção sub-clínica persistente que pode se reativar durante a gestação, resultando em parasitemia materna e transmissão transplacentária para o feto. Assim, ninhadas sucessivas podem estar infectadas (DUBEY et al., 2002), embora em menor grau de transmissão vertical, sugerindo que a exposição pós-natal é necessária para manter o parasita na população canina. Sinais clínicos que podem ocorrer incluem dificuldade na deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia dos nervos faciais e falência cardíaca (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES, 2011).

1.4 Controle da neosporose

O controle da neosporose bovina é baseado principalmente na prevenção da contaminação ambiental com oocistos eliminados nas fezes dos cães, restringindo o acesso desses animais nas proximidades do rebanho e sacrificando animais infectados (WILLIAMS; TREES, 2006). Além disso, várias outras estratégias para o controle da infecção por *N. caninum* e abortos em bovinos têm sido testadas, como a implementação de uma abordagem de teste e abate de bovinos soropositivos, o tratamento com parasiticida, tais como medicamentos coccidiostáticos (por exemplo, toltrazuril) e vacinação (HEMPHILL et al., 2015; MANSILLA et al., 2015; REICHEL; ELLIS, 2009; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

Investigações têm mostrado que a quimioterapia com toltrazuril pode retardar a propagação de taquizoítos induzida experimentalmente em camundongos, mas requer o apoio da imunidade de células T para controlar a infecção (SYED-HUSSAIN et al., 2015).

Uma vacina comercial inativada chamada NeoGuard™ foi moderadamente bem sucedida em testes de campo (WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012) e posteriormente foi retirada do mercado. No entanto, desenvolver uma vacina que ganhe a aceitação do mercado, ainda apresenta vários desafios. As vacinas vivas, com base em cepas de não virulentas de *N. caninum* isoladas de bovinos naturalmente infectados, têm mostrado promessa considerável nesta área (ROJO-MONTEJO et al., 2009). Um dos principais impedimentos para o registro dessas vacinas é o potencial de populações de parasitos para persistir em bovinos vacinados, conduzindo a novas preocupações sobre a reversão da virulência.

Em relação ao controle da neosporose canina, deve-se evitar a reprodução de cadelas soropositivas para a doença e impedir seu acesso a locais contendo rebanho bovino. Além disso, a alimentação de cães de área rural não deve incluir carne ou vísceras cruas. Dessa forma haverá uma interrupção do ciclo deste parasito ajudando no controle da doença (REICHEL et al., 2014).

1.5 Resposta imune

Os mecanismos protetores contra o parasito *N. caninum*, envolvem tanto a resposta imune inata quanto adaptativa. Predominantemente, a proteção do hospedeiro é induzida por um tipo Th1 de resposta imune, produzindo IL-12 e IFN- γ em colaboração com respostas celulares efetoras que atuam para controlar o parasitismo tecidual (MONNEY; HEMPHILL, 2014).

A primeira barreira a ser enfrentada pelo coccídeo consiste na secreção, pelos enterócitos infectados, de moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO) e citocinas como a IL-15, que induzem as células *natural killer* (NK) a produzir IFN- γ e quimiocinas, recrutando leucócitos polimorfonucleares, células dendríticas e macrófagos. Outra barreira a ser enfrentada são as espessas junções intercelulares da mucosa intestinal que tentam deter a invasão do parasito pela via oral (MARCAIS et al., 2013).

A resposta imune inata desencadeada pela infecção por *N. caninum* desempenha um papel importante na proteção do hospedeiro, conduzindo à ativação de respostas adaptativas com um perfil Th1 e consequente controle parasitário. Inicialmente, o parasitismo é controlado pela produção de IFN- γ e IL-12p40, derivados da sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T auxiliares (TCD4 $^{+}$). Além disso, células natural killer (NK) e células T citotóxicas (TCD8 $^{+}$) atuam na primeira linha de defesa, realizando a lise das células infectadas com formas taquizoíticas (MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Além de destruir células infectadas, linfócitos TCD8 $^{+}$ contribuem para controlar as infecções agudas devido à produção de IFN- γ e ativação de macrófagos. Deste modo, IFN- γ representa um dos principais mediadores de resistência através da ativação dos macrófagos, os quais produzem intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio, inibindo as enzimas necessárias para a replicação do parasito (CORREIA et al., 2015; WILLIAMS; TREES, 2006).

Outra citocina que possui participação ativa na resposta imune celular contra *N. caninum* é a IL-10, a qual controla as lesões locais e sistêmicas geradas pela infecção por possuir um efeito

inibitório sobre a atividade microbicida dos macrófagos, produção de IFN- γ e IL-12 e diferenciação de clones Th1 (JESUS et al., 2013; MINEO et al., 2010; MURRAY; WYNN, 2011).

As células que participam da resposta imune inata expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), tais como os receptores Toll-like (TLRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (RODRIGUEZ-PRADOS et al., 2010; YAROVINSKY, 2014). Em camundongos, os TLRs podem estar associados às membranas celulares (TLR1, 2, 4, 5, 6) ou endossomas (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 e 13) (OLDENBURG et al., 2012); (RAETZ et al., 2013; SCHLAEPPER et al., 2014). Na infecção por *N. caninum*, foi previamente observado que o receptor TLR2 induz a ativação de células apresentadoras de抗ígenos e polarização de respostas imunes para um perfil Th1 (MINEO et al., 2010), enquanto TLR3 atua no reconhecimento do RNA do parasito com posterior indução de citocinas IFN-I (BEITING et al., 2014).

São reconhecidos treze diferentes receptores do tipo Toll em vertebrados, sendo que todos necessitam de moléculas adaptadoras, principalmente MyD88 (Fator 88 de diferenciação mielóide) e TRIF (Molécula indutora de interferon- β com domínio TIR), para a realização da transcrição do sinal. Todos os TLRs (exceto TLR3) compartilham a mesma proteína adaptadora, MyD88. TLR3 transcreve sinais somente via TRIF, e TLR4, sinaliza através de ambas as vias, dependendo do estímulo. Isto torna o processamento de um sinal de TLR4 relativamente complexo, em comparação com outros receptores da família TLR (JIMENEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2015; PADWAL; SARMA; SAHA, 2014).

A via de sinalização dependente de MyD88 leva a ativação dos fatores de transcrição NF κ B e MAPK, que codificam a expressão de mediadores pró-inflamatórios. Já a via dependente da molécula adaptadora TRIF ativa fatores regulatórios de interferon (IRFs) resultando na produção de interferon do tipo I (IFN-I) e citocinas pró-inflamatórias (MCALLISTER et al., 2013).

Para que haja uma resposta imune efetiva do hospedeiro no combate ao parasito sem lesões teciduais exacerbadas, é necessário um balanço entre a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 em busca da homeostasia. Quando é estabelecida a predominância da resposta pró-inflamatória Th1 em bovinos infectados com *N. caninum*, a gestação frequentemente se torna prejudicada, podendo resultar em aborto ou reabsorção fetal. De modo contrário, a maior

produção de citocinas regulatórias e/ou anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 promove a continuidade da gestação, visto que a sobrevivência fetal é estritamente relacionada à sua competência imunológica (ALMERIA et al., 2014; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014).

Em relação à resposta imune humoral anti-*N. caninum* alguns autores relatam que os níveis de anticorpos variam durante a gestação e estão relacionados ao alto risco de aborto em bovinos (BRICKELL; MCGOWAN; WATHES, 2010; NOGAREDA et al., 2007; YANIZ et al., 2010). Além disso, ocorre a produção de subclasses IgG1 e IgG2 durante a infecção, sendo que IgG2 é encontrada em maior índice que IgG1 (MOORE et al., 2011). Interessantemente, em um estudo realizado na Espanha em 2011, os maiores níveis de IgG2 foram relacionados com proteção contra o aborto em bovinos de corte, mas não em gado leiteiro. Segundo os autores, uma possível explicação para isto, seria que a IgG2 por si só não é suficiente para proteger contra o aborto, mas tem de ser associada com alta produção de IFN- γ , que é o caso do gado de corte, e não do gado leiteiro (SANTOLARIA et al., 2011).

Sabe-se de maneira geral, que os anticorpos específicos possuem a capacidade de neutralizar e opsonizar os parasitos, limitando a replicação de formas taquizoítas de *N. caninum*. Entretanto, a participação específica das imunoglobulinas, bem como das células B que as produzem, ainda precisa ser melhor elucidada.

1.6 Molécula indutora de interferon- β com domínio TIR (TRIF) e sua via de sinalização

A molécula adaptadora TRIF foi inicialmente identificada por Yamamoto e colaboradores em 2002, utilizando-se uma base de dados capaz de rastrear proteínas contendo domínio TIR, bem como suas interações com TLRs. Neste caso, a descoberta se deu pelo interesse na identificação das moléculas envolvidas em respostas imunes específicas desencadeadas pelo receptor TLR3 e fator de transcrição IRF3 (Fator Regulador de Interferon 3), ambos independentes de MyD88 (YAMAMOTO et al., 2002).

TRIF, também conhecido como TICAM-1 (OSHIUMI et al., 2003), possui um domínio TIR que está presente na sua região C-terminal, além de apresentar resíduos de prolina, comum aos TLRs e essencial para ativação das vias de sinalização (YAMAMOTO et al., 2002).

Na região N-terminal de TRIF há proteínas da família TRAF (Fator Associado ao receptor de TNF), sendo elas TRAF 6 e TRAF 3, as quais ativarão diferentes fatores de transcrição para o estabelecimento de uma resposta imune apropriada contra o antígeno. TRAF 6 é responsável por recrutar a proteína quinase RIP-1, que por sua vez fosforila o complexo TAK1 e resulta na ativação de NFkB e MAPKs para a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias. Quando a interação de TRIF acontece com TRAF3, há o recrutamento de TBK1 e IKKi, que são proteínas quinases relacionadas a IKK e que fosforilam IRF3 induzindo a expressão de genes de IFN-I (KAWASAKI; KAWAI, 2014).

De um modo geral, TRIF está envolvido nas vias de sinalização geradas por TLR3 e TLR4 (**Figura 2**), levando a produção direta de IFN-I (IFN- α e IFN- β) e indireta de outras citocinas como TNF, IL-12, IL-10, IFN- γ e IL-17 (BAI et al., 2014; HU, W. et al., 2015; LEICHTLE et al., 2009; OKANO et al., 2015; OUYANG et al., 2007; XU et al., 2015). Além disso, a expressão de TRIF é ubíqua, com seu mRNA podendo ser detectado na maioria dos tecidos e células (OSHIUMI et al., 2003).

A sinalização derivada do reconhecimento de dsRNA por TLR3 nos endossomos é realizada exclusivamente via TRIF, que se associa com TBK1 e induz fosforilação e translocação nuclear de IRF3, levando à produção de IFN- α e IFN- β que são muito importantes para a imunidade anti-viral (HU, W. et al., 2015). Foi demonstrado que a via TLR3-TRIF-IFN I é importante para a maturação de células dendríticas e consequente ativação de linfócitos T CD4 $^{+}$ (HU, W. et al., 2015; LONGHI et al., 2009).

Quando a resposta imune é desencadeada pelo receptor TLR4, tanto MyD88 quanto TRIF podem ser recrutados como proteína adaptadora, no entanto, o recrutamento de TRIF acontece minutos mais tarde no endossomo e necessita da Molécula Adaptadora Relacionada a TRIF (TRAM) como acessória, sendo responsável pela ativação tardia de NFkB, AP-1 e fatores reguladores de interferon (GANDHAPUDI; CHILTON; MITCHELL, 2013; KAWASAKI; KAWAI, 2014; ROSADINI et al., 2015). O eixo TLR4-TRAM-TRIF já teve sua importância descrita na indução de expansão clonal de células T, secreção de quimiocinas induzidas por interferon e desenvolvimento de resposta Th17 eficiente, sendo que, em grande parte as funções de MyD88 e TRIF nesta via se complementam (GANDHAPUDI et al., 2013; HOEBE et al., 2003; HSIA et al., 2015).

Estudos recentes indicam que TRIF também pode atuar na via de sinalização de outros receptores, como TLR2, visto que a indução da quimiocina CCL5 e de interferon- β mediada por TLR2 foi reduzida em macrófagos deficientes para TRIF quando comparado a macrófagos WT (NILSEN et al., 2015). Além disso, Brandão e colaboradores demonstraram que a expressão de TLR5 no intestino depende tanto de MyD88 quanto de TRIF (BRANDAO et al., 2015). De acordo com esses novos resultados, são necessários estudos mais aprofundados sobre vias de sinalização dos TLRs e seu envolvimento com as moléculas adaptadoras para que o entendimento das respostas imunes geradas por diferentes estímulos se torne mais completo.

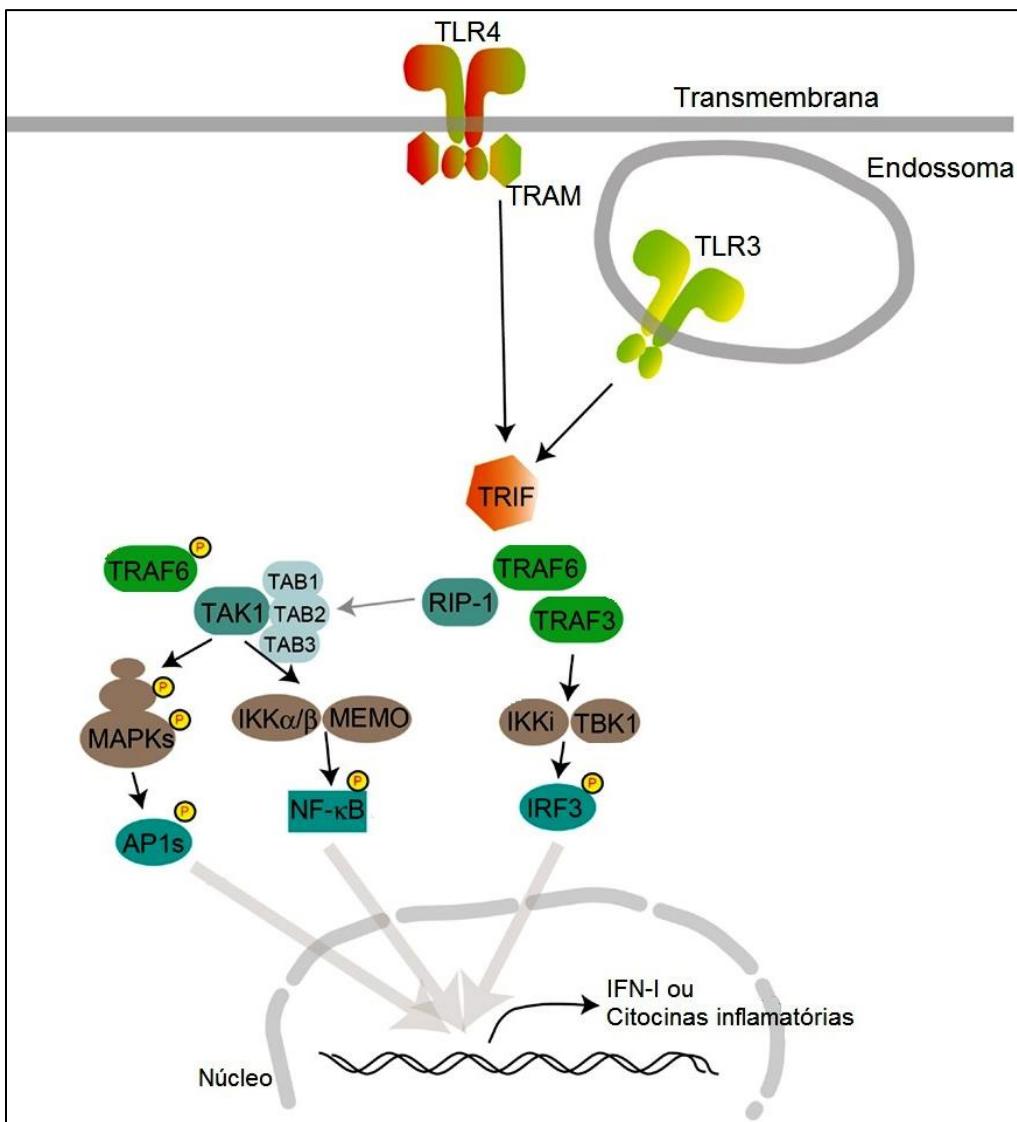


Figura 2: Vias de sinalização de TLR4 e TLR3 dependentes de TRIF. TLR4 e TLR3 se localizam na superfície celular e no endossoma, respectivamente. TRAM medeia o sinal de TLR4 para TRIF, que em seguida induz o recrutamento de TRAF6 e TRAF3. TRAF6 recruta RIP-1, que ativa o complexo TAK1 e consequentemente os fatores de transcrição MAPK e NF κ B para produção de citocinas inflamatórias. TRAF3 recruta TBK1 e IKK α para fosforilação de IRF3 e produção de IFN-I. (Adaptado de Kawasaki; Kawai, 2014).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Dentre os patógenos que causam desordens reprodutivas em bovinos, o protozoário *Neospora caninum* tem requerido atenção especial de produtores e médicos veterinários, devido a sua eficiência em transferir-se para o embrião, bem como por sua capacidade de induzir perdas reprodutivas. Tais perdas não são restritas somente à reprodução, sendo que fatores como diferenças genéticas e suscetibilidade do gado, diferentes práticas de manejo, metas de produção de leite, nutrição, e a possibilidade de infecção concomitante com outros patógenos podem impactar sobre os efeitos econômicos gerados pela neosporose (REICHEL et al., 2013).

A nível global, a perda média devido ao aborto bovino causado pela neosporose, foi estimada em mais de 1.298,3 milhões de dólares anualmente, sendo que aproximadamente dois terços desse prejuízo é devido à queda na produção de leite. Já no Brasil, a perda foi estimada em 51,3 milhões de dólares ao ano, fato que indica o grande impacto econômico da neosporose em países de essência pecuarista (REICHEL et al., 2013; REICHEL et al., 2014).

Devido ao fato de os mecanismos de resposta imune inata relacionados à infecção por *N. caninum* serem pouco conhecidos, se tornam necessários maiores estudos para a descrição da participação das diversas vias de sinalização que culminam na produção de mediadores inflamatórios. A infecção por protozoários tem sido tipicamente associada com a indução de interferon do tipo II (IFN- γ), enquanto que IFN I, especialmente IFN- α e IFN- β , são proeminentes em infecção viral (VILLANUEVA et al., 2015). Deste modo, as respostas de IFN-I para protozoários não são completamente entendidas.

Dados *in vitro* de um estudo realizado por Beiting e colaboradores (2014) sugerem que o RNA de *Neospora caninum* é um importante gatilho para a indução de respostas que geram IFN-I por meio de TLR3 e TRIF. Enquanto que no caso de *Toxoplasma gondii*, parasito estreitamente relacionado a *N. caninum*, foi visto que células infectadas produzem um fator solúvel que suprime a indução inata de interferon do tipo I (BEITING et al., 2014).

Como *N. caninum* é um potente indutor de IFN-I via TRIF, seria importante entender a participação específica desta molécula adaptadora na resistência do hospedeiro contra a infecção por esse parasito. Com isso, seria possível o desenvolvimento de métodos preventivos e terapêuticos eficazes contra a neosporose, visando aumentar os escores reprodutivos na criação

destes ruminantes e induzindo, por conseqüência, melhorias de rendimento e competitividade externa neste importante setor da economia nacional.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do adaptador indutor de interferon- β contendo domínio TIR (TRIF) na resistência a infecção por *Neospora caninum* *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel de TRIF na indução de resposta efetora de macrófagos infectados por *N. caninum*, através de dosagem de citocinas e parasitismo celular;
- Verificar a relevância de IFN-I induzido por TRIF para produção de citocinas inflamatórias em macrófagos em resposta à infecção por taquizoítos de *N. caninum*;
- Avaliar a produção *in vivo* de citocinas e óxido nítrico durante a infecção por *N. caninum*;
- Quantificar a produção de anticorpos IgG séricos *N. caninum*-específicos em camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados;
- Analisar a carga parasitária e inflamação tecidual de animais WT e TRIF^{-/-} em diferentes fases da infecção por *N. caninum*;
- Determinar a relevância da molécula adaptadora TRIF na mortalidade induzidas pela infecção por *N. caninum*.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimentos *in vitro*

4.1.1 Manutenção de células HeLa e taquizoítos de *Neospora caninum*

As células hospedeiras derivadas de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em garrafas de cultura com meio RPMI 1640 (Life Technologies Corporatin, Carlsbad, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), glutamina (2mM) e antibiótico/antimicótico (100 unid/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0,25 µg/ ml anfotericina B) a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem a confluência (DUBEY et al., 1988).

Em seguida, as células foram desaderidas com EDTA 0,1mM e o sobrenadante foi centrifugado a 400g por 10 minutos. O sedimento resultante foi ressuspensido em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e utilizado para o inóculo de novas garrafas de células HeLa, que foram infectadas com suspensões parasitárias de taquizoítos de *N. caninum* da cepa Nc-Liv (BARBER et al., 1995).

Após a multiplicação dos parasitos e o consequente rompimento das células HeLa anteriormente infectadas, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 800 x g por 10 minutos a 4°C, o sedimento ressuspensido em 1mL de meio de cultura RPMI 1640 sem a adição de SFB e utilizado para infecção de novas garrafas de células HeLa ou contados em câmara de hemocitométrica com a adição de Azul de Tripan 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para identificação dos parasitos viáveis a serem utilizados para experimentos *in vitro* ou *in vivo*.

4.1.2 Obtenção de camundongos

Camundongos C57BL/6 selvagens e geneticamente deficientes em TRIF (TRIF^{-/-}) com seis a oito semanas de idade foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia em ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), sem restrição de água e ração. Todos os procedimentos

seguiram as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU # 052/12 – **Anexo 1**).

4.1.3 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Camundongos C57/BL6 do tipo selvagem e geneticamente deficientes para TRIF ($\text{TRIF}^{-/-}$) foram eutanasiados e pulverizados com álcool 70%. Seus fêmures e tíbias foram extraídos, dissecados e, em fluxo laminar, imersos em álcool 70% por 1 minuto, sendo cortadas suas epífises. As medulas ósseas foram lavadas como auxílio de uma seringa com RPMI 1460 e uma agulha de insulina (26G de diâmetro). A suspensão celular resultante foi centrifugada e ressuspendida em meio R20/30 composto por RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM) para a diferenciação em macrófagos (MARIM et al., 2010).

As células foram igualmente distribuídas em placas de Petri (9 ml de meio R20/30 por placa) e incubadas por 6 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sendo que no 4º dia de diferenciação foi acrescentado o mesmo volume de meio. Após a incubação, o sobrenadante das placas foi descartado e acrescido às mesmas 9 mL de PBS estéril gelado para a retirada das células aderidas apó incubação por 10 minutos a 4°C. Por fim, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e o pellet obtido ressuspendido em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e a quantidade de células ajustadas para contagem com Azul de Tripan 0,4% em câmara hemocitométrica.

4.1.4 Extração de RNA celular para ensaios de expressão gênica

Após a diferenciação dos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT e $\text{TRIF}^{-/-}$, estas células foram plaqueadas em placas de 24 poços (10^6 células/poço) e deixadas a 37°C e 5% CO₂ por 18 horas. Após o período de incubação, as células foram infectadas com

taquizoítos de *N.caninum* com MOI 0,5 (Multiplicidade de Infecção = 1 parasito/2 células) e deixadas por 2, 6 ou 18 horas para extração do RNA celular, síntese do cDNA e posterior análise da expressão de TRIF, IFN- α e IFN- β por qPCR em diferentes tempos *in vitro*.

A extração do RNA total dos BMDMs foi realizada retirando-se as células aderidas com o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) na proporção 10⁶ células/ 500 μ l de Trizol. Em seguida, foram adicionados 150 μ l de clorofórmio, os tubos foram agitados por inversão, incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante para adição de 600 μ l de isopropanol gelado e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1ml de etanol 75%. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado para posterior secagem e diluição do pellet em água livre de DNase e RNase. A leitura foi feita a 260nm em espectrofotômetro.

As amostras foram ajustadas para 3 μ g em 50 μ l e foi adicionado 5 μ l de MgCl₂ e 1 μ l de DNase para remoção do DNA contaminante. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 15 minutos e após este período foi acrescentado 25 μ l de Trizol e 25 μ l de clorofórmio, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante e adicionado ao mesmo 20 μ l de Acetato de Sódio (3M, pH 5,2), 1 μ l de glicogênio para precipitação do RNA e 150 μ l de etanol. As amostras foram centrifugadas novamente por 13.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante para secagem e diluição do pellet em água livre de nucleasse. Por fim, realizou-se uma nova leitura em espectrofotômetro a 260nm.

4.1.5 Síntese do cDNA por transcrição reversa

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada por meio do kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, EUA). 1 μ g de RNA tratado com DNase foi diluído em 4 μ l de água livre de DNase e RNase e foi adicionado 1 μ l de primer Oligo (dT) para incubação a 70°C por 5 minutos. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo por 10 minutos e procedeu-se o preparo do mix, constituído por 4 μ l do Tampão de Reação (5x) da transcriptase reversa, 3,5 μ l de MgCl₂, 1 μ l de mix de dNTPs, 0,5 μ l de inibidor de ribonuclease, 1 μ l de transcriptase reversa e 5 μ l de água livre de nucleases.

O mix foi adicionado ao RNA para realização dos ciclos da reação de RT-PCR (25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos) e posterior obtenção do cDNA.

4.1.6 PCR em tempo real (qPCR) para análise de expressão gênica

O experimento de expressão gênica foi realizado através do sistema de detecção SYBR green (Promega, Madison, EUA) utilizando como controle endógeno a quantificação do transcrito do gene gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH) como previamente descrito (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002) no equipamento *7500 Real time PCR System* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA). Após obtenção do cDNA por transcrição reversa, foi adicionado ao mesmo o master mix do kit bem como os *primers* específicos para TRIF, IFN- α , IFN- β e GAPDH.

TRIF: Forward: 5'- TGT TGG AAA GCA GTG GCC TAT- 3'; Reverse: 5'- GAT GAC GTG GTG TTC TGC AGA-3'.

IFN- α : Forward: 5'- TGT CTG ATG CAG CAG GTGG - 3'; Reverse: 5'- AAG ACA GGG CTC TCC AGAC -3'.

IFN- β : Forward: 5'-AAG AGT TAC ACT GCC TTT GCC ATC - 3'; Reverse: 5'-CAC TGT CTG CTG GTG GAG TTC ATC -3'.

GAPDH: Forward: 5'- CTC GTC CCG TAG ACA AAA TGG-3'; Reverse: 5'-AAT CTC CAC TTT GCC ACT GCA (BRONEVETSKY et al., 2013).

Com a adição do mix e dos primers, as amostras foram submetidas às condições de ciclagem, sendo o primeiro para ativação da DNA polimerase (10 minutos a 95°C), o segundo 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos), o terceiro para anelamento dos primers e extensão (62°C por 1 minuto) e o quarto para verificar a especificidade da reação para um único “amplicon” (95°C por 15 segundos; 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos).

Após o fim da reação, os dados obtidos foram analisados pelos valores do *Cycle Threshold (Ct)*, pelo método de expressão relativa já descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), normalizado com GAPDH e tendo como parâmetro de comparação os valores de expressão gênica de macrófagos WT não infectados, visto que a deleção gênica de TRIF por si só ocasiona alterações em seus níveis de expressão antes da infecção.

4.1.7 Parasitismo *in vitro* por Citometria de Fluxo

Com o objetivo de se avaliar o parasitismo celular, BMDMs WT e TRIF^{-/-} foram plaqueados em placas de 24 poços (10^6 células/poço) e deixados a 37°C e 5% CO₂ por 18 horas. Após a incubação, os macrófagos foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0,5) marcados com DDAO. Para isso, os taquizoítos de *N. caninum* foram ajustados para 3×10^7 /ml e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz com *CellTrace FarRed* DDAO-SE (5µM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em seguida, foi adicionado 10 ml de RPMI 1640 e os parasitos foram centrifugados a 800g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio de cultura celular para nova contagem em câmara hemocitométrica e infecção dos macrófagos.

Após a infecção, os macrófagos foram incubados por 2 horas para análise de invasão. Passado este período, o sobrenadante celular foi descartado e as células foram desaderidas com PBS estéril gelado e centrifugadas a 400g por 10 minutos. O pellet resultante foi ressuspensionado em 200 µl de PBS para análise em citômetro de fluxo. A citometria de fluxo foi realizada considerando que as células DDAO⁺ estavam infectadas ou tinham taquizoítos na sua membrana celular.

4.1.8 Tratamento de BMDMs com as citocinas recombinantes IFN-α e IFN-β e estímulo com taquizoítos de *N. caninum*

Macrófagos WT e TRIF^{-/-} foram plaqueados com meio RPMI 1640 em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) e incubados por 18 horas a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, foram tratados ou não com as citocinas recombinantes IFN-α e IFN-β (R&D Systems, Minneapolis, EUA) na concentração de 10U/ml por 6 horas, utilizando como controle positivo da reação LPS (1µg/ml). Em seguida, as células foram estimuladas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI 0,5 ou 1) e novamente incubados por 24 horas. No dia seguinte, a placa foi centrifugada a 200g por 1 minuto e o sobrenadante de cultura celular foi coletado para posterior quantificação de citocinas por ELISA.

4.2 Experimentos *in vivo*

4.2.1 Delineamento experimental

Com o objetivo de se avaliar a importância de TRIF na resistência do hospedeiro, foram realizadas análises das fases hiper-aguda (24 horas), aguda (7 dias) e crônica (30 dias) da infecção. Para isso, camundongos WT e TRIF^{-/-} foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com a dose sub-letal de 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* obtidos como descrito anteriormente e, em diferentes tempos, foram coletadas amostras de soro, lavado e células peritoneais, pulmões, fígado e cérebro de acordo com o padrão de migração temporal do parasito como previamente determinado (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006). No lavado peritoneal foi dosado a produção de citocinas e óxido nítrico. Foi realizado homogenato das amostras de tecidos, que foram avaliados quanto ao perfil de produção de citocinas por ELISA, carga parasitária por qPCR e análise histológica por hematoxilina e eosina, enquanto que as amostras de soro foram avaliadas quanto à cinética de produção de anticorpos por ELISA e *Western blotting* e citocinas por CBA. Além disso, foi realizada uma análise de sobrevida infectando camundongos WT e TRIF^{-/-} via i.p. com a dose de 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum*. Após a inoculação, esses animais foram acompanhados quanto à sua sobrevivência por 30 dias.

4.2.2 Homogenato de órgãos

A fim de se analisar a produção de citocinas, diferentes órgãos foram coletados de camundongos WT e TRIF^{-/-} nas fases aguda e crônica da infecção. Inicialmente as amostras teciduais foram ajustadas para a quantidade de 100mg e em seguida, foi adicionado 500 µl de inibidor de proteases (Complete Mini Roche, Basel, Suíça). As amostras foram trituradas, homogeneizadas e centrifugadas a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até utilização nos experimentos.

4.2.3 Quantificação de citocinas

A produção das principais citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40 e IL-17) foi quantificada em sobrenadante de cultura de BMDMs (já descrito), lavado peritoneal e homogenato de pulmão de camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados ou não com taquizoítos de *N. caninum*. Os ensaios foram realizados usando kits de ELISA comerciais ou *Cytometric Bead Array* (CBA), de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA).

Para ELISA, placas de poliestireno de alta afinidade contendo 96 poços (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura, *overnight* a 4°C. Após lavagem das placas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 10% de SFB em PBS 0,01M (pH7,2) durante 1 hora. Seguido o bloqueio, foram adicionados as amostras e curvas padrões com concentrações conhecidas foram realizadas em diluições dupla-seriadas. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção biotinilados e conjugados com estreptavidina-peroxidase na diluição de 1:250 por 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450nm.

Para realização do ensaio de CBA, foram acrescentados 25 µl de *beads* de captura, 25 µl das amostras de soro ou da curva padrão e 25 µl de antícorpo de detecção específico de cada citocina em tubos FACS (BD Biosciences, San Diego, EUA). As amostras foram incubadas por 3 horas e em seguida foi adicionado 500 µl de tampão de lavagem para posterior centrifugação a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300 µl de tampão para leitura no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II: BD Biosciences, San Diego, EUA).

Para ambos os ensaios, a concentração final das citocinas foi determinada a partir de curvas padrão com concentrações conhecidas de proteínas recombinantes e os resultados foram expressos em pg/ml, observando os respectivos limites de detecção para cada ensaio: IFN- γ (4.1 pg/ml), TNF (3.7 pg/ml), IL-2 (2.9 pg/ml), IL-4 (3.3 pg/ml), IL-6 (2.5 pg/ml), IL-10 (31.3 pg/ml), IL-12p40 (15.6 pg/ml) and IL-17 (4.2 pg/ml).

4.2.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem indireta de NO foi realizada no lavado peritoneal de camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. O ensaio é realizado por kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, EUA) e determina a concentração de óxido nítrico baseado na conversão enzimática de nitrato a nitrito, seguido por sua detecção colorimétrica a 540nm. A concentração de nitrato/nitrito para cada amostra foi estimada em relação à curva padrão de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 0.78 umol/L.

4.2.5 ELISA indireto para IgG e suas subclasses anti-*N. caninum*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado para detectar a cinética de anticorpos IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* em amostras de soros dos camundongos selvagens e depletados geneticamente para TRIF infectados com a dose sub-lethal de 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*, com 0, 7 e 30 dias após a infecção, seguindo o protocolo já descrito com algumas modificações (SILVA et al., 2007).

Placas de microtitulação de 96 poços de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, New York, EUA) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA), em concentração de 10µg/ml em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó desnatado em PBS-T (PBS-TM) a 5% para IgG ou PBS-T com 1% de albumina sérica bovina (BSA- Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para IgG1 e IgG2a por 1 hora em temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soros dos camundongos infectados foram adicionadas, em duplicata, na diluição de 1:25 (*N. caninum*) em PBS-TM 1% para IgG por 1 hora, ou 1:25 em PBS-TBSA1% por 2 horas para IgG1 e IgG2a. Após incubação a 37°C, as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) na diluição 1:1000 marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis,

EUA) ou 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% e as placas foram incubadas durante uma 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.

Após um ciclo final de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático (H_2O_2 a 0,03%) em tampão cromógeno consistindo de 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid 0,01 M (ABTS; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2). Após incubação por 20-30 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 405 nm. O *cut-off* da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos em densidade óptica (D.O.).

4.2.6 Western blotting

Com o objetivo de se determinar o perfil de reconhecimento antigênico dos diferentes grupos experimentais, foi realizado o ensaio de Western blotting. Para isso, o antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) foi solubilizado em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%), aquecido a 100°C durante 5 minutos e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, em condições desnaturantes e não-redutoras. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, utilizando sistema semiúmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia) por 2 horas (SILVA et al., 2007).

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm, bloqueadas com PBS-TM 5% por 2 horas à temperatura ambiente e incubadas com as amostras de soros dos camundongos infectados por 18 horas a 4°C. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada análise. Após lavagens com PBS-T, as tiras foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (anti-IgG de camundongo) marcados com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) por 1 hora a 37°C. Após um ciclo final de lavagens, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (H_2O_2 a 0,03%) e solução de cromógeno 3,3-

diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 1mg/mL em Tris-HCl 20 mM (pH 7,2). A reação foi interrompida pela adição de água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

4.2.7 PCR em tempo real para análise do parasitismo tecidual

O parasitismo em amostras de tecido e células do lavado peritoneal dos animais infectados com dose sub-lethal de taquizoítas de *N. caninum* foi quantificado pela amplificação específica de cópias de DNA por meio de *Real-time* PCR e normalização com GAPDH como previamente descrito (JOHNSON; WIDLANSKI, 2004). Inicialmente, o DNA das amostras foi extraído a partir de 50mg de tecido ou pellet celular e foi adicionado 500 µL de Tampão NLB (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na2EDTA, pH 8.2), 16 µL de SDS 10% e 8 µL de Solução proteinase K (20mg/ml). Após a incubação a 50°C *overnight*, foi acrescentado às amostras 150 µL de Tampão NaCl 6 M em banho de gelo por 10 minutos com posterior centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescentou-se 800 µL de etanol absoluto. Em seguida, o DNA foi coletado e ressuspendido com 150-200 µL de água livre de nuclease. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e ajustada para 40 ng/µL com água estéril e livre de DNase (água DEPC).

A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real (7500 Real time PCR System, Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) com *primers* específicos para o gene Nc-5 de *Neospora caninum* (Forward: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; Reverse: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3'), GAPDH (Forward: 5'- CTC GTC CCG TAG ACA AAA TGG-3'; Reverse: 5'-AAT CTC CAC TTT GCC ACT GCA) e um master mix com o sistema de detecção *SYBR green* (Promega, Madison, EUA). A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de Nc-5 nas amostras comparado com curva padrão com quantidades de DNA conhecidas de *N. caninum* usando o *software* Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito / µg de DNA total.

4.2.8 Análise histopatológica

Amostras teciduais de pulmão, fígado e cérebro de camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* foram coletadas e fixadas em formol 10% em tampão PBS por 24 horas. No dia seguinte, os órgãos foram inclusos em parafina e cortados (5µm de espessura) com o auxílio de um micrótomo para fixação em lâminas, as quais foram posteriormente coradas com Hematoxilina e Eosina como previamente descrito (MINEO; CARRASCO; et al., 2009). As imagens dos cortes foram realizadas ao microscópio invertido automatizado FSX100 (Olympus, Tóquio, Japão).

4.2.9 Ensaio de Sobrevida

Os animais selvagens e geneticamente deficientes para TRIF foram inoculados com a dose letal de 1×10^7 taquizoítos do isolado Nc-Liv de *N. caninum*, em um volume de 200 µL, por via intraperitoneal. Os camundongos foram observados diariamente quanto à mortalidade, durante 30 dias após o desafio. Após este período, os animais sobreviventes foram eutanasiados.

4.3 Análise estatística

A análise estatística foi calculada utilizando-se o software *GraphPad Prism 5.0* para os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, como determinado pelo método Two-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, Teste T ou Mann Whitney, dependendo da peculiaridade de cada protocolo experimental. A análise estatística de mortalidade foi estimada utilizando análise pelo método de Kaplan-Meier sendo a curva de sobrevida comparadas através do teste Log-rank (MantelCox).

4.4 Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos no laboratório tais como realização de experimentos, manuseio de equipamentos, coleta de materiais biológicos e utilização de reagentes foram realizados de acordo com normas de biossegurança previamente descritas (MINEO et al., 2005).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Macrófagos TRIF^{-/-} apresentam a expressão gênica reduzida de TRIF, IFN- α e IFN- β quando comparados a BMDMs WT

A fim de se verificar se há diferenças na cinética de expressão de TRIF, IFN- α e IFN- β em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT e TRIF^{-/-}, foi realizado estímulo destas células com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0,5) ou LPS durante diferentes tempos (2, 6 e 18 horas) para a extração do RNA celular, construção da biblioteca de cDNA e posterior análise por qPCR.

De acordo com os resultados obtidos, a expressão de todos os alvos pesquisados foi maior nos macrófagos WT em relação aos TRIF^{-/-}. Levando-se em consideração a infecção dos macrófagos com *N. caninum* e o pico máximo de expressão das moléculas TRIF e IFN- α (6 horas), foi observado que BMDMs WT tem sua expressão de TRIF aumentada em 10 vezes quando comparada aos TRIF^{-/-}, enquanto que em relação à IFN- α , o aumento foi de quase 3 vezes. No caso da expressão de IFN- β as diferenças foram ainda maiores, sendo que macrófagos TRIF^{-/-} tiveram a expressão reduzida em 15 vezes quando comparados a BMDMs do tipo selvagem na presença do parasito (**Figura 3**).

Além disso, com estes resultados é possível demonstrar que *N. caninum* é forte indutor de TRIF, bem como de citocinas do grupo IFN-I, principalmente IFN- α , visto que o parasito foi capaz de induzir maiores níveis de expressão destas moléculas que o estímulo com LPS, que é considerado controle positivo de indução na reação.

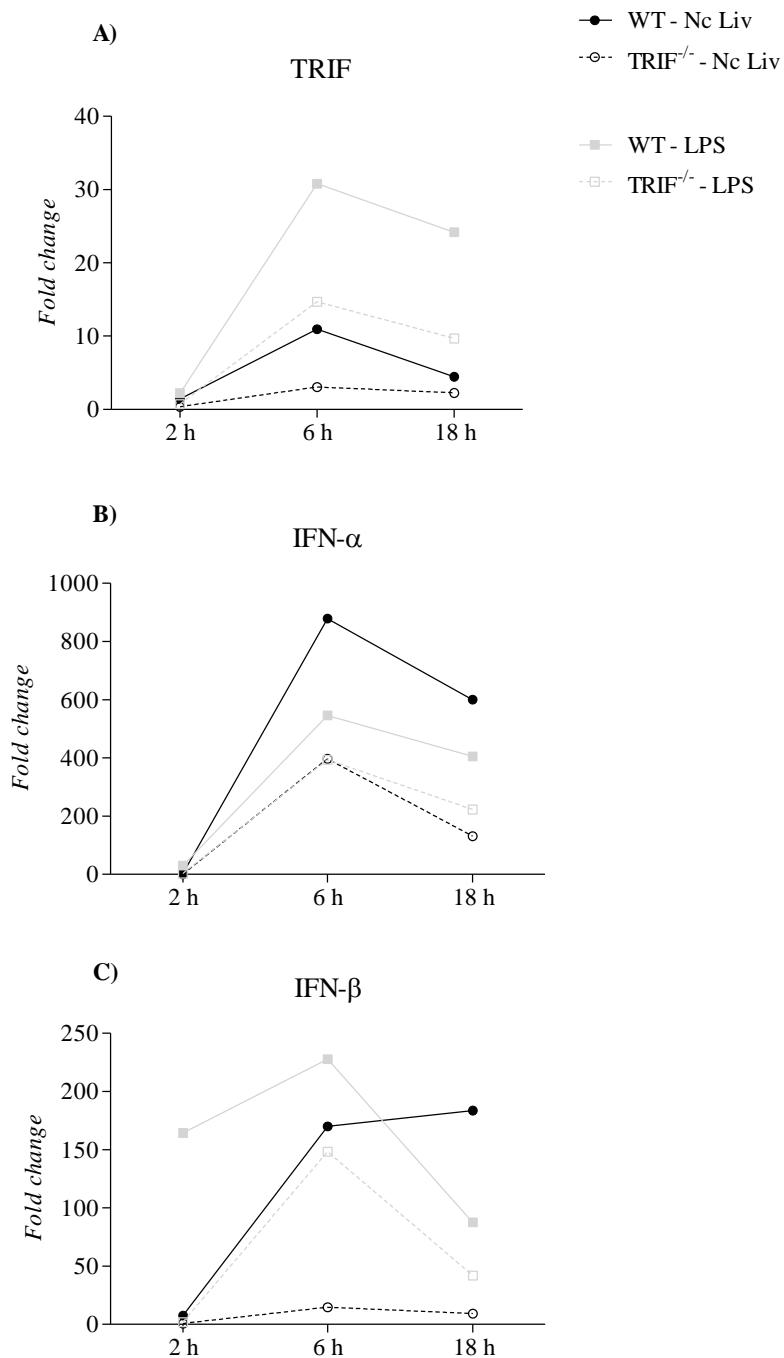


Figura 3: Expressão gênica de TRIF (A), IFN- α (B) e IFN- β (C) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0,5) ou estimulados com LPS por 2, 6 e 18 horas. A análise dos dados foi realizada considerando os resultados de expressão obtidos por macrófagos WT não infectados como valores de referência e são demonstrados como *fold change* (Aumento relativo do valor final em relação ao valor de referência).

5.2 TRIF atua como um importante modulador da produção de citocinas em macrófagos infectados com *Neospora caninum*

Com o objetivo de se avaliar a resposta imune desencadeada por macrófagos infectados com *N. caninum*, foi quantificada a produção de citocinas (IL-12p40, TNF e IL-10) no sobrenadante de BMDMs obtidos de camundongos WT e TRIF^{-/-} (**Figura 4**). Após 24 horas de infecção com o protozoário, detectou-se que macrófagos TRIF^{-/-} produziram quantidades significativamente reduzidas das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e TNF, ambas em MOI 0.1 e 0.5, quando comparados aos macrófagos WT. Além disso, a produção da principal citocina regulatória IL-10 foi diminuída nos macrófagos *knock-out* em todos os MOIs analizados. Esses resultados sugerem que TRIF participaativamente na modulação da resposta imune inata contra o parasito.

Em relação ao parasitismo celular não houve diferença significante entre macrófagos WT e TRIF^{-/-} com duas horas de infecção, indicando que *N. caninum* consegue invadir esses dois tipos celulares com a mesma eficiência (**Figura 5**).

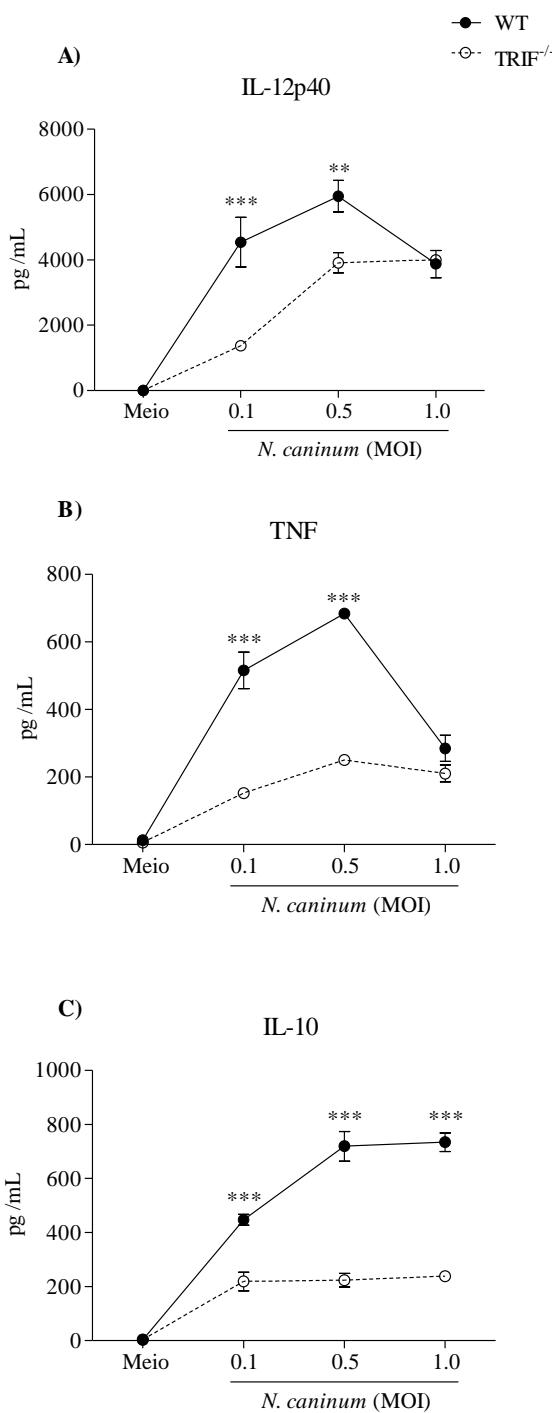


Figura 4: Quantificação da produção de IL-12p40 (A), TNF (B) e IL-10 (C) por ELISA no sobrenadante de cultura de BMDMs derivados de camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados com taquizoítos de *N. caninum* em diferentes relações parasito/célula (MOI). As concentrações de citocinas foram determinadas após 24 horas de infecção. Os valores são expressos como média ± erro padrão. (**P<0,01, *** P<0,001). Os dados foram analisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni e os resultados são representativos de três experimentos independentes.

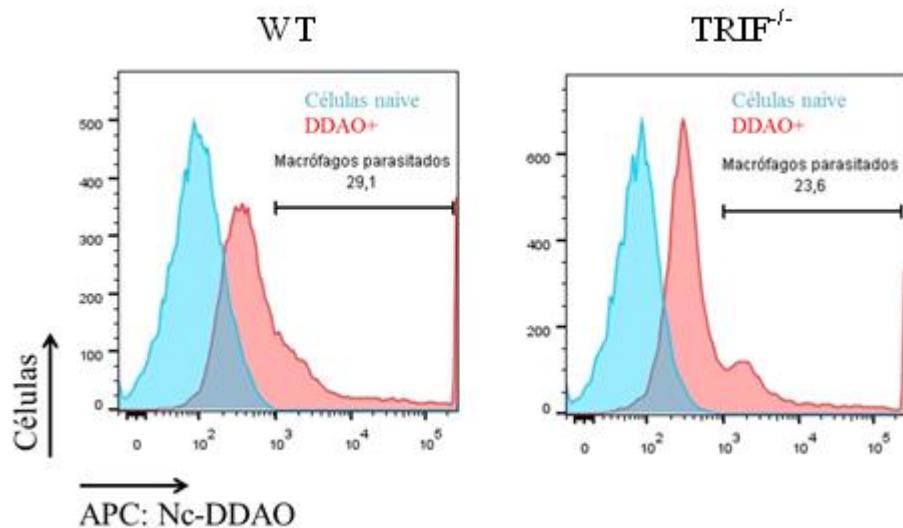


Figura 5: Ensaio de invasão para avaliação do parasitismo celular de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT e TRIF^{-/-} infectados com taquizófitos de *N. caninum* marcados com DDAO (Nc-DDAO; MOI 0,5) por 2 horas. O experimento foi realizado por citometria de fluxo para detecção de fluorescência de células infectadas.

5.3 O tratamento de macrófagos TRIF^{-/-} com IFN- α reestabelece a produção de IL-12p40 na infecção por *N. caninum*

Para estabelecer a importância de IFN- α e IFN- β (principais citocinas dependentes de TRIF) na modulação da produção de citocinas em macrófagos, BMDMs TRIF^{-/-} e WT foram cultivados, tratados com IFN- α e IFN- β recombinantes e infectados com taquizoítos de *N. caninum* para posterior análise da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e TNF (**Figura 6**).

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com IFN- α foi capaz de aumentar quase 3 vezes a produção de IL-12p40 pelos macrófagos TRIF^{-/-} quando comparados aos BMDMs da mesma linhagem não tratados. Já a reposição com IFN- β não alterou significativamente os níveis de produção desta citocina. No caso dos macrófagos WT, não houve diferenças na produção de IL-12p40 com nenhum dos tratamentos realizados quando comparada aos macrófagos não tratados.

Em relação à dosagem da citocina pró-inflamatória TNF, foi visto que os tratamentos com IFN- α e IFN- β não alteraram os seus níveis de produção, tanto nos macrófagos do tipo selvagem quanto nos deficientes para TRIF.

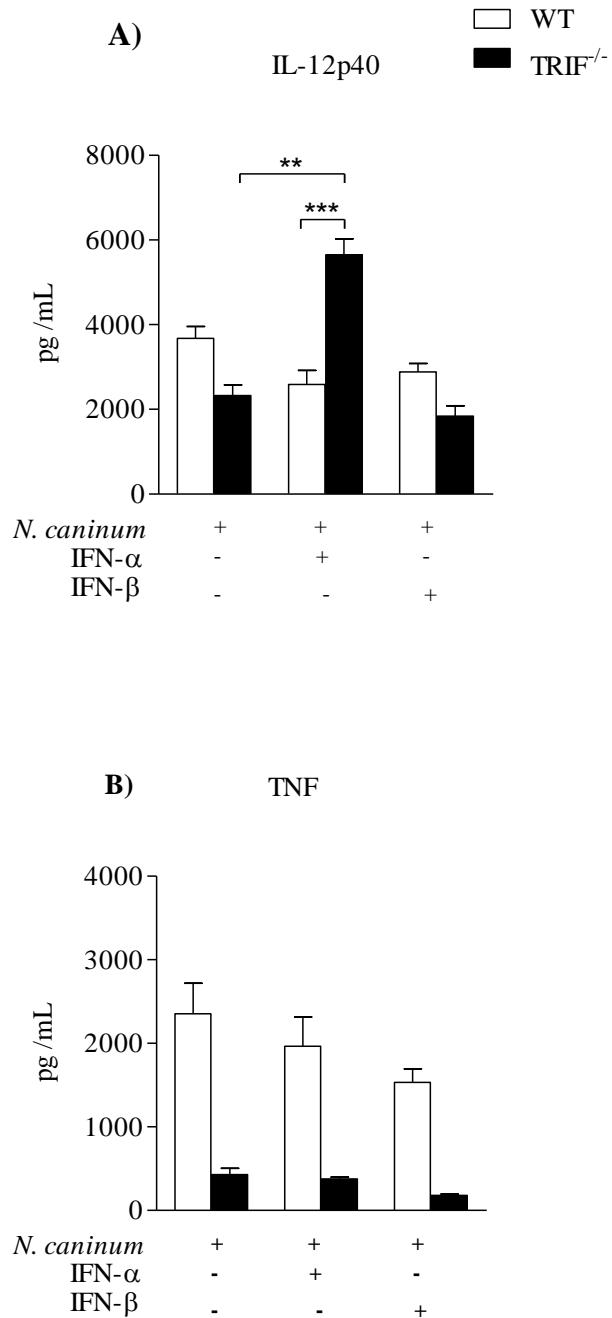


Figura 6: Quantificação da produção de IL-12p40 (A) e TNF (B) por ELISA no sobrenadante de cultura de BMDMs derivados de camundongos WT e TRIF^{-/-} tratados com as citocinas recombinantes IFN- α e IFN- β e posteriormente infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0.5). As concentrações de citocinas foram determinadas após 24 horas de infecção. Os valores são expressos como média \pm erro padrão. (**P<0,01 e *** P<0,001). Os dados foram analisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

5.4 TRIF é importante para indução de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 e produção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* *in vivo*

Como os macrófagos TRIF^{-/-} apresentaram níveis reduzidos de citocinas induzidas por taquizoítos de *N. caninum*, nós investigamos se o desenvolvimento de um perfil protetor de produção de citocinas e óxido nítrico seria prejudicado em camundongos TRIF^{-/-} durante a fase aguda da infecção. Foi visto que as concentrações das principais citocinas pró-inflamatórias IL-12p40, IFN- γ e TNF foram significativamente reduzidas no lavado peritoneal (**Figura 7**) e no homogenato dos pulmões (**Figura 8**) dos animais geneticamente deficientes em comparação com camundongos WT. Como esperado, os níveis de nitrato/nitrito no lavado peritoneal apresentaram redução na ausência de TRIF, indicando que esta molécula adaptadora possui grande importância no desenvolvimento de uma resposta imune celular apropriada.

Além disso, a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF e IL-17 foi reduzida no soro dos camundongos TRIF^{-/-} em relação aos WT. Os níveis de IL-4 e IL-6 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (**Figura 9**).

Com o objetivo de se avaliar o envolvimento da molécula adaptadora TRIF na resposta imune humoral contra *N. caninum*, a produção de anticorpos IgG antígeno-específicos foi analisada no soro de camundongos WT e TRIF^{-/-}. Foi observado que os níveis de IgG anti-*N. caninum* foram similares nos grupos experimentais durante a fase aguda da infecção, entretanto, na fase crônica foram encontrados baixos níveis desses anticorpos específicos no grupo *knock-out*. Já em relação a produção das subclasses IgG1 e IgG2a, não foram vistas diferenças significantes entre os grupos WT e TRIF^{-/-} (**Figura 10**). Quanto ao perfil de reconhecimento de抗ígenos imunodominantes por anticorpos IgG anti-*N. caninum* presentes no soro destes animais, foi confirmado que com 7 dias de infecção não há diferenças entre os grupos, já com 30 dias de infecção, foi observado um menor reconhecimento antigênico de proteínas com peso molecular aparente acima de 50 kDa pelos camundongos TRIF^{-/-} em relação aos do tipo selvagem (**Figura 11**).

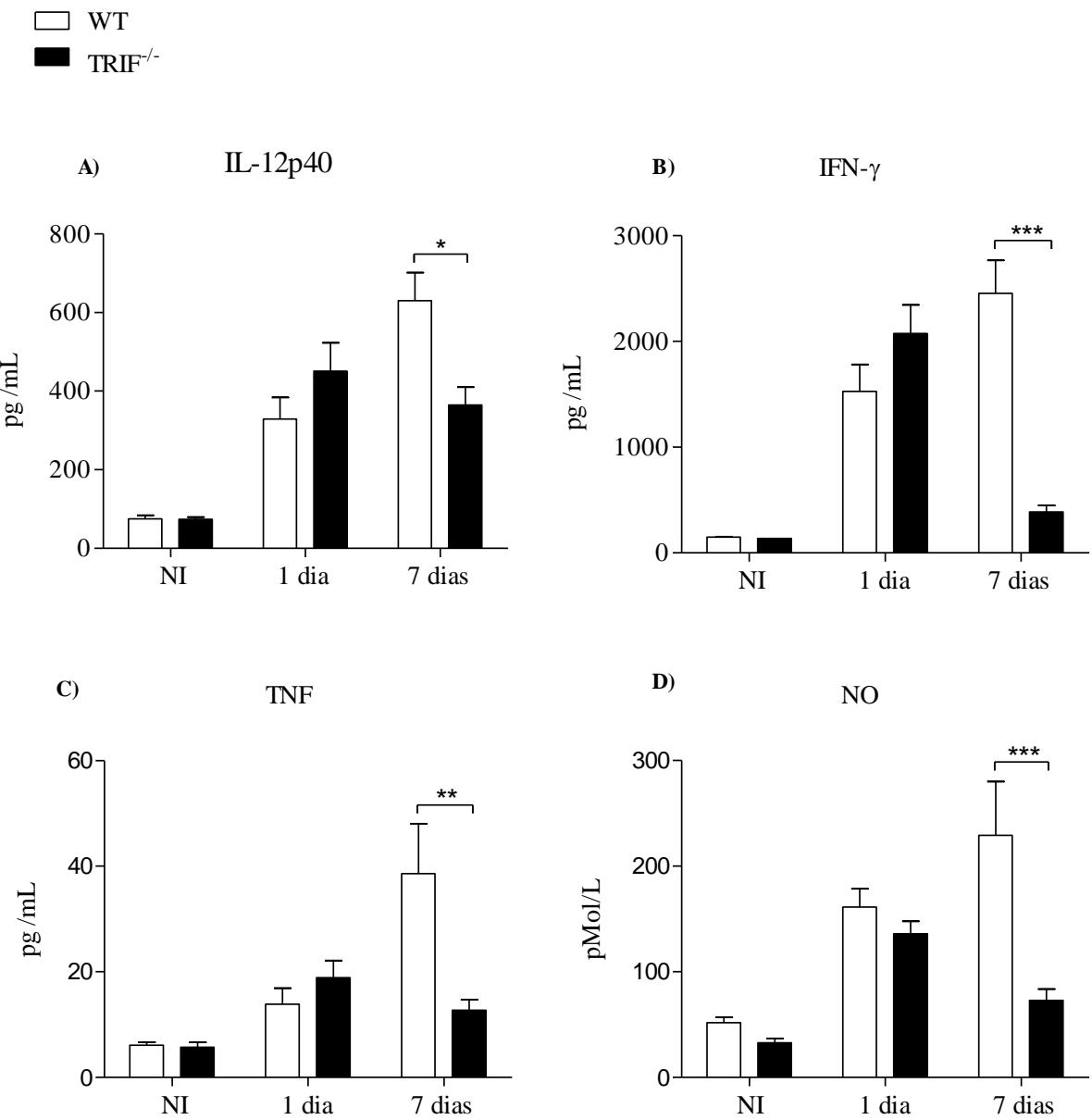


Figura 7: Quantificação da produção de citocinas (IL-12p40, IFN- γ e TNF) por ELISA e óxido nítrico no lavado peritoneal de camundongos WT e TRIF^{-/-}(n = 5) após 1 dia e 7 dias de infecção com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e foram analisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni, sendo representativos de três experimentos independentes. (* P<0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

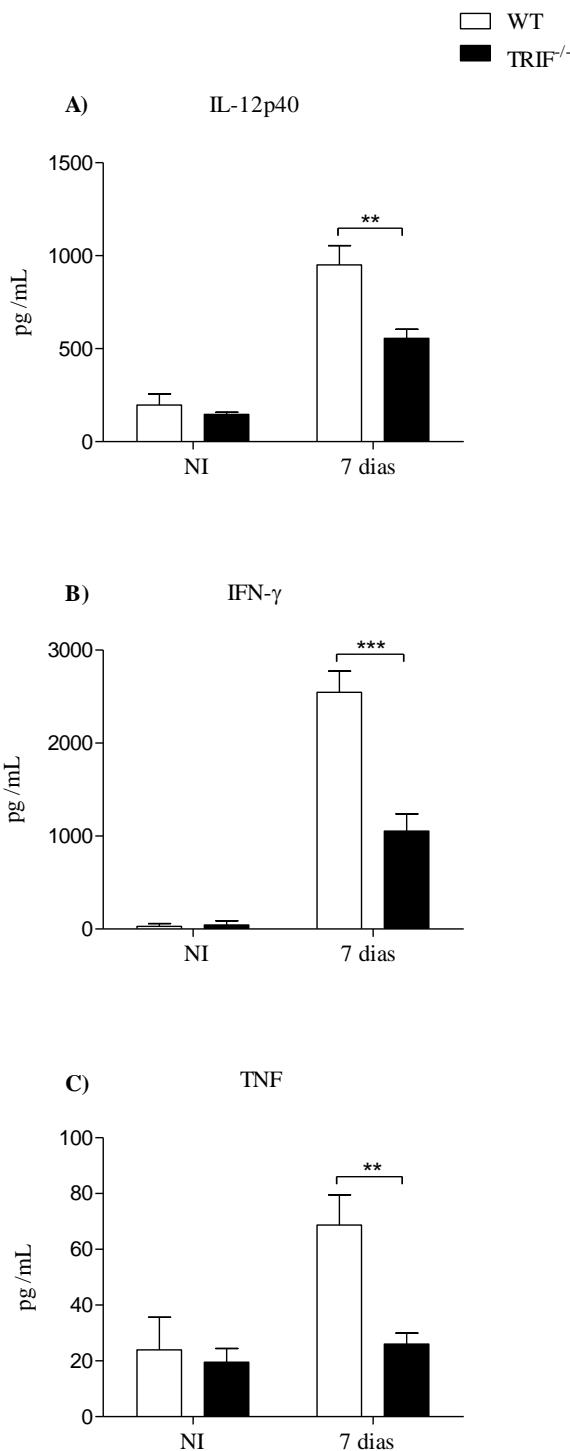


Figura 8: Quantificação da produção de citocinas IL-12p40 (A), IFN- γ (B) e TNF (C) por ELISA no homogenato dos pulmões de camundongos WT e TRIF^{-/-} ($n = 5$) após 7 dias de infecção com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, analisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni e são representativos de três experimentos independentes. (** P < 0.01, *** P < 0.001).

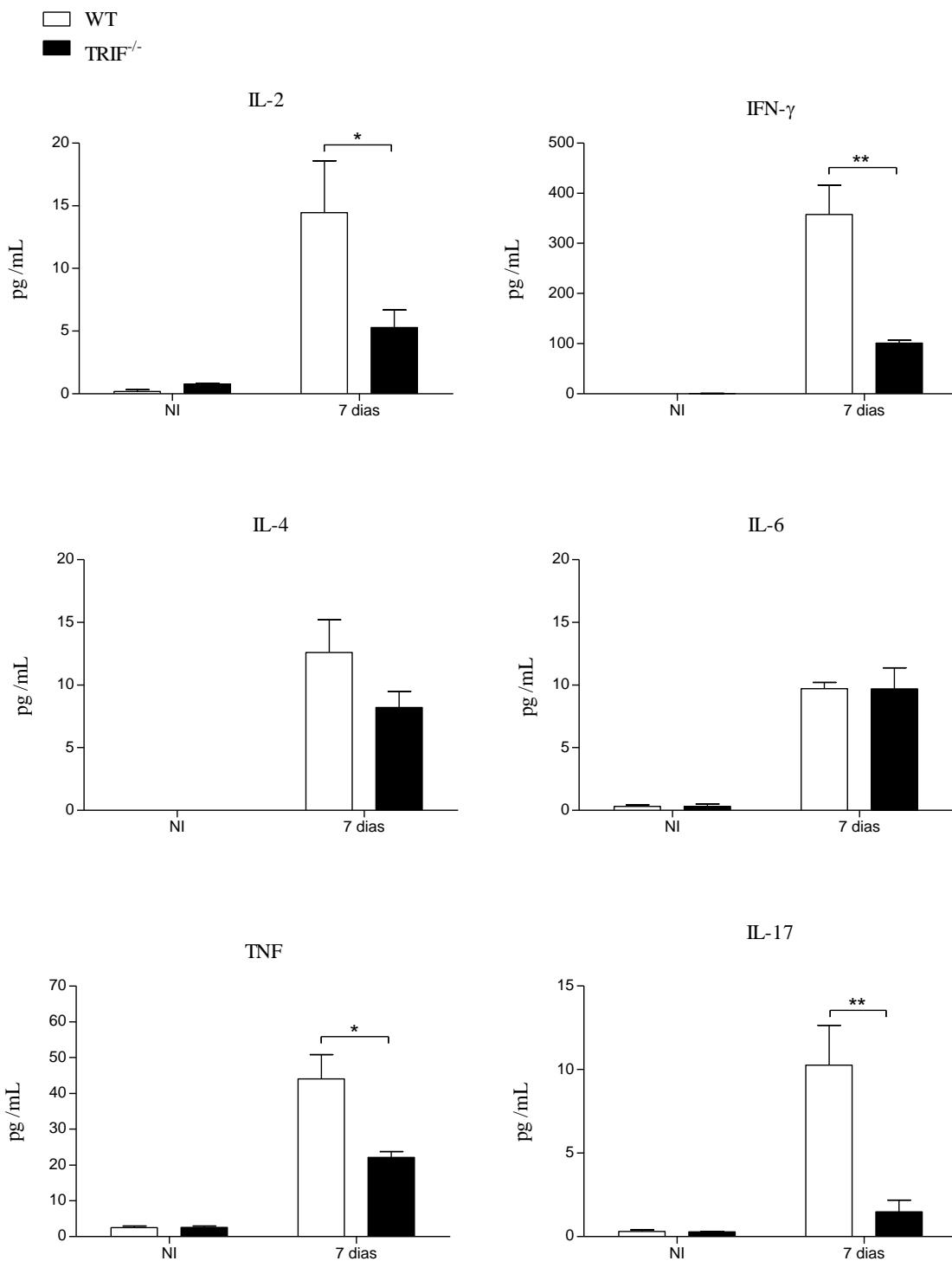


Figura 9: Análise por CBA da produção de citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6, TNF e IL-17 no soro de camundongos WT e TRIF^{-/-} ($n = 5$) 7 dias após infecção com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, nalisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni e são representativos de três experimentos independentes (*P<0,1 **P<0,01).

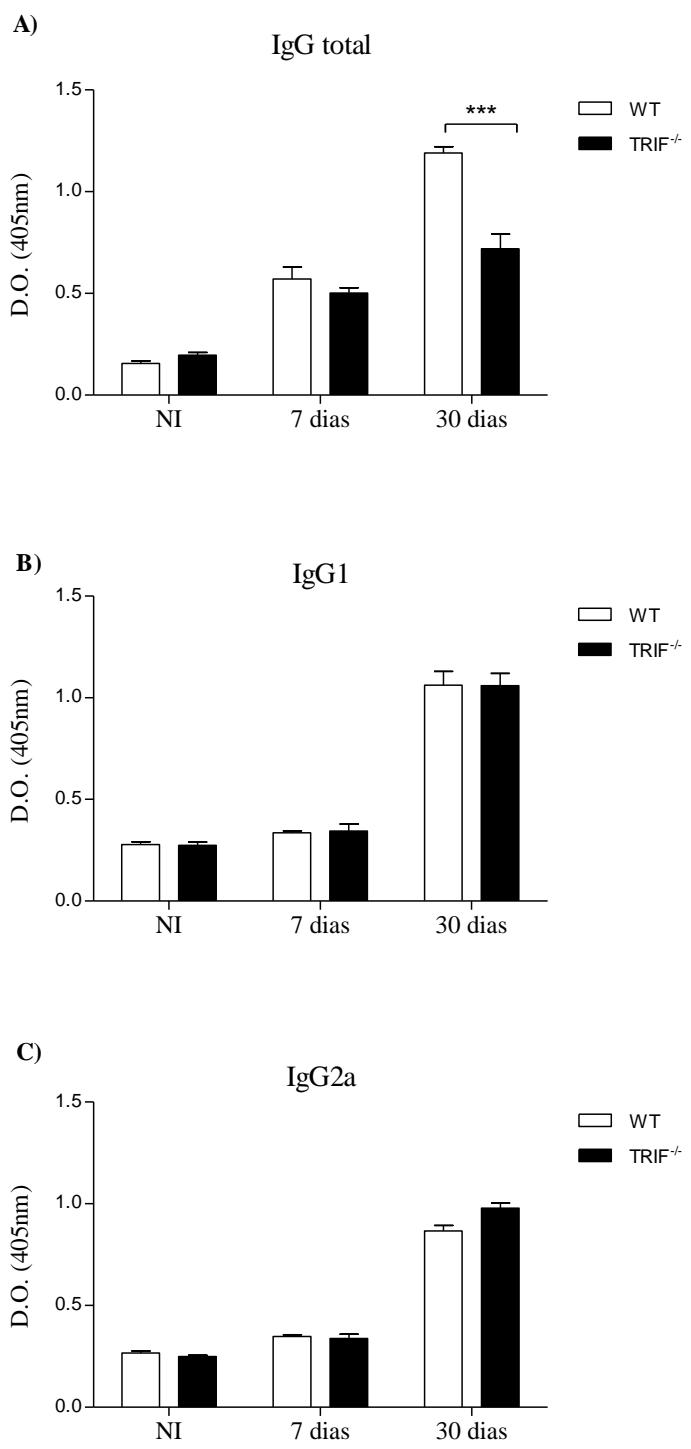


Figura 10: Quantificação da cinética de produção de IgG, IgG1 e IgG2a anti- *N. caninum* no soro de camundongos WT e TRIF^{-/-} ($n = 5$) infectados com 5×10^6 taquizoítos. As dosagens foram realizadas por ELISA, 7 e 30 dias após a infecção. Valores são mostrados como densidade óptica (D.O.) e foram obtidos a 405nm. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, analisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni e são representativos de três experimentos independentes (**P<0,001).

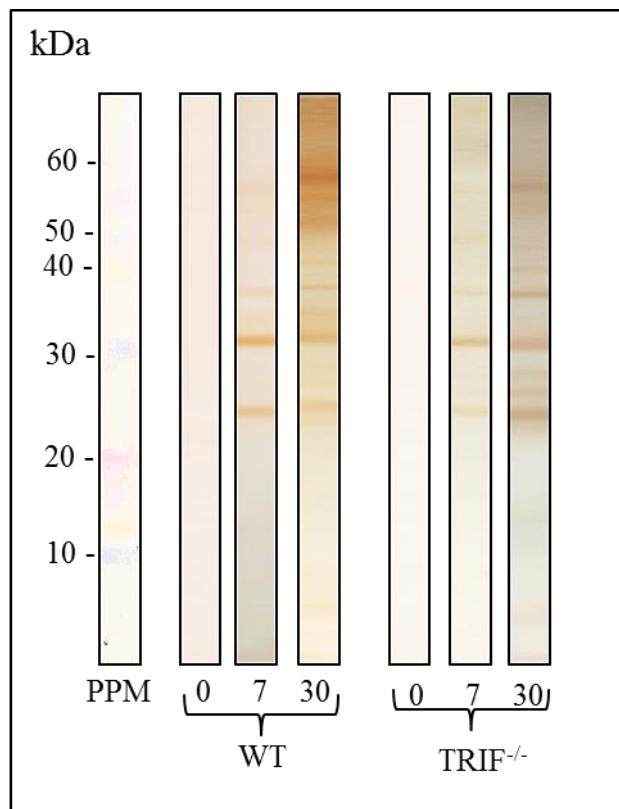


Figura 11: *Western blotting* para avaliação do perfil de reconhecimento de抗ígenos de *N. caninum*. Imagem representativa de soros de camundongos WT e *TRIF*^{-/-} infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. O reconhecimento antigenico foi mensurada 0, 7 e 30 dias pós-infecção em soros de ambos os grupos. PPM: marcador de peso molecular. Marcadores moleculares são indicados em kiloDalton (kDa).

5.5 A presença de TRIF limita a replicação parasitária e a inflamação tecidual

Com o objetivo de se verificar o quanto TRIF atua no controle do crescimento parasitário *in vivo*, foi realizada quantificação de cópias do DNA genômico de *N. caninum* presentes em diferentes tecidos nas diferentes fases da infecção (**Figura 12**). Nós observamos que os camundongos TRIF^{-/-} apresentaram alta carga parasitária nas células do lavado peritoneal com 1 e 7 dias de infecção, nos pulmões com 7 dias de infecção, e no cérebro na fase crônica, quando comparados ao grupo WT. No fígado não foram vistas diferenças significantes de carga parasitária entre os grupos analisados.

As fotomicrografias representativas dos cortes histológicos revelaram que os pulmões dos animais TRIF^{-/-} estavam notavelmente mais afetados que os do grupo WT 7 dias após a infecção, apresentando uma significativa perda da estrutura tecidual induzida por várias regiões de infiltrado inflamatório. Embora muitos focos inflamatórios tenham sido observados em amostras de fígado e cérebro de animais WT e TRIF^{-/-}, nenhuma diferença foi notada entre estes órgãos dos diferentes grupos (**Figura 13**).

A partir destes resultados foi realizada posteriormente uma análise de sobrevivência do hospedeiro na presença e na ausência de TRIF, durante uma infecção realizada com a inoculação de grandes quantidades de taquizoítas de *N. caninum*. Para isso, camundongos WT e TRIF^{-/-} foram infectados com 1×10^7 taquizoítos e acompanhados durante 30 dias. Foi observado que somente 40% dos animais TRIF^{-/-} sobreviveram, enquanto 80% dos WT resistiram ao protocolo de infecção severa. Entretanto, esta diferença não foi considerada estatisticamente significante (**Figura 14**).

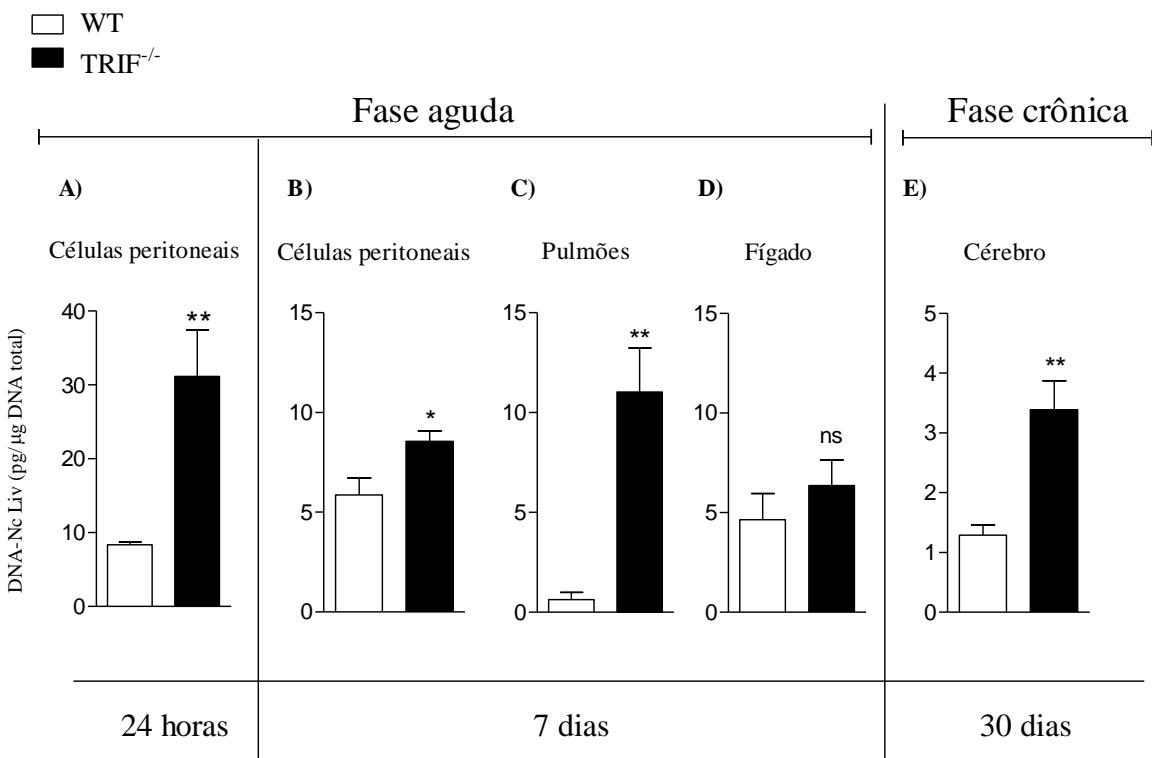


Figura 12: Quantificação da carga parasitária em animais WT e TRIF^{-/-}. Camundongos WT e TRIF^{-/-} foram infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* e sacrificados para coleta de lavado peritoneal, pulmão e fígado e tecido cerebral. Os dados foram obtidos a partir da reação de qPCR pela amplificação do gene Nc5. Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados através do teste de Mann Whitney. (*P<0,1 **P<0,01).

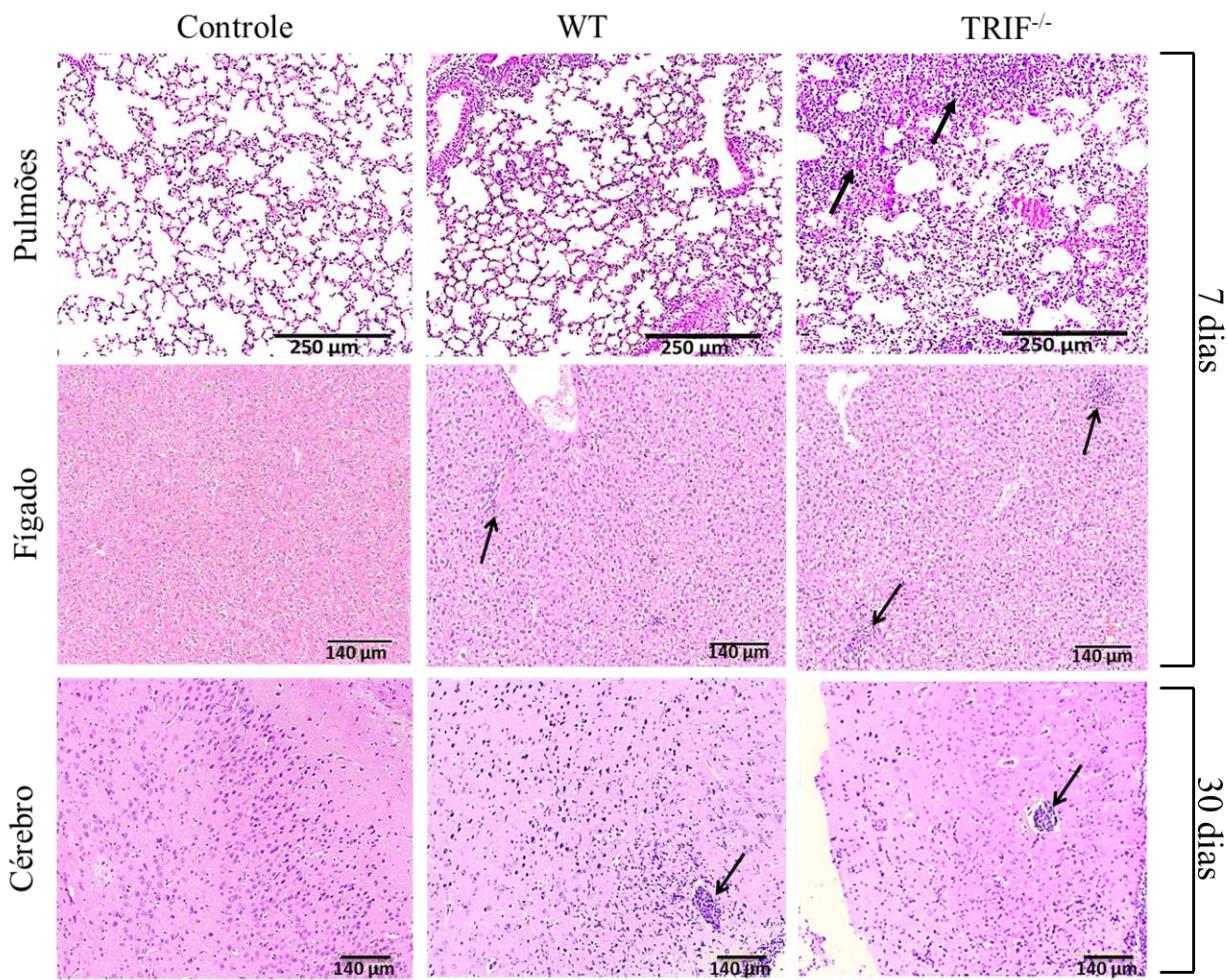


Figura 13: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos obtidos de camundongos WT e TRIF^{-/-} ($n = 5$) infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. As amostras de tecidos pulmonar e hepático foram coletados com 7 dias de infecção e as de tecido cerebral com 30 dias de infecção. Setas pretas indicam áreas de infiltrado celular inflamatório. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina e analisadas ao microscópio óptico (Aumento de 10x).

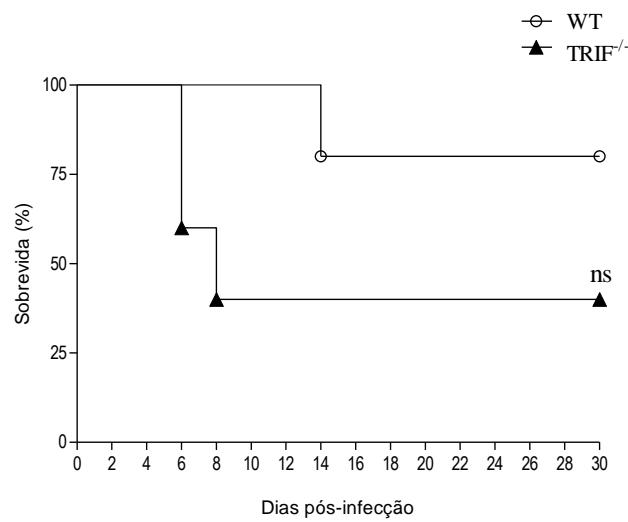


Figura 14: Curva de sobrevida de camundongos WT e $\text{TRIF}^{-/-}$ ($n = 5$) monitorados por 30 dias após infecção com 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum*. As diferenças entre os grupos foram comparadas usando análise de sobrevivência por Kaplan Meier, através do teste de log-rank. NS: não significante estatisticamente ($P=0.1188$).

Discussão

6 DISCUSSÃO

Neospora caninum é o parasito intracelular obrigatório que causa a neosporose e tem grande importância médica-veterinária. Esta doença parasitária causa paralisia neuromuscular em cães e aborto em bovinos, gerando impactos econômicos em países como o Brasil, que são dependentes da exportação de carne e laticínios. Com o objetivo de prevenir a disseminação da neosporose, o entendimento tanto da modulação da resposta imune gerada por este parasito, quanto da participação de moléculas do hospedeiro na resistência contra a infecção são de suma importância a fim de se estabelecer protocolos profiláticos e/ou terapêuticos (REICHEL et al., 2014).

MyD88 foi previamente descrito como uma importante molécula adaptadora requerida para resistência contra a infecção por *N. caninum* (MINEO; BENEVIDES; et al., 2009) porém pouco se sabe a respeito da participação de TRIF nesta infecção. Além disso, um estudo recente demonstrou que este parasito é um forte indutor de citocinas pertencentes ao grupo IFN-I, que possuem principalmente uma ação anti-viral e são diretamente influenciadas pela presença de TRIF (BEITING et al., 2014). Logo, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel da molécula adaptadora TRIF da via de ativação de TLR3 e TLR4 na infecção pelo protozoário *N. caninum*.

Como esperado, foi demonstrado neste estudo que a deleção gênica de TRIF em macrófagos estimulados com *N. caninum* reduz a expressão não só desta molécula, mas também das citocinas envolvidas na sua via de sinalização, IFN- α e principalmente IFN- β , quando comparados a macrófagos WT. Similarmente, em um estudo realizado em 2016 utilizando células mesoteliais, que atuam como uma barreira protetora contra patógenos invasivos, foi visto que o estímulo com poli I:C, um agonista de TLR3, induz a expressão do mRNA de IFN- β nas células WT, no entanto, essa indução foi significativamente reduzida em células deficientes para TRIF (HWANG et al., 2016). Em outros tipos de infecções, como pelas bactérias *Listeria monocytogenes* e *Chlamydia muridarum* foi observado que em macrófagos peritoneais e de medula óssea, a ausência de TRIF também reduz significativamente a expressão de IFN- β , demonstrando a estrita relação da molécula adaptadora com esta citocina (AUBRY et al., 2012; PRANTNER; DARVILLE; NAGARAJAN, 2010).

O desenvolvimento de uma resposta imune Th1 adequada é considerado de primordial importância para a proteção contra parasitos intracelulares como *N. caninum*. Deste modo, nós avaliamos a capacidade de macrófagos TRIF^{-/-} de produzir citocinas envolvidas na resposta protetora do hospedeiro contra este parasito. Foi observado que macrófagos TRIF^{-/-} apresentam produção diminuída de IL-12p40, TNF e IL-10 quando infectados por *N. caninum*. Do mesmo modo, macrófagos peritoneais primados com LPS, ligante de TLR4, na ausência de TRIF apresentaram significativa redução nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e TNF (YAMAMOTO et al., 2003).

Ao se relacionar os resultados obtidos, foi visto que na ausência de TRIF, tanto IFN- α quanto IL-12p40 possuem seus níveis reduzidos em macrófagos estimulados com *N. caninum* quando comparados a células WT e estas duas citocinas já foram descritas como atuantes conjuntas na capacidade de fagócitos mononucleares de estimular células T (DALOD et al., 2002; MACATONIA et al., 1995). Confirmado esta hipótese, Wonderlich e colaboradores demonstraram que em uma infecção viral que naturalmente suprime a produção de IFN- α e IL-12, a reposição destas citocinas recombinantes juntas reestabelece totalmente a capacidade de macrófagos de estimular linfócitos T (WONDERLICH et al., 2015).

As baixas concentrações de TNF encontradas em nosso trabalho nos macrófagos TRIF^{-/-} se devem ao fato de que a molécula adaptadora TRIF está associada a produção desta citocina pró-inflamatória pela via de ativação de NF- κ B, embora seja em menores níveis e mais atrasada do que a produção mediada por MyD88 (CALDWELL et al., 2014; LEICHTLE et al., 2009). Além disso, a via de produção de IFN-I está relacionada na mediação das respostas de TLR que são mais imediatas à infecção, como é o caso da produção de TNF (TRINCHIERI; SHER, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados utilizando células dendríticas deficientes para TRIF infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*, nas quais os níveis de TNF foram significativamente menores do que nas células WT (KIM et al., 2015). Em outro estudo, foi observado que o bloqueio de TRAM, molécula que intercepta a ligação de TRIF a TLR4, por meio de siRNA reduziu a produção de TNF por macrófagos estimulados com um mix de 8 cepas de bactérias, demonstrando a participação da via TRIF/TLR4 na produção desta citocina (LUAN et al., 2014).

Em relação à produção reduzida de IL-10 por macrófagos TRIF^{-/-} infectados com *N. caninum*, pode-se sugerir que TRIF também esteja envolvido na via de produção desta citocina regulatória, visto que, de modo contrário, células MyD88^{-/-} apresentaram alta produção de IL-10

quando infectadas pelo mesmo parasito (MINEO; BENEVIDES; et al., 2009). Alguns estudos demonstraram que a produção de IL-10 induzida por LPS em BMDMs é dependente da produção de IFN-I e de TRIF (CHANG et al., 2007; IYER; GHAFFARI; CHENG, 2010; KROETZ et al., 2015). Outros autores defendem que MyD88 seria, indiretamente, a molécula adaptadora principal na produção de IL-10 pela sua influência direta na produção de IL-12, de modo que a ausência total de IL-12 em macrófagos MyD88^{-/-} favorece a ligação de subunidades do fator de transcrição NF-κB ao promotor de IL-10, resultando na sua produção elevada nos BMDMs MyD88^{-/-} (MUKHERJEE et al., 2015). Neste sentido, a indução desta citocina pelas diversas vias de sinalização dos TLRs deve ser melhor estudada.

Com o objetivo de se avaliar a influência direta de IFN-α e IFN-β na produção de IL-12 e TNF, importantes citocinas pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da resposta imune contra *N. caninum*, nós tratamos macrófagos WT e TRIF^{-/-} com IFN-α e IFN-β recombinantes. Foi visto que IFN-α é a citocina dependente de TRIF que mais interfere na produção de IL-12p40, a qual é extremamente importante na resistência à infecção (MINEO; BENEVIDES; et al., 2009). Do mesmo modo, em outro estudo realizado com células dendríticas derivadas de medula óssea, foi demonstrado que o tratamento com IFN-α induziu altos níveis de IL-12 e TNF secretados por essas células (SONG et al., 2013). Além disso, sabe-se que a atuação conjunta de IFN-α e IL-12 pode recrutar células tais como macrófagos e células NK e elevar os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias, gerando um ciclo de *feedback positivo*, ou seja, células NK podem secretar IFN-γ, que pode, em seguida, induzir a maturação de células dendríticas e, como resultado, aumentar a produção de IL-12 para que seja formada uma interação imune em busca da homeostasia (HU, J. et al., 2013; SAADOUN et al., 2014).

Nos nossos experimentos *in vivo*, foi observado que os animais TRIF^{-/-} infectados com dose sub-lethal de taquizoítos de *N. caninum* apresentaram baixos níveis das citocinas IL-12p40, IFN-γ e TNF no lavado peritoneal e nos pulmões, e IL-2, IFN-γ, TNF e IL-17 tiveram menor produção no soro de camundongos TRIF^{-/-} em relação aos WT. Resultados similares foram encontrados em camundongos deficientes para MyD88, os quais apresentaram reduções ainda maiores nos níveis de citocinas pró-inflamatórias em relação ao animal do tipo selvagem, quando infectados por *N. caninum* (MINEO; BENEVIDES; et al., 2009). Tendo em vista esses resultados, pode-se sugerir que MyD88 e TRIF atuam conjuntamente na produção de citocinas importantes no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra este parasito.

Comprovando essa hipótese, um estudo realizado com animais duplo knockouts para MyD88 e TRIF demonstrou que a produção de IL-12, IL-6 e IL-10 é reduzida a níveis basais quando BMDMs são estimulados com bactérias intestinais (REIM et al., 2011).

Em comparação, outros estudos demonstraram que camundongos TRIF^{-/-} quando estimulados com poli:IC apresentam produção significativamente menor de IL-12p40 no soro (OYANG et al., 2007), e quando infectados com *E.coli* possui baixos níveis de TNF, IL-6 e TGF-β no lavado peritoneal (CUENCA et al., 2015) quando comparados aos níveis de produção do camundongo do tipo selvagem.

Estudos recentes indicam que a infecção por *N. caninum* induz a sinalização via TLR3 e TRIF gerando respostas por IFN-I, e essa indução é primariamente causada pela ligação do RNA do parasito ao receptor. IFN-I (α/β) por sua vez, pode estimular a produção de IFN-γ, sendo por isso, considerado um possível alvo para indução de uma resposta imune do tipo Th1 protetora ao hospedeiro (BEITING et al., 2014). IFN-I e IFN-γ possuem efeitos redundantes em vários tipos celulares, com a possibilidade de *crosstalk* durante infecções por protozoários. Em condições homeostáticas, essa “ligação cruzada” é benéfica ao hospedeiro por causar uma produção basal de IFN-I, a qual pode estimular as células a desenvolver respostas apropriadas para todos os tipos de interferons (GOUGH et al., 2010). Além disso, a via de sinalização TLR3/TRIF/IFN- I indiretamente influencia a produção de IL-10 por ação do receptor de interferon α/β (IFNAR), o qual pode ativar a expressão de IL-27, que por sua vez, induz a produção de IL-10 por células T e a expansão de células T regulatórias (IYER et al., 2010; PRODHOMME; ZAMVIL, 2008).

Em relação à produção de IL-17 foi encontrada uma baixa concentração no soro dos camundongos TRIF^{-/-} em relação aos WT, que define uma fraca resposta imune Th17. Alguns resultados da literatura são conflitantes, visto que há evidências que TRIF é requerido para o desenvolvimento da resposta imune Th17 induzida por LPS, envolvendo a ativação sequencial de IRF-3 e produção de IFN-I (HSIA et al., 2015). Em contraste, no modelo utilizado para doença auto-imune no sistema nervoso central de camundongos foi visto que a indução de IFN-I dependente de TRIF restringe a diferenciação de células Th17 *in vitro* e *in vivo*, prejudicando o desenvolvimento de resposta do tipo Th17 (GUO; CHANG; CHENG, 2008).

Foi demonstrado em nossos resultados que TRIF modula positivamente a síntese de óxido nítrico, visto que no lavado peritoneal dos camundongos TRIF^{-/-} foram encontradas baixas concentrações de nitrato/nitrito. Experimentos *in vitro* indicam que a expressão gênica de iNOS

(óxido nítrico sintase) não é detectada e a síntese de NO é totalmente prejudicada em células peritoneais murinas deficientes para TRIF em comparação com células WT quando estimuladas com poli:IC ou LPS (HWANG et al., 2016). Há evidências que TRIF participa não somente da produção de NO, mas também de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos via receptor TLR3 (YANG, C. S. et al., 2013).

Um estudo realizado por Yanagibashi e colaboradores (2015) sugere que TRIF atua na resposta imune humoral por modular a proliferação de células B com *up-regulation* de CD86 (YANAGIBASHI et al., 2015). Além disso, outros trabalhos tem mostrado que a participação de TRIF na dinâmica de células B é mediada por TLR3, e não por TLR4 (BARRIO; SAEZ DE GUINOA; CARRASCO, 2013). Quanto à produção de anticorpos antígeno-específicos, nós observamos em nossos resultados que camundongos TRIF^{-/-} produzem quantidades menores de IgG anti-*N. caninum* que animais WT após 30 dias de infecção. Assim, pode-se sugerir que TRIF atua na resposta imune humoral anti-*N. caninum* por meio de ativação do receptor TLR3. Foi descrito em 2007 que o perfil de reconhecimento antigênico de anticorpos anti-*N. caninum* por soros de cães experimentalmente infectados baseia-se no reconhecimento principal de uma banda de 29-32 kDa (SILVA et al., 2007), assim como mostrado em nossos resultados com soros de camundongos WT experimentalmente infectados. Em relação ao soro TRIF^{-/-} foi visto que há uma falha no reconhecimento de抗ígenos com peso molecular acima de 50kDa.

Como observado para MyD88, que participaativamente no controle da mortalidade, morbidade e parasitismo de camundongos infectados com *N. caninum* (MINEO; BENEVIDES; et al., 2009), nossos resultados mostraram que TRIF está também relacionado à regulação de respostas imunes efetoras do hospedeiro, visto que camundongos TRIF^{-/-} apresentaram altos níveis de parasitismo associados a baixas concentrações de IFN-γ e NO, que são essenciais para a eliminação do parasita. Adicionalmente, foi observada uma inflamação tecidual intensa no pulmão na ausência de TRIF com perda da estrutura dos alvéolos pulmonares associado a uma alta taxa de mortalidade desses camundongos infectados com *N. caninum*.

Por induzir respostas protetoras do tipo Th1, TRIF já foi descrito como atuante no controle da replicação de parasitos. No caso de infecções pelo protozoário *Cryptosporidium parvum*, camundongos WT imunizados com poli:IC apresentaram carga parasitária intestinal significativamente reduzida quando comparada ao grupo não tratado. Camundongos TLR3^{-/-} e TRIF^{-/-} foram imunizados e infectados da mesma maneira, tendo como resultado a mesma carga

parasitária no intestino encontrada nos grupos *knockouts* não tratados, indicando a importância da via TRIF/TLR3 no controle da replicação parasitária. Além disso, foi evidenciado que IFN-I é fortemente induzido por poli:IC e participa também no controle parasitário, visto que camundongos IFNR^{-/-} não reduziram a carga parasitária no intestino após a injeção de poli:IC (LANTIER et al., 2014).

A importância de TRIF e IFN-I no controle do parasitismo foi demonstrada também no modelo de infecção pelo parasito *Trypanosoma cruzi* utilizando camundongos MyD88^{-/-} TRIF^{-/-} e MyD88^{-/-}IFNAR1^{-/-}, os quais foram altamente susceptíveis à infecção em relação ao controle da carga parasitária. Estes resultados indicam que a indução dependente de MyD88 de citocinas pró-inflamatórias e a dependente de TRIF para produção de IFN-β juntas contribuem para respostas imunes inata e consequente controle do parasitismo anti-*T. cruzi* (KOGA et al., 2006).

Hsia e colaboradores obtiveram resultados nos quais camundongos TRIF^{-/-} apresentaram grandes danos pulmonares devido à habilidade reduzida de suas células dendríticas em suportar a polarização da resposta imune para um perfil Th1 pró-inflamatório (HSIA et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, visto que os animais geneticamente deficientes para TRIF apresentaram extensos danos no tecido pulmonar associados com baixa concentração de IFN-γ, um marcador de respostas imunes Th1, com 7 dias de infecção por *N.caninum*. Em concordância, nós observamos que a ausência de TRIF leva a uma produção diminuída de IL-12p40, IFN-γ e NO, indicando que a via dependente de TRIF atua no controle da fase aguda da doença por meio da indução de resposta imune Th1 específica, juntamente com MyD88 (MINEO; BENEVIDES; et al., 2009).

Em um estudo recente de infecção pelo vírus Coxsackievirus A16 (CVA16) foi visto que a sinalização via TRIF protege camundongos da invasão viral no sistema nervoso central, de modo que, o cérebro dos animais TRIF^{-/-} apresentou danos teciduais muito mais severos que os dos WT, contrastando com os resultados obtidos em nosso estudo de infecção com o parasito *N. caninum*, no qual não houve diferenças a nível de focos inflamatórios entre os grupos. No entanto, similarmente aos resultados por nós obtidos, os resultados com CVA16 mostraram que os camundongos TRIF^{-/-} apresentaram aumento significativo de carga parasitária no cérebro em relação aos WT, indicando que a sinalização de TRIF em camundongos é essencial para a imunidade protetora contra a invasão de ambos os patógenos no tecido cerebral (YANG, J. et al., 2015). No modelo experimental de infecção em camundongos pelo vírus West Nile (WNV),

causador de encefalite, camundongos MyD88/TRIF^{-/-} apresentaram alta susceptibilidade ao vírus devido a uma redução na expressão de citocinas com propriedades inflamatórias, como IFN- α , TNF e IL6. Além disso, a carga viral no tecido cerebral dos camundongos MyD88/TRIF^{-/-} foi notavelmente maior em comparação aos animais WT (SABOURI et al., 2014). Dessa forma, é importante ressaltar novamente que a ação conjunta de MyD88 e TRIF é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune capaz de eliminar o patógeno e evitar danos teciduais.

Vários estudos comprovam a importância de TRIF na sobrevida do hospedeiro, como no modelo de indução de sepse bacteriana em camundongos, no qual 50% dos animais WT sobreviveram à infecção, enquanto apenas 25% dos animais deficientes para TRIF permaneceram vivos ao final do experimento (REIM et al., 2011). Em estudos virais foram encontradas taxas de 100% de mortalidade para camundongos TRIF^{-/-} e TLR3^{-/-} em comparação a 40% de sobrevida de animais WT (SABOURI et al., 2014; YANG, J. et al., 2015). Resultado já esperado visto que a via de sinalização TRIF/TLR3 é classicamente descrita como atuante primordial na defesa anti-viral devido à produção de IFN-I (IJICHI et al., 1995; JACKSON, 2015; MIESCHER-GRANGER et al., 1985; STIFTER et al., 2016). Em nossos resultados, analisando a sobrevivência do hospedeiro na ausência de TRIF pudemos observar que somente 40% dos animais TRIF^{-/-} sobreviveram, enquanto 80% dos WT resistiram ao protocolo de infecção com *N. caninum*. Apesar deste resultado não ter sido considerado relevante estatisticamente, biologicamente é notável que TRIF é capaz de conferir resistência ao hospedeiro, já que esta molécula adaptadora regula a produção de citocinas importantes para o estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório que possa eliminar o parasito e também regulatório, a fim de evitar danos teciduais exagerados.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A presença de TRIF aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias;
- IFN- α dependente de TRIF modula positivamente a produção de IL-12p40;
- TRIF regula a produção de anticorpos IgG específicos anti-*N. caninum*;
- TRIF induz resistência ao hospedeiro por controlar a replicação parasitária aguda e crônica, bem como os danos teciduais demasiados oriundos de processo inflamatório.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a molécula adaptadora TRIF é requerida para a resistência contra a infecção induzida por *N. caninum*, uma vez que participa na indução de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 e na resposta imune humoral eficientes, bem como controla o parasitismo e a inflamação tecidual.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. **Research in veterinary science**, v. 95, p. 303-309, 2013.

ALMERIA, S. et al. Maternal and fetal immune response patterns in heifers experimentally infected with *Neospora caninum* in the second trimester of pregnancy--a descriptive study. **Veterinary parasitology**, v. 204, p. 146-152, 2014.

AUBRY, C. et al. Both TLR2 and TRIF contribute to interferon-beta production during Listeria infection. **PloS one**, v. 7, p. e33299, 2012.

BAI, W. et al. TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K/AKT signaling pathway. **Cellular signalling**, v. 26, p. 942-950, 2014.

BARBER, J. S. et al. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). **Parasitology**, v. 111 (Pt 5), p. 563-568, 1995.

BARRIO, L.; SAEZ DE GUINOA, J.; CARRASCO, Y. R. TLR4 signaling shapes B cell dynamics via MyD88-dependent pathways and Rac GTPases. **Journal of immunology**, v. 191, p. 3867-3875, 2013.

BEITING, D. P. et al. Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species. **PloS one**, v. 9, p. e88398, 2014.

BENAVIDES, J. et al. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. **Veterinary research**, v. 43, p. 83, 2012.

BRANDAO, I. et al. TLR5 expression in the small intestine depends on the adaptors MyD88 and TRIF, but is independent of the enteric microbiota. **Gut microbes**, v. 6, p. 202-206, 2015.

BRICKELL, J. S.; MCGOWAN, M. M.; WATHES, D. C. Association between *Neospora caninum* seropositivity and perinatal mortality in dairy heifers at first calving. **The Veterinary record**, v. 167, p. 82-85, 2010.

BRONEVETSKY, Y. et al. T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, p. 417-432, 2013.

CALDWELL, A. B. et al. Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF. **Genes & development**, v. 28, p. 2120-2133, 2014.

CHANG, E. Y. et al. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. **Journal of immunology**, v. 178, p. 6705-6709, 2007.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and immunity**, v. 74, p. 2491-2494, 2006.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

CORREIA, A. et al. Predominant role of interferon-gamma in the host protective effect of CD8(+) T cells against *Neospora caninum* infection. **Scientific reports**, v. 5, p. 14913, 2015.

CUENCA, A. G. et al. TRIF-dependent innate immune activation is critical for survival to neonatal gram-negative sepsis. **Journal of immunology**, v. 194, p. 1169-1177, 2015.

DALOD, M. et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, p. 517-528, 2002.

DE MAGALHAES, V. C. et al. Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 202, p. 257-264, 2014.

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, v. 4, p. 216-238, 2015.

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

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International journal for parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of comparative pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 181, p. 382-387, 2011.

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

DUBEY, J. P. et al. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992.

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

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. **The Journal of parasitology**, v. 91, p. 1217-1218, 2005.

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

EIRAS, C. et al. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive veterinary medicine**, v. 98, p. 128-132, 2011.

GALLEGO, C. et al. Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of Leishmania (Viannia) panamensis. **Infection and immunity**, v. 79, p. 2871-2879, 2011.

GANDHAPUDI, S. K.; CHILTON, P. M.; MITCHELL, T. C. TRIF is required for TLR4 mediated adjuvant effects on T cell clonal expansion. **PloS one**, v. 8, p. e56855, 2013.

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.

GOUGH, D. J. et al. Functional crosstalk between type I and II interferon through the regulated expression of STAT1. **PLoS biology**, v. 8, p. e1000361, 2010.

GUO, B.; CHANG, E. Y.; CHENG, G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, p. 1680-1690, 2008.

HEMPHILL, A.; AGUADO-MARTINEZ, A.; MULLER, J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**, p. 1-15, 2015.

HOEBE, K. et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. **Nature immunology**, v. 4, p. 1223-1229, 2003.

HSIA, B. J. et al. Trif-dependent induction of Th17 immunity by lung dendritic cells. **Mucosal immunology**, v. 8, p. 186-197, 2015.

HU, J. et al. The effects of chemotherapeutic drugs on human monocyte-derived dendritic cell differentiation and antigen presentation. **Clinical and experimental immunology**, v. 172, p. 490-499, 2013.

HU, W. et al. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, p. 13994-13999, 2015.

HWANG, E. H. et al. Toll/IL-1 domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) mediates innate immune responses in murine peritoneal mesothelial cells through TLR3 and TLR4 stimulation. **Cytokine**, v. 77, p. 127-134, 2016.

IJICHI, S. et al. Anti-viral and immunomodulatory effects of interferon-alpha on cultured lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **Journal of neuroimmunology**, v. 61, p. 213-221, 1995.

IYER, S. S.; GHAFFARI, A. A.; CHENG, G. Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. **Journal of immunology**, v. 185, p. 6599-6607, 2010.

JACKSON, W. T. Viruses and the autophagy pathway. **Virology**, v. 479-480, p. 450-456, 2015.

JESUS, E. E. et al. Effects of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Experimental parasitology**, v. 133, p. 269-274, 2013.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KIM, T. H. et al. Critical role of TRIF and MyD88 in Mycobacterium tuberculosis Hsp70-mediated activation of dendritic cells. **Cytokine**, v. 71, p. 139-144, 2015.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v. 40, p. 945-950, 2010.

KOGA, R. et al. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi. **Journal of immunology**, v. 177, p. 7059-7066, 2006.

LANTIER, L. et al. Poly(I:C)-induced protection of neonatal mice against intestinal Cryptosporidium parvum infection requires an additional TLR5 signal provided by the gut flora. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, p. 457-467, 2014.

LEICHTLE, A. et al. The toll-Like receptor adaptor TRIF contributes to otitis media pathogenesis and recovery. **BMC immunology**, v. 10, p. 45, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONGHI, M. P. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, p. 1589-1602, 2009.

LUAN, H. et al. OM85-BV induced the productions of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha via TLR4- and TLR2-mediated ERK1/2/NF-kappaB pathway in RAW264.7 cells. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 34, p. 526-536, 2014.

MACATONIA, S. E. et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. **Journal of immunology**, v. 154, p. 5071-5079, 1995.

MANSILLA, F. C. et al. Immunization with *Neospora caninum* profilin induces limited protection and a regulatory T-cell response in mice. **Experimental parasitology**, v. 160, p. 1-10, 2015.

MARCAIS, A. et al. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 450, 2013.

MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PloS one**, v. 5, p. e15263, 2010.

MASUDA, T. et al. Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Veterinary parasitology**, v. 149, p. 130-133, 2007.

MCALLISTER, C. S. et al. TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival in vivo. **Journal of immunology**, v. 190, p. 418-427, 2013.

MIESCHER-GRANGER, S. et al. Biological activities of human recombinant interferon alpha/beta targeted by anti-Epstein-Barr virus monoclonal antibodies. **FEBS letters**, v. 179, p. 29-33, 1985.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1^a edição, ed. EDUFU, 2005. p. 183-201.

MINEO, T. W. et al. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary research**, v. 40, p. 32, 2009.

MINEO, T. W. et al. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary parasitology**, v. 159, p. 149-153, 2009.

MINEO, T. W. et al. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and cell biology**, v. 88, p. 825-833, 2010.

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

MOORE, D. P. et al. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Veterinary parasitology**, v. 175, p. 245-251, 2011.

MOSKWA, B. et al. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology research**, v. 100, p. 633-636, 2007.

MUKHERJEE, B. et al. Antimony-Resistant *Leishmania donovani* Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. **Journal of immunology**, v. 195, p. 2731-2742, 2015.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, p. 723-737, 2011.

NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. **Experimental parasitology**, v. 104, p. 149-158, 2003.

NASCIMENTO, E. E. et al. Anti-*Neospora caninum* antibody detection and vertical transmission rate in pregnant zebu beef cows (*Bos indicus*): *Neospora caninum* in pregnant beef cows (*Bos indicus*). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 37, p. 267-270, 2014.

NILSEN, N. J. et al. A role for the adaptor proteins TRAM and TRIF in toll-like receptor 2 signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, p. 3209-3222, 2015.

NOGAREDA, C. et al. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. **Veterinary parasitology**, v. 148, p. 193-199, 2007.

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, p. 353-364, 2007.

OKANO, M. et al. Regulatory effect of TLR3 signaling on staphylococcal enterotoxin-induced IL-5, IL-13, IL-17A and IFN-gamma production in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, 2015.

OLDENBURG, M. et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. **Science**, v. 337, p. 1111-1115, 2012.

OSHIUMI, H. et al. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. **Nature immunology**, v. 4, p. 161-167, 2003.

OUYANG, X. et al. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 354, p. 1045-1051, 2007.

PADWAL, M. K.; SARMA, U.; SAHA, B. Comprehensive logic based analyses of Toll-like receptor 4 signal transduction pathway. **PloS one**, v. 9, p. e92481, 2014.

PROD'HOMME, T.; ZAMVIL, S. S. Bench to bedside: tempering antigen-presenting cells in multiple sclerosis. **Nature medicine**, v. 14, p. 614-615, 2008.

RAETZ, M. et al. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to Toxoplasma gondii profilin. **Journal of immunology**, v. 191, p. 4818-4827, 2013.

REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Veterinary research**, v. 45, p. 10, 2014.

REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *Neospora caninum* tachyzoite immunome study reveals differences among three biologically different isolates. **Veterinary parasitology**, v. 212, p. 92-99, 2015.

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International journal for parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013.

REICHEL, M. P.; 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, p. 1173-1187, 2009.

REICHEL, M. P. et al. A review of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary parasitology**, v. 212, p. 75-79, 2015.

REICHEL, M. P. et al. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, p. 1455-1470, 2014.

REIM, D. et al. Improved host defense against septic peritonitis in mice lacking MyD88 and TRIF is linked to a normal interferon response. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, p. 613-620, 2011.

RODRIGUEZ-PRADOS, J. C. et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. **Journal of immunology**, v. 185, p. 605-614, 2010.

ROJO-MONTEJO, S. et al. 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, p. 49, 2009.

ROSADINI, C. V. et al. A Single Bacterial Immune Evasion Strategy Dismantles Both MyD88 and TRIF Signaling Pathways Downstream of TLR4. **Cell host & microbe**, v. 18, p. 682-693, 2015.

SAADOUN, D. et al. Peg-IFNalpha/ribavirin/protease inhibitor combination in hepatitis C virus associated mixed cryoglobulinemia vasculitis: results at week 24. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, p. 831-837, 2014.

SABOURI, A. H. et al. TLR signaling controls lethal encephalitis in WNV-infected brain. **Brain research**, v. 1574, p. 84-95, 2014.

SANTOLARIA, P. et al. Different humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in purebreed and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies. **Veterinary parasitology**, v. 178, p. 70-76, 2011.

SCHLAEPFER, E. et al. Triggering TLR2, -3, -4, -5, and -8 reinforces the restrictive nature of M1- and M2-polarized macrophages to HIV. **Journal of virology**, v. 88, p. 9769-9781, 2014.

SILVA, D. A. et al. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary parasitology**, v. 143, p. 234-244, 2007.

SONG, Q. et al. Maturation inside and outside bone marrow dendritic cells (BMDCs) modulated by interferon-alpha (IFN-alpha). **International immunopharmacology**, v. 17, p. 843-849, 2013.

STIFTER, S. A. et al. Functional Interplay between Type I and II Interferons Is Essential to Limit Influenza A Virus-Induced Tissue Inflammation. **PLoS pathogens**, v. 12, p. e1005378, 2016.

SYED-HUSSAIN, S. S. et al. Study on the use of toltrazuril to eliminate *Neospora caninum* in congenitally infected lambs born from experimentally infected ewes. **Veterinary parasitology**, v. 210, p. 141-144, 2015

ANEXO 1 – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal

 Universidade Federal de Uberlândia Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) Avenida João Naves de Avila, 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceuaufu@yahoo.com.br; www.comissoes.propg.ufu.br
<p>ANÁLISE FINAL Nº 087/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 052/12</p> <p>Projeto Pesquisa: "Padronização de modelo de infecção por <i>Neospora caninum</i> pela via oral utilizando mecanismos de indução de interconversão de estágio in vitro"</p> <p>Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo</p> <p>O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.</p> <p>SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.</p> <p>OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.</p> <p>AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTE ESTÁ NO SITE.</p> <p>Uberlândia, 26 de Setembro de 2012</p> <p> Prof. Dr. Jonas Dantas Batista Coordenador Pro tempore da CEUA/UFU</p>