



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz Camargo”

**Papel de fatores celulares indutores de resposta imune de padrão Th1
na produção e funções de anticorpos contra *Neospora caninum***

Mariana Ferreira Silva

UBERLÂNDIA
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz Camargo”

**Papel de fatores celulares indutores de resposta imune de padrão Th1 na
produção e funções de anticorpos contra *Neospora caninum***

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

Mariana Ferreira Silva

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo
(Orientador)

UBERLÂNDIA
2017

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

S586p
2017

Silva, Mariana Ferreira, 1993

Papel de fatores celulares indutores de resposta imune de padrão Th1 na produção e funções de anticorpos contra *Neospora caninum* / Mariana Ferreira Silva. - 2017.

65 f. : il.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Parasitologia - Teses. 3. Neosporose - Teses. 4. *Neospora* - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.07



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Mariana Ferreira Silva

“Papel de fatores celulares indutores de resposta imune de padrão Th1 na produção e funções de” anticorpos contra *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, 13 de fevereiro de 2017.

Fernando R. Carvalho

Prof. Dr. Fernando dos Reis de Carvalho – IFG

Carolina Salomão Lopes

Dra. Carolina Salomão Lopes – PÓS-DOC/UFU

Tiago Wilson P. Mineo

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

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner vertical line segment extending upwards from the horizontal line.

Agradecimientos

Agradecimentos Especiais

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, por nunca me desamparar durante toda a minha caminhada.

Agradeço aos meus pais, Gilda e Olímpio, por todo amor, apoio e incentivo que foi fundamental para a concretização desta etapa.

As minhas irmãs, Camila e Luiza, que sempre foram um exemplo pra mim e confiaram que tudo iria dar certo.

Ao meu namorado, Luiz Fernando, pela força, carinho, compreensão e paciência, que tornaram o caminho mais fácil.

A minha família, de forma geral, que sempre torceu por mim durante todo o trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Tiago Wilson pela oportunidade em desenvolver este trabalho, pelo auxílio e paciência nos momentos mais complicados.

A Prof. Dra. Fernanda por ter sido a primeira pessoa a me acolher e ensinar todos os procedimentos do laboratório.

Aos meus amigos que vou levar para a vida toda, muito obrigada por nunca me deixarem desistir, pelas palavras amigas, pelo consolo e companheirismo.

A Carolina Salomão pela ajuda incansável, tanto na realização dos experimentos quanto com ideias, sempre disposta a me auxiliar em tudo que eu precisava.

Aos amigos do laboratório Cristina, Caroline, Eliézer, Flávia, Héber, Jacqueline, Maraísa, Murilo, Mylla, Patrício, Vanessa Miranda, Vanessa Resende e Tamires, muito obrigada pelo ótimo convívio, pelos momentos engraçados, pela ajuda no trabalho, por tudo! Nunca me esquecerei de vocês.

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

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

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

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

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário, intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e causador da neosporose. Esse parasito possui uma grande importância na medicina veterinária, pois está relacionado à doença neuromuscular em cães e ao abortamento em bovinos, gerando perdas afetivas e econômicas. A resposta imune de padrão Th1 é uma das principais responsáveis pelo controle da infecção, mediando a ativação de vias celulares culminando na produção de moléculas efetoras que reduzem a replicação do parasito. Esse trabalho teve como objetivo, avaliar o papel de alguns destes fatores na produção e função de anticorpos específicos contra os antígenos de *N. caninum*. Para avaliar a produção e função dos anticorpos produzidos, camundongos WT e geneticamente deficientes para TLR2, MyD88, IFN- γ , IL-12, MHCII e iNOS foram imunizados com antígeno solúvel do parasito (NLA). Amostras de soros foram obtidos em cinética durante a imunização e quantificados por ELISA indireto. O perfil de reconhecimento antigênico destas amostras foi avaliado por *immunoblotting* e as funções biológicas desses anticorpos, analisadas por meio de ensaios de lise mediada pelo complemento e opsonização dos parasitos. Os resultados obtidos mediante estas análises demonstraram que a ausência de alguns dos fatores cruciais para a indução de uma resposta Th1 (TLR2, IFN- γ e IL-12) não alteraram a produção de anticorpos IgM e IgG, camundongos MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-} e iNOS^{-/-} apresentaram uma redução significativa desses níveis de anticorpos e seu reconhecimento antigênico. Tal redução na produção desses anticorpos nestes animais geneticamente deficientes encontrou-se associado a redução de suas funções clássicas, como lise mediada pelo complemento e opsonização. Neste sentido, demonstramos que MyD88, MHCII e iNOS, fatores relacionados a resposta imune celular de padrão Th1, são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imune humoral adequada contra *N. caninum*.

Palavras – chave: *Neospora caninum*, MyD88, MHCII, iNOS, IgM, IgG, TLR

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan, obligate intracellular parasite that belongs to the Apicomplexa phylum and causes neosporosis. This parasite has a significant relevance in veterinary medicine causing neuromuscular disease in dogs and repetitive abortions in cattle herds, contributing to affective and economic losses. Th1-based immune responses against *N. caninum* is one of the major responsible to control infection, inducing the release of effector molecules that limits parasite replication. In that context, this study aimed to define the role of key Th1-related molecules in the synthesis and functions of antibodies during exposure to *N. caninum* antigens. To evaluate the production and function of these antibodies, WT and genetically deficient mice for TLR2, MyD88, IFN- γ , IL-12, MHCII and iNOS were immunized with soluble antigens of *N. caninum* (NLA). Kinetics of serum samples during immunization were measured by indirect ELISA. Profile of antigen recognition were evaluated by *immunoblotting* and biological functions assays analyzed by complement-mediated lysis and opsonization. We observed that in the absence of crucial factors in induction of Th1 response (TLR2, IFN- γ e IL-12) specific production of IgM and IgG antibodies was not impaired. Mice MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-} and iNOS^{-/-} presented significant decrease in the levels of these antibodies and in antigenic recognition. That reduction in these groups directly reflected in compromised lysis and opsonization properties of the hyperimmune sera. So, we demonstrate that factors related to Th1 immune response as MyD88, MHCII and iNOS, are crucial to induce humoral immune responses against *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*; MyD88;MHCII;iNOS; IgM; IgG; TLR

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner L-shaped line nested inside it.

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Neospora caninum.....	12
1.2. Hospedeiros.....	12
1.3. Ciclo biológico	13
1.4. Vias de transmissão	14
1.5. Patogênese	15
1.6. Epidemiologia e prevalência.....	17
1.7. Controle.....	18
1.8. Resposta Imune	18
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção dos camundongos.....	27
4.2. Cultivo de células HeLa e do N. caninum	27
4.3. Delineamento experimental	28
4.4. Preparação do antígeno solúvel de N. caninum (NLA)	28
4.5. Imunização.....	28
4.6. Quantificação de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses específicas para N. caninum em amostras de soros de camundongos	29
4.7. Lise mediada pelo complemento	30
4.8. Opsonização dos parasitos e fagocitose por macrófagos imortalizados.....	30
4.10. Análise estatística	32
4.11. Normas de Biossegurança	32
5 RESULTADOS	34
5.1. Produção de anticorpos IgM e IgG não é alterada em camundongos TLR2 ^{-/-} , IL-12 ^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}	34
5.2. MyD88, MHCII e iNOS influenciam a produção de anticorpos contra NLA.....	37
5.3. Perfil de reconhecimento antigênico dos anticorpos de camundongos WT e geneticamente modificados.....	40

5.4. Lise mediada pelo complemento é diminuída nos camundongos geneticamente modificados quando comparados ao grupo WT	43
5.5. Opsonização dos parasitos mediada por anticorpos dos grupos WT e animais geneticamente deficientes.....	45
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner vertical line segment extending upwards from the horizontal line.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1. *Neospora caninum*

N. caninum é um protozoário, intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae e causador da neosporose. Muito semelhante morfológicamente a outros parasitos tais como *Toxoplasma gondii* e *Hammondia heydorni*, foi primeiramente identificado em 1984, em cães na Noruega e posteriormente descrito em 1988 (DUBEY et al., 1988; DUBEY et al., 2002a)

Características biológicas como antigenicidade, patogenicidade, fatores de virulência, tipos de hospedeiros (DUBEY et al., 2002b; 2007a), ilustradas pela indução de intensa paralisia dos membros posteriores em cães, cistos teciduais com paredes espessas e testes sorológicos e imunohistoquímicos negativos para *T. gondii*, são essenciais para a identificação do *N. caninum* (DUBEY et al., 1988). Além disso, comparações genômicas e transcriptômicas contribuem para a diferenciação entre os parasitos do filo descrito (REID et al., 2012).

1.2. Hospedeiros

N. caninum possui um ciclo biológico heteróximo, definido por dois tipos de hospedeiros. Os hospedeiros definitivos podem ser definidos como membros dos gênero *Canis* e estes hospedeiros possuem reprodução sexuada que culminam na eliminação de oocistos nas suas fezes (MCALLISTER et al., 1998). Estudos posteriores identificaram oocistos de *N. caninum* em fezes advindas de outros canídeos, por exemplo, coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004a), lobos (*Canis lupus lupus*) (DUBEY et al., 2011) e dingos australianos (*Canis lupus dingos*) (KING et al., 2010).

Os hospedeiros intermediários são aqueles em que o parasito se replica de modo assexuado, por meio de um processo chamado endodiogenia (SPEER and DUBEY, 1989). Atualmente, sabe-se que há uma vasta gama de animais vertebrados de sangue quente que podem servir como hospedeiros intermediários do parasito, sendo destaque as infecções em bovinos, como as de maior relevância econômica (DUBEY et al., 2007a; DUBEY and SCHARES, 2011; ALMERÍA, 2013). Formas parasitárias já foram identificadas em diferentes espécies animais como galinhas, pardais, raposas vermelhas, carneiros, cabras, veados, cavalos e diferentes espécies de aves silvestres (DONAHOE et al., 2015). A definição de humanos

como possíveis hospedeiros intermediários ainda é bastante questionada, pois até o momento não houve detecção direta em pacientes. Sabe-se, contudo, que imunoglobulinas específicas anti – *N. caninum* foram identificadas em diversos grupos de pacientes, principalmente indivíduos HIV positivos e com desordens neurológicas, os quais apresentaram altas taxas de soropositividade quando comparados a doadores de sangue (LOBATO et al., 2006).

1.3. Ciclo biológico

O ciclo de vida do parasito é caracterizado pela reprodução sexuada no intestino dos hospedeiros definitivos (canídeos) e assexuada nos hospedeiros intermediários (bovinos, roedores, ovinos, caprinos) (LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2004b). O ciclo biológico é semelhante ao de *T. gondii*, diferenciando-se em relação as espécies que atuam como hospedeiros definitivos. Durante o ciclo biológico, três formas parasitárias principais são encontradas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (no interior de cistos teciduais) e esporozoítos (no interior de oocistos) (Figura 1).

Taquizoítos livres invadem diferentes tipos de células nucleadas, por exemplo: células neurais, vasculares, endoteliais, musculares, do fígado, macrófagos e fibroblastos. Desta forma, a replicação parasitária é caracterizada pela rapidez, dividindo-se cerca de 20 vezes até a diferenciação em bradizoítos (DUBEY et al., 2007a). Os bradizoítos replicam de forma lenta e compõe os cistos teciduais, sendo estes últimos encontrados em tecidos neurais (cérebro e medula espinhal) ou nos músculos esqueléticos, persistindo por toda a vida dos hospedeiros intermediários. O ciclo se completa quando os cistos teciduais presentes em tecidos infectados são ingeridos por canídeos. No trato gastrointestinal dos canídeos, a parede desses cistos teciduais são digeridas pelas enzimas proteolíticas do estômago e duodeno, liberando bradizoítos que invadem as células intestinais, iniciando o desenvolvimento da fase sexuada (esquizogonia e gamogonia), por meio da diferenciação em esquizontes e merozoítos. Tais eventos culminam na produção de oocistos não esporulados (não infectantes) que são eliminados nas fezes dos canídeos. Estes oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo para o ambiente, sob condições ótimas de pH, temperatura e umidade, são esporulados entre um e cinco dias, tornando-se potencialmente infecciosos, permanecendo viáveis no solo por longos períodos até serem ingeridos por outros hospedeiros (GOODSWEN et al., 2013).

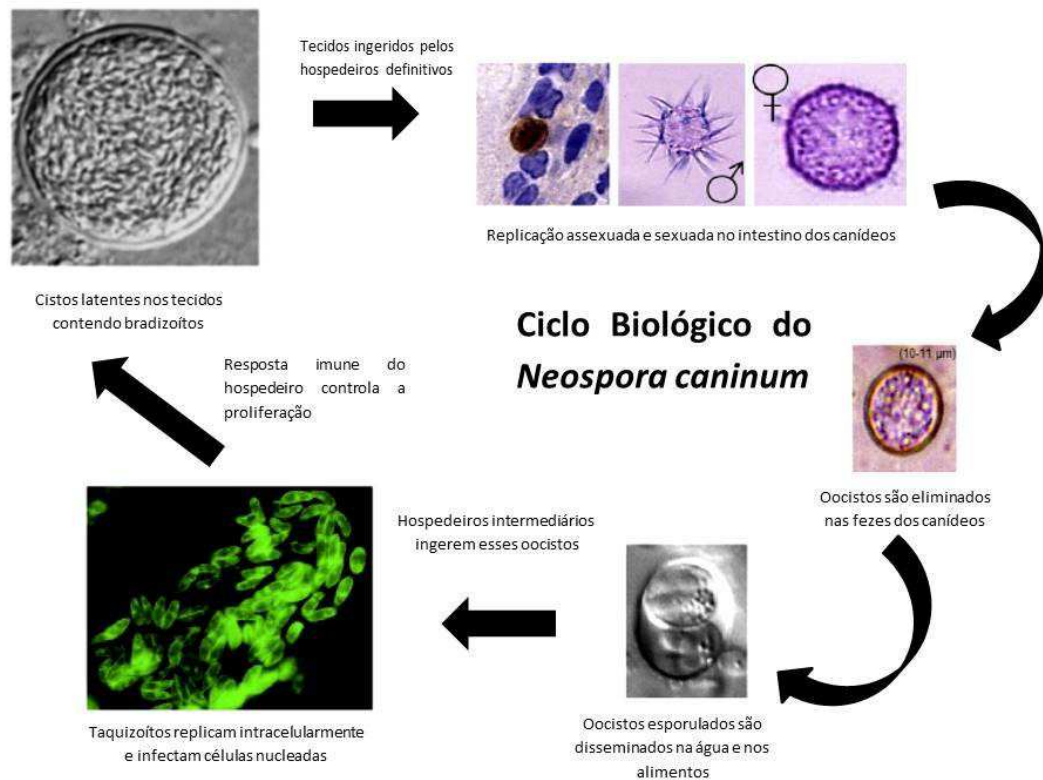


Figura 1 – Ciclo biológico de *N. caninum* mostrando os diferentes estágios do parasito nos hospedeiros definitivos e intermediários. (Adaptado de Mc Allister, 2016)

1.4. Vias de transmissão

A transmissão do parasito para os hospedeiros intermediários, como os bovinos, é bem elucidada e pode ocorrer de três formas principais: horizontal, vertical exógena e vertical endógena. As transmissões ocorrem dos hospedeiros definitivos para os hospedeiros intermediários de modo horizontal, ou no caso da transmissão vertical, da mãe para o feto, sendo a de bovinos a de maior importância veterinária (Figura 2) (WILLIAMS et al., 2009).

A forma de transmissão horizontal é caracterizada pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados ou cistos teciduais. No organismo dos hospedeiros intermediários, os taquizoítos se proliferam sendo convertidos a bradizoítos seguidos pela forma latente de cistos teciduais. A transmissão vertical ocorre por via transplacentária, sendo a exógena observada quando fêmeas ingerem oocistos no período da gestação transmitindo a infecção para o feto. Já a transmissão vertical endógena acontece quando a infecção latente em fêmeas é reativada durante a gestação. A prole poderá nascer saudável, ou com sinais clínicos,

ou natimortos ou, em casos mais graves, sofrer aborto (MCALLISTER et al., 1998; DUBEY et al., 2004; GOODSWEN et al., 2013).

Outras formas menos comuns de transmissão tem sido investigadas como, por exemplo, via colostro, por isso, estima-se que a transmissão possa acontecer também durante a lactação. Adicionalmente, foram encontradas formas parasitárias no sêmen de reprodutores bovinos, sendo a transmissão venérea uma das formas a ser considerada (UGGLA et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2003; MOSKWA et al., 2007).

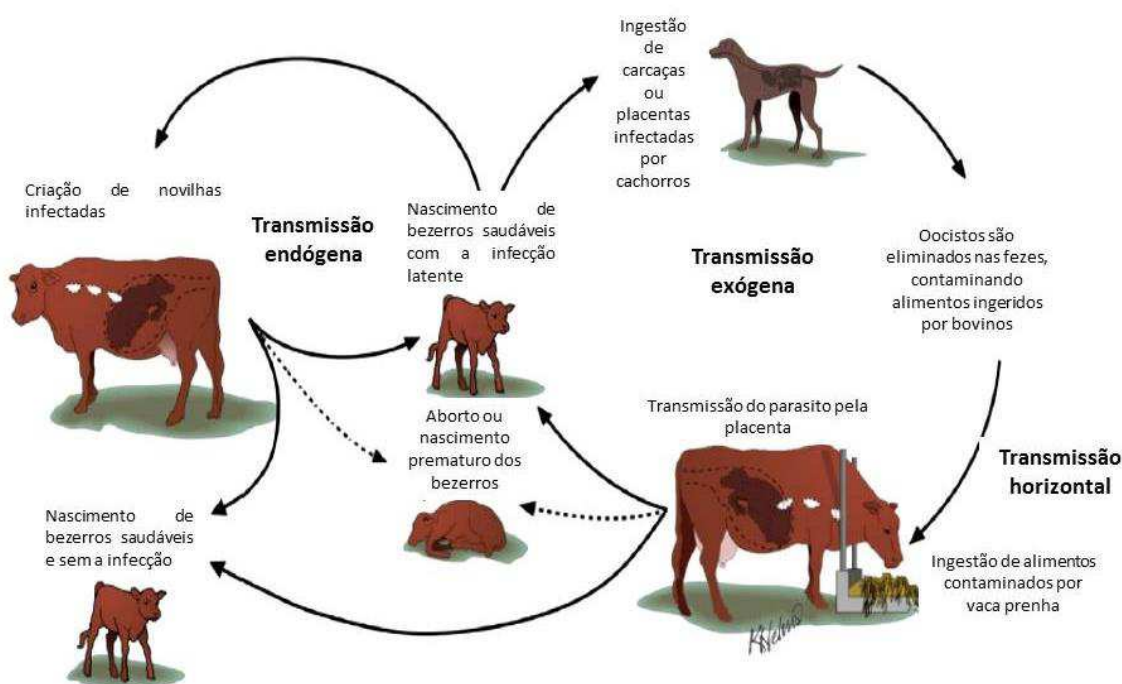


Figura 2 – Vias de transmissão do *N. caninum* dos hospedeiros definitivos para bovinos e a transmissão congênita da neosporose bovina. (Adaptado de Mc Allister, 2007)

1.5. Patogênese

A patogênese da neosporose associa-se com a invasão e proliferação intracelular de taquizoítos de *N. caninum*, conhecido como ciclo lítico (DUBEY and LINDSAY, 1996). A invasão celular do parasito é crucial e para tanto, diversas organelas secretoras como roptrias, micronemas e grânulos densos auxiliam esse processo (BUXTON et al., 2002; DUBEY et al., 2002a). Inicialmente, as proteínas imunodominantes de superfície (SAG) do parasito são reconhecidas por receptores de superfície da célula hospedeiro e, após essa adesão inicial (HEMPHILL, 1996), há a formação do vacúolo parasitóforo (VP) em que a membrana da célula se invagina e proteínas como as micronemas são secretadas pelo parasito fortalecendo

essa adesão (HEMPHILL et al., 1996). As proteínas de roptrias liberadas no VP se ligam as organelas da célula hospedeira, e os grânulos densos secretam seu conteúdo com a função de fortalecer o VP, formando uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa que auxilia na sobrevivência dos parasitos e na sua replicação intracelular (SINAI and JOINER, 2001).

A neosporose pode ocorrer tanto de modo assintomático ou sintomático, com sérios problemas para os seus hospedeiros causando sinais neurológicos em cães e abortos em bovinos. Tais variações se devem ao tipo de cepa que está infectando pois, já foi demonstrado que cepas de *N. caninum* possuem uma virulência variável, bem como induzem respostas imunes diferentes entre si. Além disso, o estado imune dos hospedeiros influencia bastante, já que, hospedeiros imunocompetentes, na maioria dos casos, são assintomáticos (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006; ROJO-MONTEJO et al., 2012)

Estudos mostram que, vacas prenhas quando infectadas nos primeiros 100 dias de gestação tem uma maior probabilidade de transmitir o parasito para o feto, sendo as taxas de sobrevivência do mesmo muito baixas, devido a imaturidade de seus tecidos linfoides. Durante o segundo e terceiro trimestres, já com sistema linfóide desenvolvido, a capacidade do feto em resistir a infecção aumenta, mas as taxas de aborto - principalmente em infecções entre 5 e 7 meses de gestação - ainda é elevada. Quando a mãe é infectada no terceiro trimestre de gestação, em geral, o nascimento ocorre, mas os bezerros tem maior chance de nascer com sinais clínicos como: ataxia, déficit de propriocepção, tamanho pequeno, encefalomielite, lesões no sistema nervoso central dentre outros (BUXTON et al., 2002; ENTRICAN, 2002). Além disso, o feto pode ser afetado pela própria resposta imune da mãe. Evidências sugerem que o parasito desencadeie a resposta imune do tipo Th1, liberando citocinas pró-inflamatórias que podem gerar danos ao tecido placentário, prejudicando o fornecimento de nutrientes ao feto (DUBEY et al., 2007a).

Em cães domésticos, as principais manifestações clínicas são observadas em cães jovens. Em geral, problemas neuromusculares como a polirradiculoneurite e encefalomielite são as mais comuns. Nestes animais, foi demonstrada uma predileção do parasito pelos nervos do plexo lombo sacral. Já em cães adultos, esses sinais clínicos são mais diversificados, como a paralisia dos membros posteriores, inclinação da cabeça, convulsões, ataxia, incontinência, problemas oculares e miocardite. Outra manifestação clínica que tem sido bastante investigada são as lesões subcutâneas, geralmente em cães imunossuprimidos, causadas por infiltrados inflamatórios, necrose e hemorragias (BARBER and TREES, 1996; REICHEL et al., 2007).

1.6. Epidemiologia e prevalência

A neosporose é uma doença que tem emergido no mundo todo e traz grandes prejuízos para a economia global, com estimativas que variam entre \$1 e \$2,4 bilhões de dólares. A distribuição do parasito é bem variada e já foram identificadas amostras sorológicas positivas de bovinos para *N. caninum* em mais de 45 países como: Austrália, Argentina, Nova Zelândia, Brasil, Itália, Canadá, Estados Unidos, México, Holanda e Reino Unido (REICHEL et al., 2013).

Os principais impactos causados pela infecção estão relacionados com os abortos causados pelo parasito no gado bovino. O gado leiteiro tem uma maior taxa de risco de aborto (50%) quando comparados ao gado de corte (14,8%) e, além da perda econômica proporcionada pela morte dos fetos, há uma menor produção de leite desses animais (BARTELS et al., 2006; REICHEL et al., 2013).

A contenção da doença é dificultada principalmente pela presença dos hospedeiros definitivos, sejam cães selvagens ou de criação, próximos ao gado, que facilitam a transmissão do parasito através das fezes contaminadas com oocistos. Esse fato é confirmado pela maior prevalência da doença em cães da região rural, que varia de 20 a 97%, enquanto que da região urbana essa prevalência diminui para 7 a 26% (PATITUCCI et al., 2001; ANTONY and WILLIAMSON, 2003; LASRI et al., 2004; ROBBE et al., 2016). Além desses hospedeiros contribuírem para a transmissão horizontal do parasito, eles correm o risco de se infectarem, por meio da ingestão de carcaças e restos de placenta contaminadas, mantendo o ciclo do parasito por um longo período (DUBEY et al., 2007b).

No Brasil, estudos sorológicos realizados com cachorros na região de Ilhéus, Bahia, detectaram anticorpos anti-*N. caninum* em cachorros da região urbana e peri-urbana e rural (SICUPIRA et al., 2012). Na região específica do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, analisando dois grupos de gados leiteiros, cerca de 20% desses animais foram encontrados como previamente expostos ao parasito (MINEO, 2006). Nessa mesma região, testes com amostras sorológicas de ovelhas pela técnica de ELISA, obtiveram uma taxa de exposição ao parasito de cerca de 54%, demonstrando a importância do controle da infecção nesses rebanhos (ROSSI et al., 2011).

1.7. Controle

Para estabelecer estratégias de controle para a neosporose, é preciso entender o ciclo biológico do parasito bem como a epidemiologia do mesmo. Por muito tempo adotou-se a prática de não controlar essa infecção, mas, devido as grandes perdas econômicas, tornou-se viável investir em estratégias para diminuir esses prejuízos (HALL et al., 2005; LANDMANN et al., 2011).

As principais formas de controle da neosporose que poderiam ser empregadas no controle da transmissão do parasito seriam monitoramento da infecção exógena e endógena, tratamento e vacinação. Para o controle da infecção exógena, ou seja, evitar que o gado se contamine, deve-se adotar medidas de redução do contato entre os hospedeiros definitivos e intermediários bem como o minimizar a contaminação dos alimentos com material fecal de cães (REICHEL et al., 2014).

Para o controle da infecção endógena, selecionar apenas vacas soronegativas para *N. caninum* para reprodução (REICHEL et al., 2014), fazer o transplante de embriões advindos de fêmeas soropositivas (LANDMANN et al., 2002), abater rebanhos contaminados e eliminar embriões abortados, são opções que podem ser consideradas (HALL et al., 2005; LANDMANN et al., 2011).

A vacinação do gado bovino tem se mostrado uma boa estratégia de proteção para outras infecções e não é diferente para a neosporose. Porém, a única vacina já registrada no mercado, denominada Neoguard®, foi recentemente retirada devido aos baixos índices de eficácia (WESTON et al., 2012). Estudos experimentais de vacinas utilizando parasitos vivos (WILLIAMS et al., 2007), bem como inativados (ROJO-MONTEJO et al., 2011), uso de subunidades nativas (MOORE et al., 2011; MANSILLA et al., 2012) e antígenos de *N. caninum* recombinantes (HEMPHILL et al., 2013; MANSILLA et al., 2016b) tem mostrado resultados promissores, mas sem previsão de se tornarem comercialmente aceitas.

1.8. Resposta Imune

1.8.1. Resposta Imune Celular

A resposta imune contra o parasito *N. caninum* tem sido muito estudada, principalmente em bovinos e murinos, com a intenção de se compreender os mecanismos relacionados a transmissão congênita, por ser um modelo de estudo que se aplica a outros parasitos do filo

Apicomplexa e para tentar elucidar mecanismos de controle da infecção (GOODSWEN et al., 2013).

Tanto mecanismos da resposta imune celular inata quanto adaptativa estão relacionados ao combate de *N. caninum* e estes são bem semelhantes aos de *T. gondii*. A primeira linha de defesa contra o parasito é física, quando a infecção se dá por via oral, sendo representada por enterócitos e espessas junções intercelulares da mucosa intestinal, que visam diminuir a invasão parasitária (BUZONI-GATEL et al., 2006).

Durante a fase aguda da doença, diversas células estão relacionadas com a resposta imune do organismo dentre elas destacam-se macrófagos, células dendríticas (DCs) e células natural killer (NK). Inicialmente, as células NK induzem a produção de interferon gama (IFN- γ) e essa produção é continuada pelos linfócitos TCD4⁺. Outra citocina que possui grande relevância é IL-12, pois induz a ativação de TCD4⁺ e TCD8⁺ e em conjunto com IFN- γ , criam um ambiente pró-inflamatório essencial ao combate do parasito impedindo sua replicação, destruindo as células infectadas, neutralizando os parasitos extracelulares e induzindo a formação de cistos teciduais (INNES et al., 2005; MONNEY and HEMPHILL, 2014; DONAHOE et al., 2015).

Uma via importante relacionada a resposta imune, é a induzida pelos receptores Toll-like (TLRs) que são um dos principais receptores de reconhecimento padrão (PRRs), expressos tanto nas superfícies celulares (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou no interior dos endossomos (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) de células como macrófagos e células dendríticas. Esses receptores reconhecem componentes microbianos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TAKEDA and AKIRA, 2005; RASMUSSEN et al., 2009).

Na resposta imune contra *N. caninum* em camundongos, TLRs tem um papel importantíssimo no reconhecimento de proteínas de superfície. Foi demonstrado que em murinos, TLR11 reconhece as profilinas, que se localizam na região apical de *N. caninum*, sendo essenciais para sua invasão e indução da resposta pró-inflamatória do tipo 1 (JENKINS et al., 2010; MANSILLA et al., 2016a). Já foi demonstrado que, TLR2 presente na superfície de macrófagos, está associado a molécula adaptadora MyD88, que se liga a esse receptor induzindo o fator de transcrição NF – κ B a secretar IL-12 (MINEO et al., 2010). Essa citocina auxilia na ativação de células *natural killer* (NK) e contribuem para a diferenciação dos linfócitos T em TCD4⁺. Os linfócitos TCD4⁺ bem com as células NK secretam outra citocina pró – inflamatória, IFN- γ , que culmina no recrutamento de óxido nítrico sintetase (iNOS), uma enzima essencial para a produção de óxido nítrico (NO). NO é um importante regulador

citotóxico da replicação intracelular do parasito que auxilia também, na indução de uma infecção latente (KHAN et al., 1997; BRAKE, 2002; HEMPHILL et al., 2006; DONAHOE et al., 2015; ABDUL-CADER et al., 2016).

A modulação da resposta imune é mediada por citocinas como IL-10, que em locais de alta carga parasitária, são secretadas para equilibrar a resposta imune Th1. Em infecções materno-fetais, uma resposta imune muito agressiva pode levar ao abortamento ou reabsorção fetal (REGIDOR-CERRILLO et al., 2014). Por este fato, a resposta imune regulatória é importante para proteger o feto contra a infecção. Deve-se ressaltar também que, a liberação do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) por células T regulatórias (Tregs), auxiliam no controle dessas citocinas pró-inflamatórias e evitam a rejeição do feto pela mãe. Em contrapartida, esse tipo de resposta acaba permitindo a proliferação dos taquizoítos, transmissão vertical do parasito e, em alguns casos, a reativação dos bradizoítos em taquizoítos (INNES et al., 2005; WILLIAMS et al., 2009; GOODSWEN et al., 2013; DONAHOE et al., 2015).

1.8.2. Resposta imune humoral

A resposta imune humoral tem como objetivo principal a produção de anticorpos pelas células B, que atuam contra micro-organismos, principalmente no meio extracelular. Sabe-se que camundongos geneticamente deficientes para a produção de anticorpos (microMT) infectados com *N. caninum*, demonstram uma maior susceptibilidade a infecção quando comparados a camundongos do tipo selvagem (WT) (EPERON et al., 1999).

As funções desses anticorpos são variadas, sendo opsonização, neutralização e ativação do complemento. As primeiras imunoglobulinas produzidas são IgM e IgD, que sofrem uma mudança de classe para IgG, IgE e IgA nessa ordem, sendo que as IgGs são as produzidas em maior quantidade (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). É importante destacar que para ocorrer o *switch* de classe dessas imunoglobulinas, o complexo de histocompatibilidade II (MHCII) presente em células apresentadoras de antígenos é crucial, pois o perfil de citocinas por ele induzido determinará o isotipo de Ig secretado. Para tanto, antígenos interiorizados, processados e apresentados aos linfócitos TCD4⁺ contribuem para a expansão clonal. Este fato culmina na secreção de tais citocinas que induzem a proliferação e diferenciação de células B (UNANUE et al., 2016).

Estima-se que em bovinos, os anticorpos IgM atinjam seu pico máximo com 2 semanas, diminuindo após 4 semanas na infecção. As concentrações de IgG se mantêm elevadas por 3-6 meses, mas persistem em menores níveis por toda a vida do hospedeiro (GUIDO et al., 2016).

Durante a infecção pelo parasito *N. caninum*, citocinas pró-inflamatórias estimulam a maior produção de anticorpos do tipo IgG2a e IgG3, caracterizando a resposta imune Th1 em bovinos (ANDRIANARIVO et al., 2005). A resposta imune do tipo Th2 induz a maior produção de anticorpos IgG1 e IgE (MOORE et al., 2011; HEMPHILL et al., 2016).

Estudos utilizando infecções experimentais em bovinos, com $1,5 \times 10^8$ taquizoítos de *N. caninum*, indicaram que produção de anticorpos IgM, IgG (Total, IgG1 e IgG2a) e IgA foi percebida após 15 dias da infecção. Deve-se destacar que IgM e IgA não foram associadas com a fase aguda da infecção nesses animais, pois foram detectados picos desses anticorpos entre 150 e 240 dias após a infecção. As proteínas imunodominantes reconhecidas pelos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a foram as de 29 e 36 kDa. O perfil de indução maior de IgG2a sobre IgG1 foi detectado em todo o período de infecção avaliado (MACÊDO JÚNIOR, 2013).

De uma forma geral, os anticorpos possuem formas bem distintas de combate aos parasitos no organismo. A neutralização é um mecanismo em que os anticorpos inibem/paralisam a infectividade dos microrganismos. Essa neutralização se estende tanto para parasitos intracelulares (quando estão no meio extracelular), quanto para parasitos extracelulares e impedem ou diminuem efeitos deletérios da infecção (MURPHY et al., 2008; FORTHALL, 2014).

A opsonização é um o mecanismo geralmente mediado por anticorpos do isótipo IgG, em que os microrganismos são recobertos por anticorpos e fagocitados por células que possuem um receptor específico para esse anticorpo, denominado receptor de Fc. Esses fagócitos podem ser tanto células mononucleares quanto neutrófilos que após a fagocitose desses microrganismos, realizam a sua degradação intracelular (MURPHY et al., 2008).

O sistema do complemento foi descrito logo após a descoberta dos anticorpos e é componente essencial da imunidade humoral (MURPHY et al., 2008). Esse sistema, consiste em proteínas séricas e de superfície celular, que interagem entre si, com o objetivo de gerar produtos para eliminação dos microrganismos. Existem três vias de ativação denominadas: clássica, alternativa e lectínica. A via clássica foi a primeira descrita e esta é ativada por anticorpos específicos contra microrganismos. A via alternativa não necessita de anticorpos e é ativada a partir do reconhecimento de superfícies microbianas, já a via lectínica é iniciada a partir do reconhecimento de superfícies microbianas por lectinas plasmáticas. Essas vias culminam na produção dos produtos C3a, C3b, C5a e do complexo de ataque a membrana que realizam as funções efectoras do complemento como opsonização e lise dos microrganismos (RUS et al., 2005; DUNKELBERGER and SONG, 2010; SARMA and WARD, 2011).

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner L-shaped line nested inside it.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A neosporose é uma doença causada pelo parasito *N. caninum* e que causa abortamentos em bovinos. Essa infecção traz perdas econômicas para a pecuária tanto leiteira quanto de gado de corte e já foi identificada em 45 países, com prejuízos que podem chegar a 2,4 bilhões de dólares anualmente. No Brasil estima-se que essa perda anual seja em torno de 51,3 milhões de dólares (REICHEL et al., 2013; REICHEL et al., 2014).

Por muito tempo a doença permaneceu silenciosa, sendo muitas vezes diagnosticada erroneamente, mas com os avanços da ciência, novos modelos de diagnóstico passaram a identificar esse parasito e as características da neosporose.

Uma das principais estratégias para prevenir a neosporose é através da vacinação, tanto de bovinos quanto de canídeos. Atualmente não se tem nenhuma vacina comercial, visto que Bovilis Neoguard foi retirada do mercado devido a sua baixa eficácia. Para o desenvolvimento de vacinas é de suma importância o entendimento da produção de anticorpos pelo hospedeiro, objetivando uma profilaxia eficiente que proteja tanto animais não infectados quanto a recrudescência da infecção naqueles animais já infectados (HORCAJO et al., 2016).

Sabe-se que a via de resposta tipo Th1 é a principal linha de defesa dos hospedeiros contra *N. caninum* e que fazem parte receptores como TLR2 bem como sua respectiva molécula adaptadora MyD88, importante no estabelecimento de vias de sinalização de combate ao parasito. Além disso, MHCII bem como as citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IFN- γ , e o óxido nítrico auxiliam no combate ao parasito diminuindo sua replicação e induzindo a sua eliminação. Porém, deve-se ressaltar que pouco se sabe sobre função das moléculas dessa via na produção de anticorpos contra *N. caninum* (MINEO et al., 2009; MINEO et al., 2010; BEITING et al., 2014).

Considerando a importância da resposta tipo Th1, torna-se essencial o entendimento de como as moléculas descritas atuam na resposta imunológica humoral do hospedeiro, contribuindo para o entendimento da relação parasito-hospedeiro. Para isso, modelos murinos foram amplamente utilizados na realização desses ensaios. Dentre esses modelos, animais geneticamente deficientes para genes importantes dessas vias foram necessários, para verificar como se dá a produção de anticorpos na ausência de tais fatores.

Portanto, esse trabalho visa colaborar com a melhor caracterização dessa resposta imune humoral em modelos murinos, contribuindo para o desenvolvimento medidas terapêuticas e profiláticas contra *N. caninum*, visando no futuro, a diminuição dos prejuízos na bovinocultura.

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner L-shaped line nested inside it.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel de genes relacionados a resposta imune tipo Th1 na produção de anticorpos e no desenvolvimento da resposta imune humoral contra *N. caninum* em modelos murinos de imunização.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de produção de anticorpos IgM e IgG dos camundongos selvagens (WT) e geneticamente modificados (TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-}, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e iNOS^{-/-}) imunizados com o antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA).
- Caracterizar o perfil de reconhecimento de proteínas induzidos após 45 dias de imunização comparando os animais WT e geneticamente modificados (TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-}, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e iNOS^{-/-}) utilizando *imunoblotting*.
- Avaliar a capacidade de lise mediada pelo complemento de anticorpos produzidos após 45 dias de imunização, comparando camundongos WT e geneticamente modificados (TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-}, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e iNOS^{-/-}).
- Analisar a capacidade de opsonização dos anticorpos produzidos após 45 dias de imunização, por meio da fagocitose dos parasitos por macrófagos, comparando camundongos WT e geneticamente modificados (TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-}, IL-12^{-/-}, IFN- γ ^{-/-} e iNOS^{-/-}).

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thin horizontal line extending to the right, with a thin vertical line segment at the top left corner.

*Materiais e
métodos*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos camundongos

Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e geneticamente deficientes para o receptor toll-like 2 (TLR2^{-/-}), fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88^{-/-}), complexo de histocompatibilidade II (MHCII^{-/-}), interferon gama (IFN- γ ^{-/-}), interleucina 12 (IL-12^{-/-}) e óxido nítrico sintetase (iNOS^{-/-}), com seis a doze semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Esses animais foram mantidos em caixas microisoladoras com água e ração *ad libitum*, em condições padronizadas de temperatura e umidade. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da instituição (CEUA/UFU/109/16).

4.2. Cultivo de células HeLa e de *N. caninum*

Células de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC/CCL-2; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com glutamina (2mM), antibiótico/antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂, até atingirem confluência. Essas células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (cepa Nc-Liv ou Nc-Liv mCherry+) e mantidas nas mesmas condições descritas, porém apenas com meio RPMI 1640 sem adição de SFB. Após lise completa de células, a suspensão de parasitos foi coletada, feita uma centrifugação diferencial a 45 x g, por 1 minuto, para remoção de restos celulares. O sobrenadante da cultura de Nc-Liv foi centrifugado duas vezes com solução salina tamponada contendo fosfato 0,01M (PBS) a 1000 x g, por 10 minutos (SILVA et al., 2007) e o sedimento final foi estocado a -20 °C para preparação do antígeno solúvel. O sobrenadante de Nc-Liv mCherry+ foi lavado apenas uma vez, ressuspensionado em meio RPMI, contado em câmara hemocitométrica com o auxílio do corante Azul de Tripan 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) sendo utilizado logo em seguida para os experimentos.

4.3. Delineamento experimental

Para avaliar os diversos genes relacionados a resposta imune tipo Th1, camundongos geneticamente deficientes para TLR2, MyD88, IFN- γ , IL-12, MHCII e iNOS foram imunizados com 90 μ g de antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA), divididos em 3 doses. Cada dose foi ministrada juntamente ao adjuvante Alum com 15 dias de intervalo, e o soro foi coletado em 0, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização.

Após a coleta do soro, os níveis de anticorpos IgM e IgG foram mensurados a partir do ELISA indireto para todos os grupos geneticamente deficientes comparados ao WT. *Immunoblotting* foi usado para avaliar o perfil de reconhecimento dos anticorpos IgG para as proteínas do NLA, utilizando um pool de soros após 45 dias da primeira imunização. A produção de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) foram quantificadas tanto por ELISA quanto pelo *immunoblotting*, para todos os grupos citados acima.

As funções biológicas dos anticorpos, de lise mediada pelo complemento e opsonização dos parasitos, também foram mensuradas a partir de um pool de soros após 45 dias da primeira imunização.

4.4. Preparação do antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA)

Para preparação do antígeno solúvel de lisado de *N. caninum* (NLA) os pellets estocados foram diluídos em PBS e tratados com coquetel de inibidores de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça), submetidos a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido de sonicação durante cinco minutos a 60Hz em banho de gelo (SCOTT et al., 1987; SILVA et al., 2007). Posteriormente, os parasitos lisados foram submetidos à centrifugação (10.000 \times g, 30 min, 4°C), o sobrenadante resultante coletado e a concentração proteica quantificada, utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (BRADFORD, 1976). Aliquotas de NLA foram armazenadas a -20°C até sua utilização nos procedimentos de imunização dos camundongos, reações imunoenzimáticas (ELISA) e *immunoblotting*.

4.5. Imunização

Os camundongos WT e geneticamente modificados (citados acima) foram separados em grupos de 5 animais, imunizados por via subcutânea (100 μ L/animal) com 30 μ g de NLA

adicionados do adjuvante Alum (Aluminium hydroxide gel, Allhydrogen 2%, InvivoGen) volume/volume. As doses foram aplicadas 3 vezes, com 15 dias de intervalo. Amostras de sangue foram coletadas 0, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização e o soro estocado a -20°C para posterior utilização.

4.6. Quantificação de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses específicas para *N. caninum* em amostras de soros de camundongos

Para determinação da cinética de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses específicas, amostras de soros dos camundongos WT e geneticamente deficientes imunizados foram quantificados através da técnica do ELISA indireto. Microplacas de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com NLA na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6), e incubadas por 18 horas a 4°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) acrescido de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-T-M5%) para IgM e IgG total. Para IgG1 e IgG2a, os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-T adicionado de 1% de albumina sérica bovina (BSA- Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (PBS-T-BSA1%) durante 1 hora à temperatura ambiente. Amostras de soros foram diluídas a 1:50 em PBS-T-M5% e incubadas por 1 hora para detecção de IgM e IgG total e 1:25 em PBS-T-BSA1% por 2h para IgG1 e IgG2a, sendo incubadas a 37°C. Conjugados específicos para cada classe de imunoglobulina- anti-IgM (1:500) e anti-IgG (1:1000) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) diluídas em PBS-TM a 1%, anti-IgG1 (Novus Biological, 1:4000) e anti-IgG2a (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA, 1:2000) de camundongo marcado com biotina, diluídos em PBS-T+BSA1%, foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. Para a detecção de IgG1 e IgG2a, placas foram incubadas com estreptoavidina/peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Entre cada etapa da reação, as placas foram lavadas com PBS-T por seis vezes. A reação foi desenvolvida com 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônica) (ABTS, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, Washington, DC, EUA) e a densidade óptica (DO) determinada a 405 nm em leitor de placas (*SpectraMax* M2e, Molecular Devices, EUA) (SILVA et al., 2007).

4.7. Lise mediada pelo complemento

A capacidade de lise parasitária do soro hiperimune dos camundongos, WT e geneticamente deficientes imunizados, foi analisada através da ação da via clássica do complemento. Taquizoítos de Nc-Liv mCherry+ foram ressuspensos em tampão de Hank's e ajustados para a concentração de $5 \times 10^5/\text{mL}$. Um *pool* de soro desses animais, após 45 dias de imunização, foi diluído com tampão de Hanks na concentração de 1:4. O soro dos animais não imunizados foi utilizado, nas mesmas condições descritas acima, como controle negativo do ensaio. As suspensões parasitárias e o soro dos animais foram homogeneizados e incubados por 30 min, em duplicata, a 37°C em estufa contendo 5% CO₂, sendo colocadas no gelo após o tempo de incubação. Posteriormente, os parasitos restantes de cada grupo foram contados duas vezes, separadamente, em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Trypan para a exclusão dos parasitos não viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de lise, dividindo-se a média dos parasitos contados em cada grupo pela média dos parasitos contados no controle negativo segundo a fórmula:

$$\text{Porcentagem de lise (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de paraitos viáveis dos grupos imunizados} \times 100}{n^{\circ} \text{ parasitos viáveis dos grupos não imunizados}}$$

O erro padrão da média (SEM) também foi representado.

4.8. Opsonização dos parasitos e fagocitose por macrófagos imortalizados

Para avaliar a capacidade de opsonização dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados, macrófagos derivados de medula de camundongos WT e posteriormente imortalizados foram plaqueados em lamínulas, na concentração de $2 \times 10^4/\text{mL}$ em placas de 48 poços. Taquizoítos de Nc-Liv mCherry+ foram ressuspensos em formol 4% e incubados a temperatura ambiente, por 30 minutos, e centrifugados ($10.000 \times g$ por 10 minutos) duas vezes com PBS. Os parasitos foram ajustados para a concentração de 5 parasitos para cada célula e incubados com soros de animais coletados após 45 dias da imunização, na concentração de 1:5, diluídos em meio incompleto, totalizando 300 μL , incubados por 30 min na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas juntamente com os parasitos acrescidos dos soros, mantidas por 12 horas na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e o núcleo foi corado com

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilidol). O ensaio foi analisado utilizando microscópio fluorescente de luz invertida (EVOSfl, Thermo Scientific). As análises foram feitas medindo a área dos parasitos fagocitados em 250 macrófagos observados em campos aleatórios, com aumento de 200x, utilizando-se o software Image J (National Institute of Health, 1.8v). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (SEM).

4.9. Perfil de reconhecimento antigênico do soro hiperimune utilizando *immunoblotting*

O perfil de reconhecimento antigênico de IgG e subclasses dos diferentes grupos de animais foi analisado pelo método de *immunoblotting* (SILVA, et al. 2007), utilizando soros de camundongos após 45 dias da imunização com NLA. Para isso, 120 µg de NLA foram diluídos em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M pH6,8, dodecilsulfato de sódio-SDS 4%, azul de bromofenol a 0,2%), incubado a 95°C, por 5 minutos, e submetidos a eletroforese em gel de poliacríalmida 12%, sob condições não redutoras (LAEMMLI, 1970). Um volume de 200 µL da solução feita a partir da diluição de NLA foi aplicado no gel em paralelo ao padrão de peso molecular (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA).

Após separação eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,45µm, Millipore, Bedford, EUA) utilizando sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia). Após 2 horas de transferência, as membranas foram retiradas do aparelho, coradas rapidamente com solução Ponceau a 0,5%, cortadas em tiras e colocadas em canaletas apropriadas para reação. Reatividades inespecíficas presentes nas tiras de membranas foram bloqueadas com PBS-T-M 5% por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação e subsequentemente incubadas com amostras de soros de camundongos, após 45 dias da imunização na diluição de 1:100 em PBS-T-M 1% (18 h a 4°C). Conjugados específicos para cada classe de imunoglobulina: anti-IgG (1:1000) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), anti-IgG1 (1:4000) e anti-IgG2a (1:2000) de camundongo marcados com biotina (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) foram adicionados e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Para a detecção de IgG1 e IgG2a, placas foram incubadas com estreptoavidina/peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi revelada a partir da adição do substrato enzimático 3,3'-tetrahidroclorato de diaminobenzidina (Stable DAB,- Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA), sendo interrompida com água destilada após a visualização das bandas.

Entre cada etapa, as membranas foram lavadas seis vezes com PBS-T para retirada de excedentes.

4.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) e as áreas dos parasitos fagocitados calculadas a partir do software Image J 1.48v. Comparações entre os grupos foram analisados por meio do teste Two-way ANOVA ou One-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.11. Normas de Biossegurança

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

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner L-shaped line nested inside it.

Resultados

5 RESULTADOS

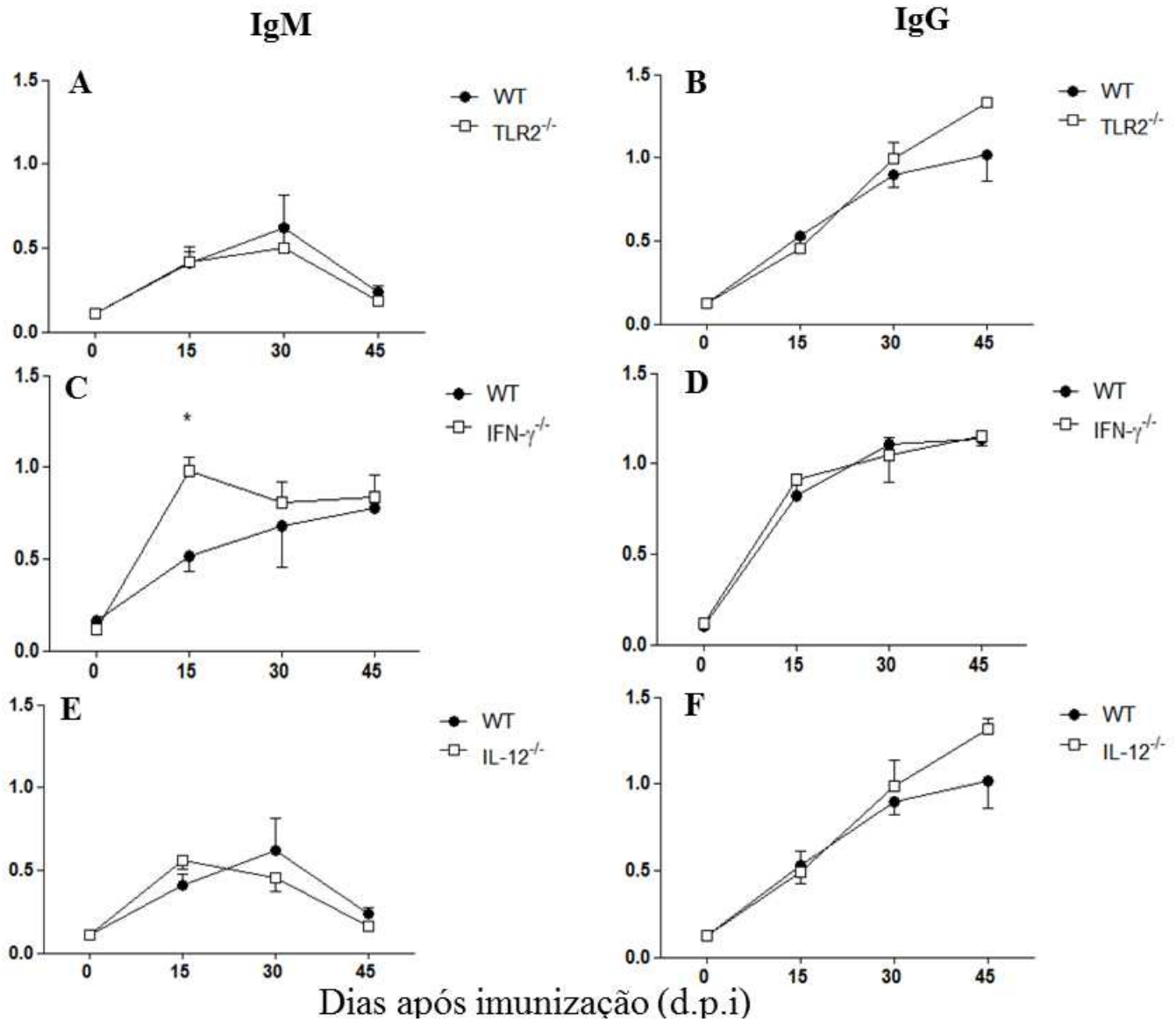
5.1. Produção de anticorpos IgM e IgG não é alterada em camundongos TLR2^{-/-}, IL-12^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}

Para a avaliação da resposta imune humoral na ausência de moléculas específicas da resposta imune Th1 contra *N. caninum*, anticorpos IgM e IgG de camundongos TLR2^{-/-}, IL-12^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foram quantificados por ELISA. Na ausência de TLR2, quando comparados aos camundongos WT, não houve diferença significativa na produção de IgM e IgG (Figura 3A e 3B).

Avaliando a produção de anticorpos contra NLA em animais deficientes de IFN- γ , foi possível perceber que os níveis de IgM encontraram-se aumentados somente após 15 dias da primeira imunização, sendo que tanto IgM (Figura 3C) como IgG (Figura 3D) não se diferenciaram dos camundongos WT após este período.

Analizando essa mesma produção na ausência do gene para a citocina IL-12, não observou-se diferenças significativas em nenhuma das duas classes de anticorpos analisados, comparados aos camundongos WT (Figura 3E e 3F).

Com relação às subclasses de IgG, camundongos TLR2^{-/-} produziram níveis menores de IgG1 145 dias após a imunização e sem diferenciação na produção de IgG2a (Figura 4A e 4B). Quando comparados aos camundongos IFN- γ ^{-/-} imunizados, não houve diferenças significativas detectáveis na produção de subclasses específicas para antígenos solúveis de *N. caninum*, quando comparados aos animais WT (Figura 4C e 4D). Já IL-12^{-/-} produziu anticorpos IgG1 e IgG2a em grandes quantidades, sendo significativamente mais elevadas quando comparados ao WT (Figura 4E e 4F).



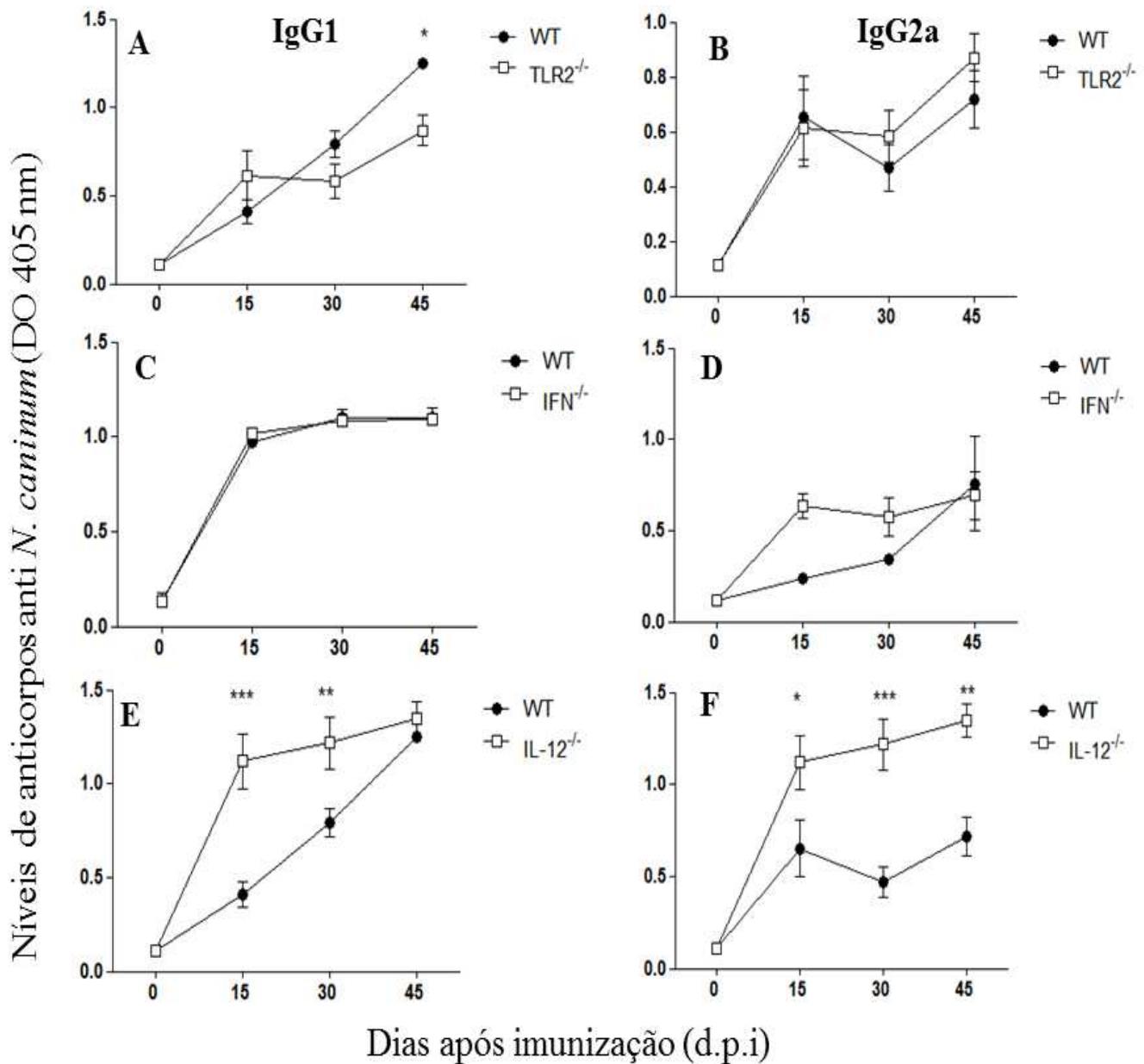


Figura 4 - Cinética da produção de anticorpos antígeno específico em animais imunizados com NLA. Pela técnica de ELISA indireto foi analisado a sororeatividade para anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) em camundongos WT e TLR2^{-/-}, IgG1 (C) e IgG2a (D) em animais WT e IFN- γ ^{-/-}, IgG1 (E) e IgG2a (F) para camundongos WT e IL-12^{-/-} imunizados com aproximadamente 90 μ g de antígeno. A produção de anticorpos foi mensurada até 45 dias após a primeira imunização em soros de ambos os grupos. Valores são indicados como densidade óptica (DO) a 405nm sendo expressos como média \pm SEM, * p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 (Two-Way ANOVA seguido pelo pós - teste de Bonferroni).

5.2. MyD88, MHCII e iNOS influenciam a produção de anticorpos contra NLA

Analisando-se a produção de anticorpos induzidos por camundongos MyD88^{-/-}, imunizados com NLA, houve uma produção significativamente menor de IgM antígeno-específico com 30 dias de imunização quando comparadas ao grupo WT (Figura 5A). Já a produção dos anticorpos IgG ficou diminuída nesses animais até 15 dias após a primeira imunização, mas nos períodos seguintes, esses níveis se igualaram aos do grupo controle (Figura 5B).

Comparando-se os níveis de anticorpos de IgM na ausência de MHCII, 30 dias após a primeira imunização, nenhuma diferença foi encontrada. Após esse período, os títulos de IgM diminuíram significativamente, quando comparados ao WT (Figura 5C). Deve-se destacar que, os anticorpos IgG para esse mesmo grupo foram menores do que o grupo WT após 30 dias da primeira imunização (Figura 5D).

Analisando os níveis de anticorpos em camundongos iNOS^{-/-}, a produção de IgM ficou diminuída nesses animais após 30 dias da primeira imunização mantendo-se baixa até 45 dias (Figura 5E). Já os níveis de IgG não se alteraram em relação ao grupo WT, durante o período analisado (Figura 5F).

Analisando-se as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), entre os grupos MyD88^{-/-} e WT não houve diferenças significativas, exceto pequena diminuição de IgG2a após 45 d.p.i. Já camundongos MHCII^{-/-} demonstraram níveis significativamente reduzidos de anticorpos IgG1 mas não alterados de IgG2a, quando comparados ao grupo WT. Os camundongos iNOS^{-/-} produziram tanto IgG1 quanto IgG2a em quantidades semelhantes aos do grupo WT (Figura 6).

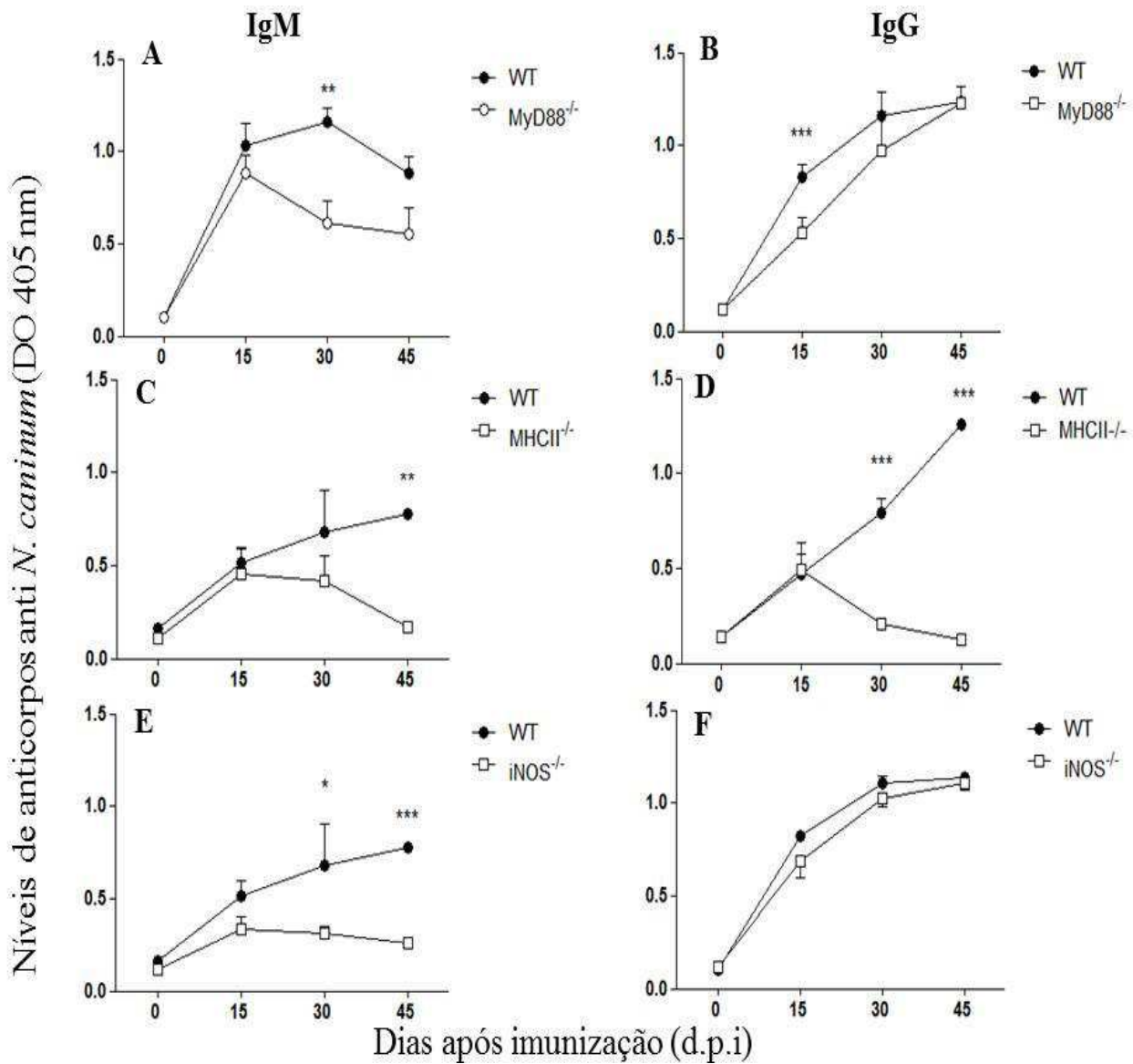


Figura 5 - Cinética da produção de anticorpos antígeno específico em animais imunizados com NLA. Pela técnica de ELISA indireto foi analisado a soro reatividade para anticorpos IgM (A) e IgG (B) em camundongos WT e MHCII^{-/-} e IgM (C) e IgG (D) em animais WT e iNOS^{-/-} imunizados com aproximadamente 90µg de antígeno. A produção de anticorpos foi mensurada até 45 dias após a primeira imunização em soros de ambos os grupos. Valores são indicados como densidade óptica (DO) a 405nm sendo expressos como média e \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós - teste de Bonferroni).

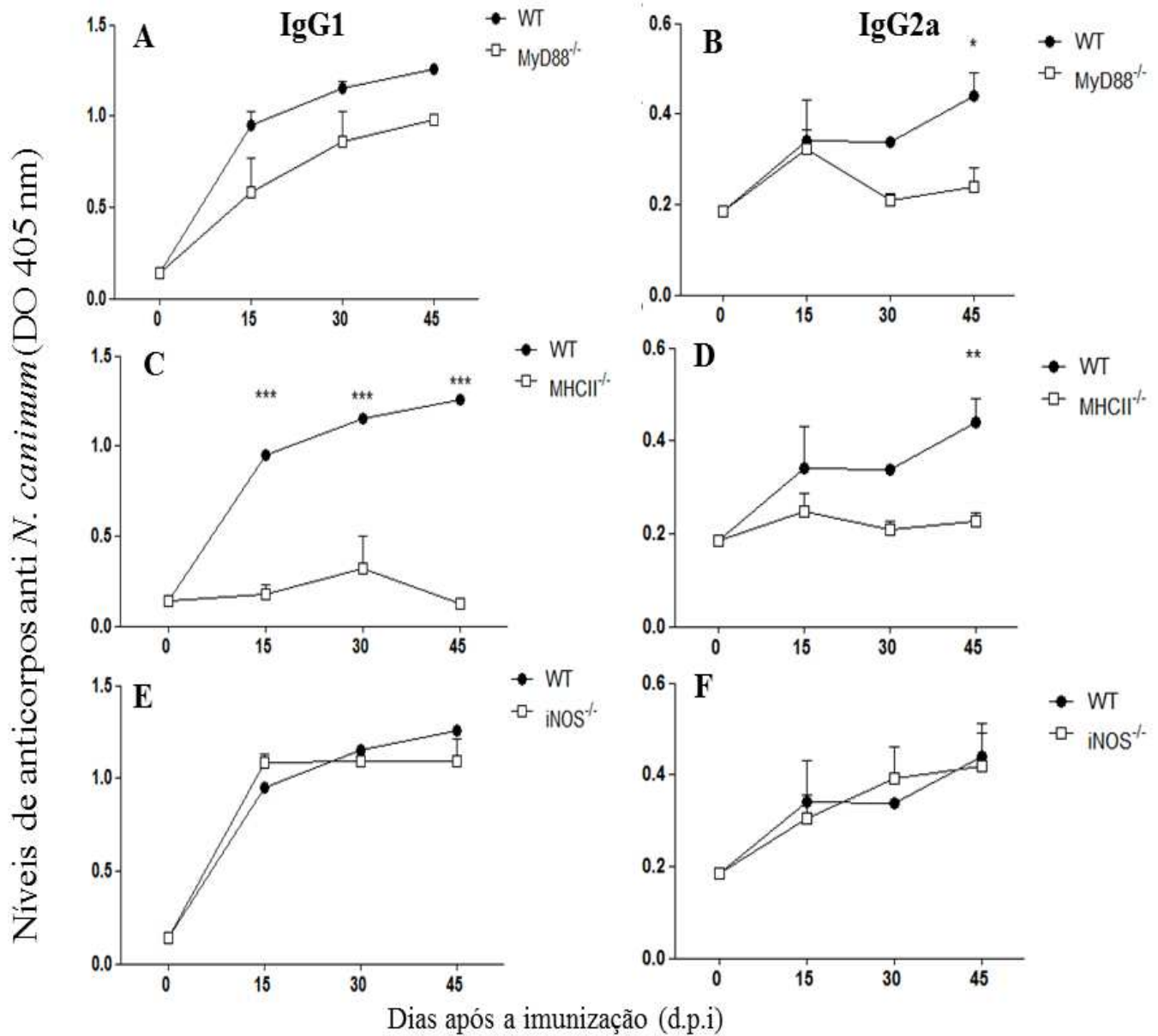


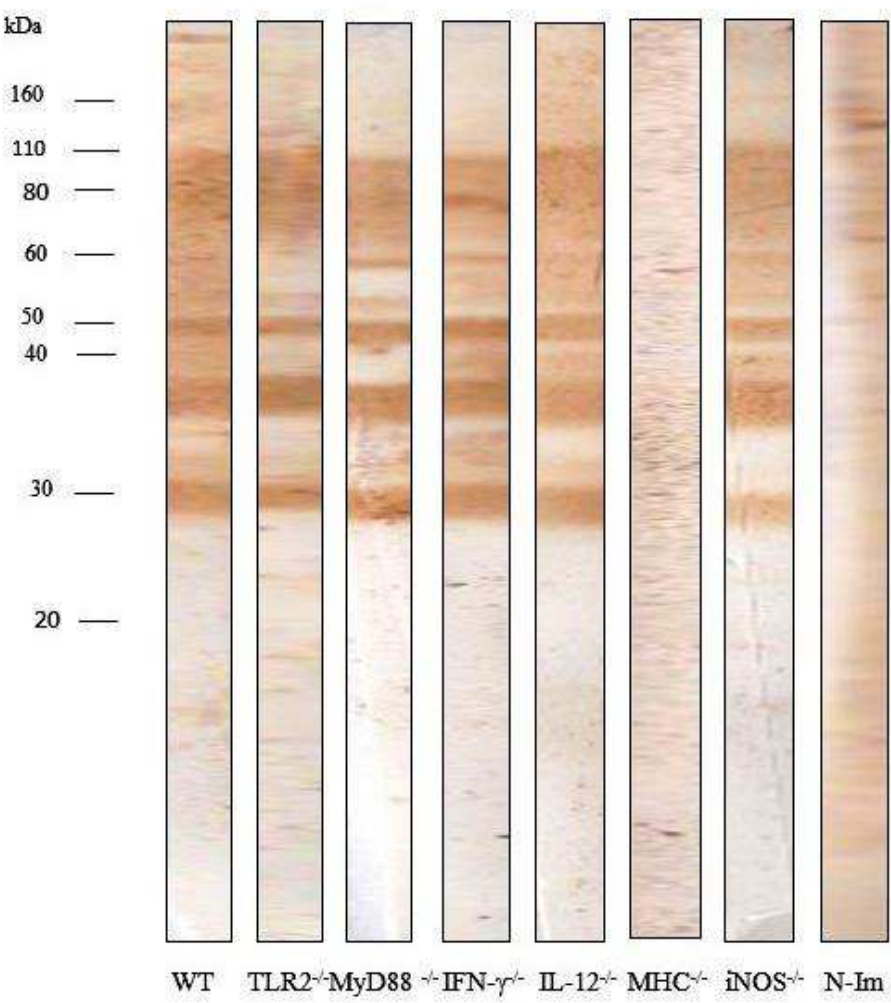
Figura 6 - Cinética da produção de anticorpos antígeno específico em animais imunizados com NLA. Pela técnica de ELISA indireto foi analisada a soro reatividade para anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) em camundongos WT, iNOS^{-/-} e MHCII^{-/-} imunizados com aproximadamente 90µg de antígeno. A produção de anticorpos foi mensurada até 45 dias após a primeira imunização em soros de ambos os grupos. Valores são indicados como densidade óptica (DO) a 405nm sendo expressos como média e \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós - teste de Bonferroni).

5.3. Perfil de reconhecimento antigênico dos anticorpos de camundongos WT e geneticamente modificados frente ao antígeno solúvel de *N. caninum*

Para análise do reconhecimento de antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA) por anticorpos IgG dos diferentes grupos de camundongos após 45 dias de imunização, a técnica do *immunoblotting* foi utilizada. Comparando-se o perfil de reconhecimento de IgG total dos animais geneticamente deficientes com o dos camundongos WT, todos os grupos, com exceção do MHCII, reconheceram as proteínas imunodominantes do NLA, sendo estas de 22-25 kDa, 29-32 kDa e 37-38 kDa (Figura 7A).

O perfil de reconhecimento das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) foi avaliado para os grupos citados acima. Com relação às subclasses IgG1 e IgG2a, podemos destacar que, o grupo MHCII^{-/-}, como esperado, não reconheceu nenhuma proteína imunodominante do antígeno. Já iNOS^{-/-} teve o mesmo perfil de reconhecimento de IgG1 comparado ao WT, porém, os anticorpos IgG2a reconheceram apenas as proteínas imunodominantes, de 29-32 e 37-38 kDa, mas com uma ligação bem fraca. Com relação ao grupo MyD88^{-/-}, as proteínas reconhecidas por IgG1 foram semelhantes comparadas ao WT, já IgG2a não reconheceu nenhuma das proteínas imunodominantes citadas acima (Figura 7B). Os anticorpos IgG2a produzidos por camundongos TLR2^{-/-} imunizados falharam em reconhecer as proteínas imunodominantes de 29-32 kDa. Os demais grupos tiveram um perfil de reconhecimento por IgG1 e IgG2a semelhante ao grupo de camundongos WT imunizados.

A



B

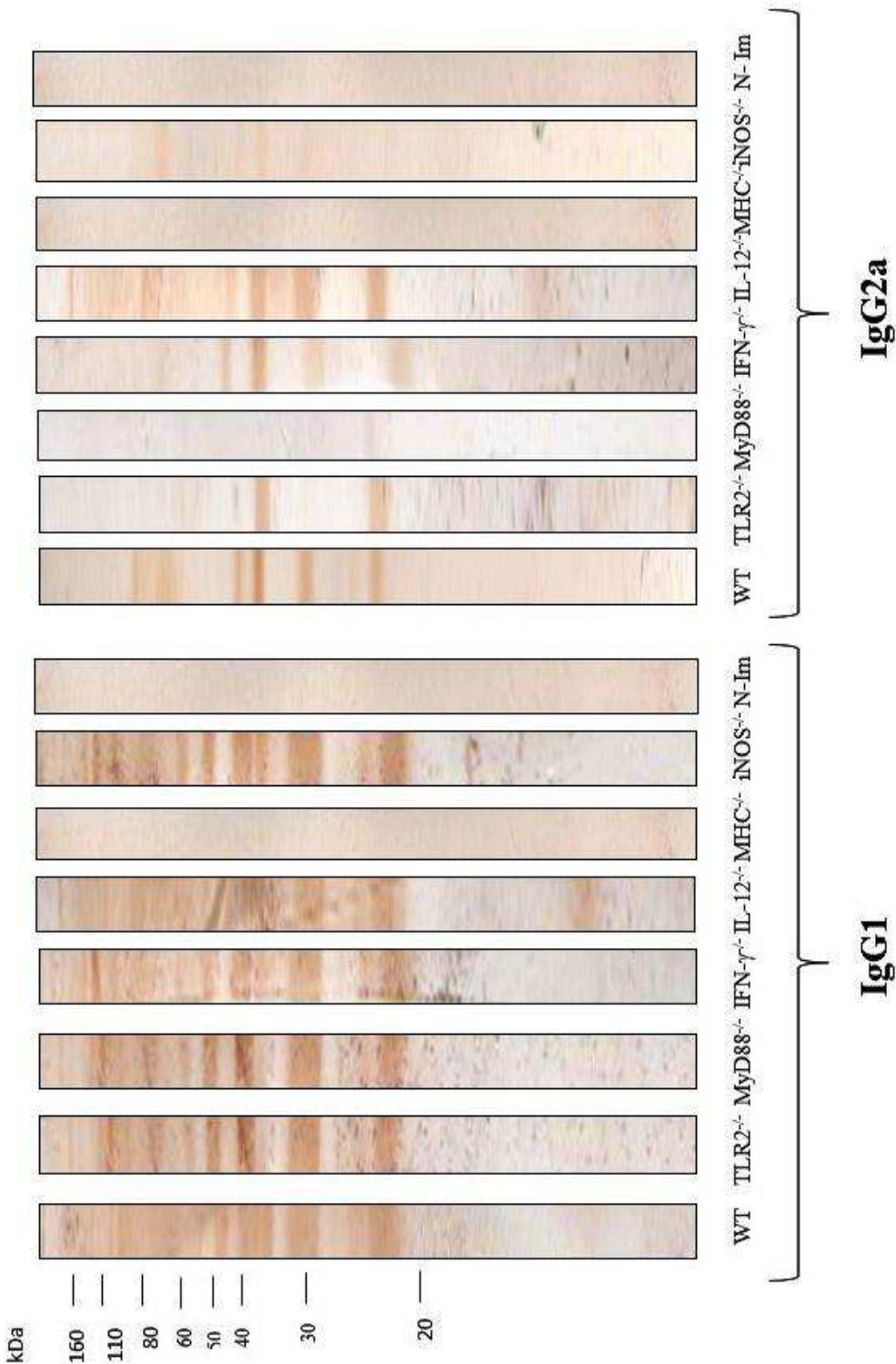


Figura 7 - *Imn*
A: Representa
^{-/-}, iNOS^{-/-} e N-Im (não imunizado), após 45 dias da primeira imunização. Marcadores de peso moleculares e os antígenos imunodominantes estão indicados em kiloDaltons (kDa). B: Representação das proteínas antigências reconhecidas pelas subclasses IgG1 e IgG2a pelos grupos WT, TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, MHC^{-/-}, iNOS^{-/-} e N-Im (não imunizado), após 45 dias da primeira imunização. Marcadores de peso moleculares estão indicados em kiloDaltons (kDa).

5.4. Lise mediada pelo complemento é diminuída nos camundongos geneticamente modificados quando comparados ao grupo WT

A lise mediada pelo complemento é uma das principais funções dos anticorpos no combate a microrganismos. Uma das principais vias de ativação do complemento é a chamada via clássica, que é dependente de imunocomplexos (antígeno – anticorpo) para lisar parasitos. Várias classes de anticorpos são importantes para esse mecanismo e por isso, avaliamos a capacidade de anticorpos de animais WT e geneticamente modificados imunizados com NLA de induzirem a lise parasitária.

Os ensaios demonstraram que a taxa de lise dos parasitos mediada por anticorpos presentes no soro de camundongos WT foi, em média, de 35%. Quanto aos camundongos geneticamente deficientes imunizados, pode-se afirmar que esta taxa foi reduzida (Figura 8). Como destaque negativo, o grupo de camundongos MHCII^{-/-} apresentou uma taxa de lise dos taquizoítos em torno de 3%, sendo a menor quando comparada aos outros grupos. Já os animais iNOS^{-/-}, também apresentaram uma taxa de lise reduzida em relação ao grupo WT, de 9%, demonstrando que MHCII e iNOS, são moléculas cruciais para a ativação da via clássica do complemento.

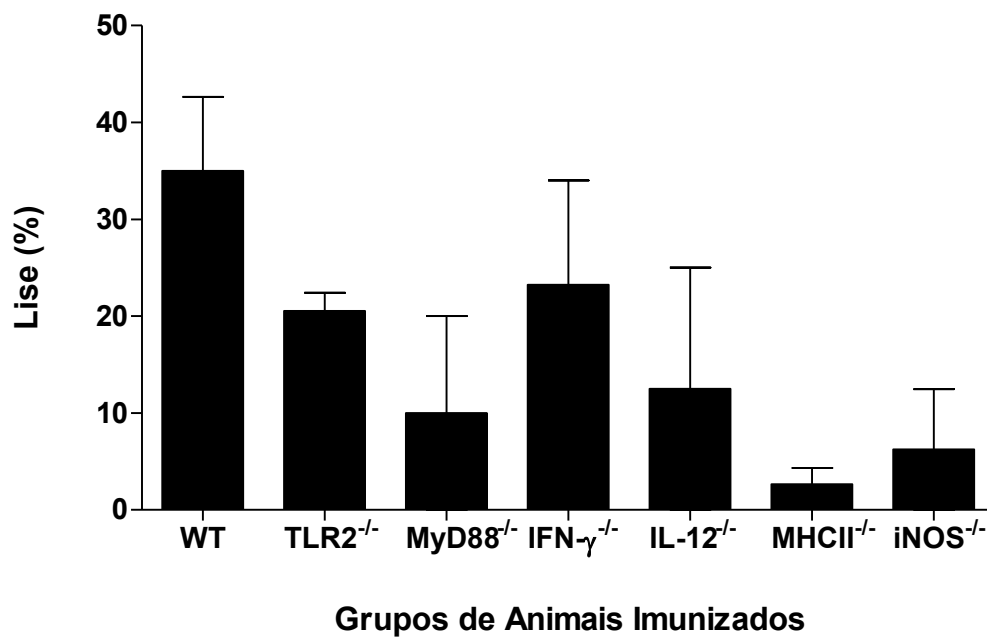


Figura 8 – Lise mediada pelo complemento comparando soro de animais imunizados WT e geneticamente deficientes. A porcentagem de lise foi calculada subtraindo-se o número de parasitos viáveis do grupo não imunizado pelo dos grupos imunizados. Valores estão indicados pela média das contagens em dois experimentos independentes \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (Two-Way ANOVA seguido pelo pós - teste de Bonferroni).

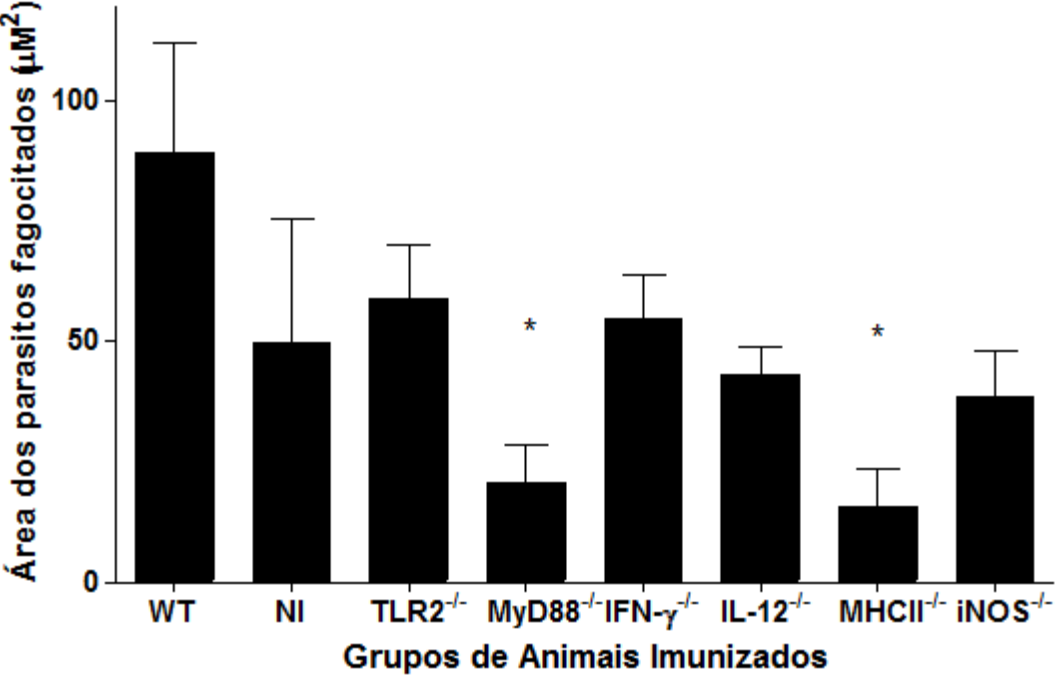
5.5. Opsonização dos parasitos mediada por anticorpos dos grupos WT e animais geneticamente deficientes imunizados com NLA

A opsonização é uma função biológica importante dos anticorpos, pois, sinaliza a presença de microrganismos facilitando a fagocitose. No presente trabalho, os anticorpos presentes no soro dos camundongos WT e geneticamente deficientes para genes importantes da resposta imune foram avaliados quanto à capacidade de opsonização dos parasitos por macrófagos.

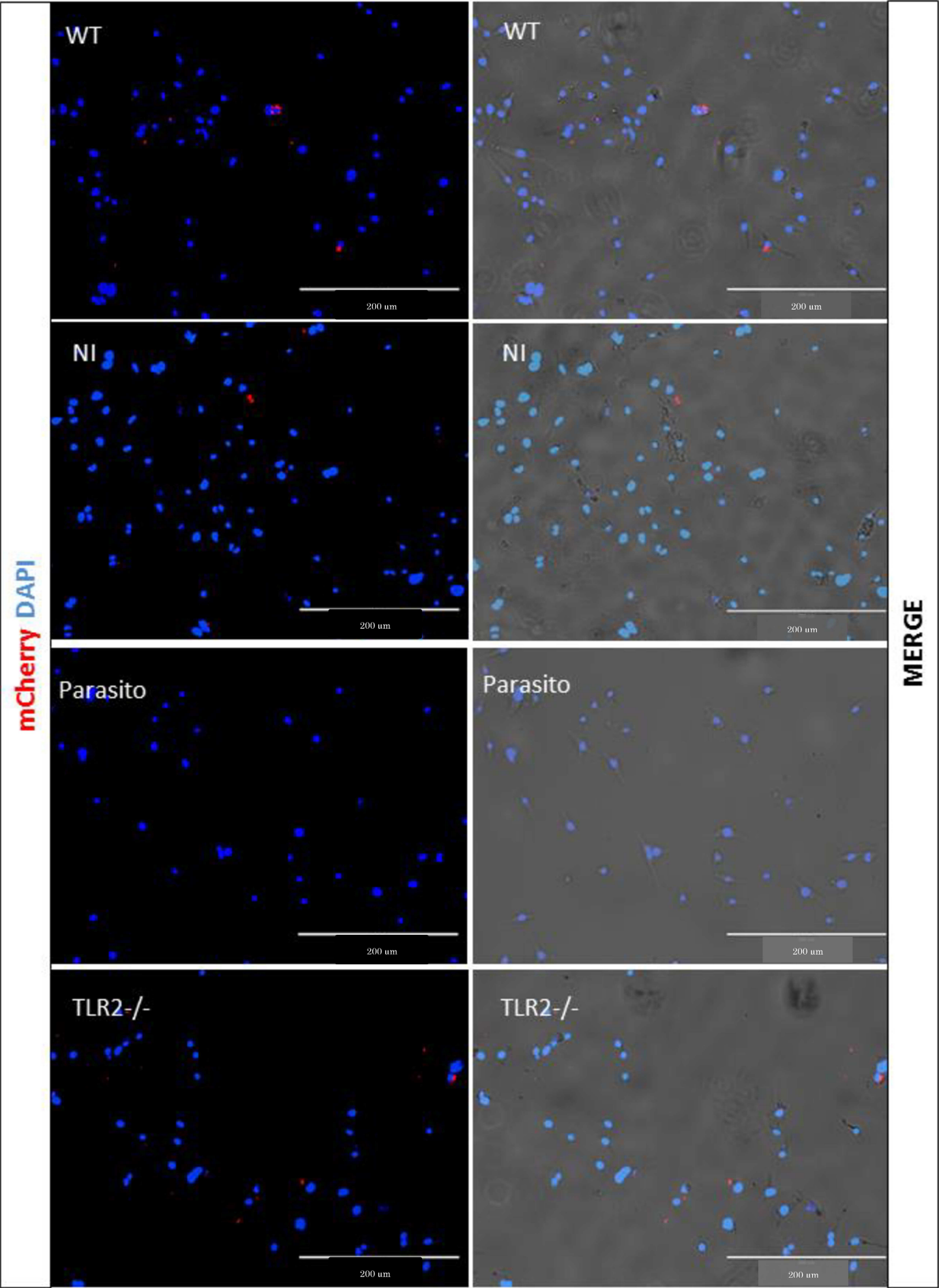
Para isso, a quantificação dos parasitos foi feita a partir da medida da área de fluorescência dos parasitos fagocitados por macrófagos, em campos aleatórios, contando um total de 250 macrófagos por grupo. Foi possível observar que, todos os grupos geneticamente deficientes e imunizados com NLA apresentaram capacidade de opsonização diminuída, quando comparados ao grupo WT. Destacaram-se novamente os soros advindos dos grupos de camundongos MHCII^{-/-}, MyD88^{-/-} e iNOS^{-/-}, que apresentaram as menores médias de áreas de parasitos fagocitados por campo. A área média de fluorescência do grupo WT mensurada foi de 89,2 μM^2 . Em contrapartida, conforme demonstrado na Figura 9 (A e B), parasitos incubados com macrófagos sem a presença de anticorpos, não foram capazes de invadir as células, pois estavam formolizados.

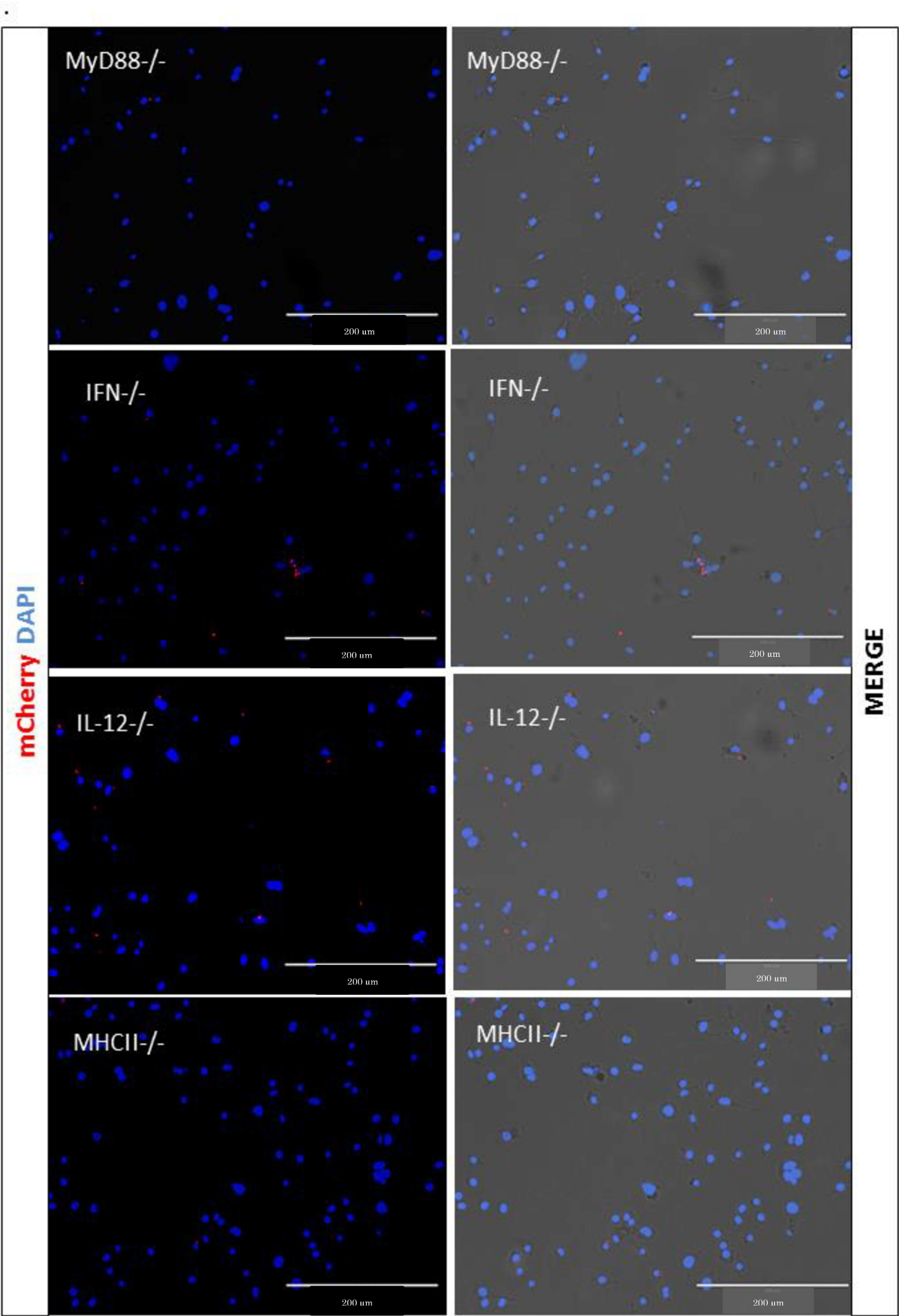
Em relação aos grupos de camundongos geneticamente deficientes, macrófagos incubados com soros advindos de camundongos imunizados do grupo iNOS^{-/-} apresentou reduzida opsonização, com área fluorescente média de 39,2 μM^2 . Já a área dos parasitos fagocitados pelos macrófagos a partir da opsonização induzida pelos anticorpos dos grupos MHCII^{-/-} e MyD88^{-/-} foi significativamente menor, quando comparados ao grupo WT, sendo de 15,2 μM^2 e 20,5 μM^2 , respectivamente (Figura 9A).

A



B





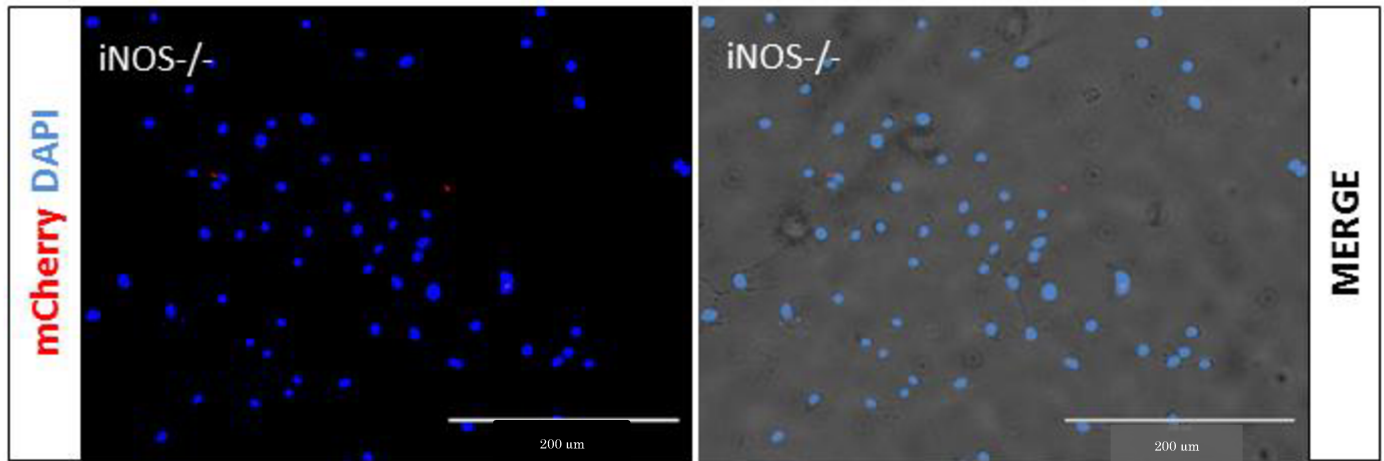


Figura 9 – Avaliação da opsonização por anticorpos e fagocitose por macrófagos. Para avaliar a capacidade de opsonização dos anticorpos, macrófagos foram incubados com Nc-Liv mCherry+ opsonizados e não opsonizados e Nc-Liv mCherry+ com soro de animais não imunizados e imunizados WT, TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, MHCII^{-/-} e iNOS^{-/-}. A: Área de fluorescência em macrófagos foi quantificadas a partir da contagem de 250 células em campos aleatórios no aumento de 200x. Valores estão indicados pela média das contagens em campos aleatórios independentes \pm SEM. B: Fotomicrografias evidenciando as diferenças de parasitos fagocitados entre os grupos. Valores de $*p < 0,05$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$ (One -Way ANOVA seguido pelo pós - teste de Bonferroni).

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner vertical line segment extending upwards from the horizontal line.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A neosporose é uma doença que traz grandes prejuízos para a economia pecuária, podendo chegar a cerca de \$2,4 bilhões de dólares anuais (REICHEL et al., 2013). Por muito tempo, a doença foi negligenciada pelos criadores de bovinos mas atualmente, medidas são emergenciais para o controle da infecção. Uma das principais formas de controle seria através da vacinação do gado bovino, porém não há nenhuma vacina disponível no mercado, visto que pouca eficácia tem sido demonstrada (MONNEY and HEMPHILL, 2014). Dessa forma, o presente trabalho tem uma grande importância, pois avalia fatores que interferem na resposta imune humoral contra antígenos de *N. caninum*.

Os receptores TLR tem grande relevância na produção de anticorpos pois interagem com os linfócitos B, apresentando antígenos e auxiliando na maturação dessas células, que irão produzir os anticorpos posteriormente (PONE et al., 2010).

Nosso estudo demonstrou que, TLR2 não alterou a produção desses anticorpos já que, níveis de IgM e IgG não se diferenciaram do grupo controle. O reconhecimento das proteínas do NLA por IgG e IgG1 bem como a lise e opsonização não foram afetadas. Porém, deve-se ressaltar que os anticorpos IgG2a induzidos por esse grupo não foram capazes de reconhecer um proteína de superfície importante que é de 29-32 kDa. Já foi demonstrado que durante a infecção por *N. caninum*, camundongos TLR2^{-/-} tiveram uma maior susceptibilidade quando comparados aos WT, sendo importantes tanto para a imunidade celular quanto para a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a. No nosso trabalho, a produção de IgG1 após 45 dias da primeira imunização também foi menor. Devemos destacar que no modelo de imunização utilizado, mecanismos alternativos podem ter sido ativados para auxiliar a produção de anticorpos na ausência desse receptor. Estudos recentes demonstraram que uma via independente de TLR induz a produção de anticorpos através do inflamossoma NLRP3, ASC e caspase – 1, ativados por componentes presentes em adjuvantes (Alumen, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund e RIBI) (GAVIN et al., 2006; WEN and SHI, 2016).

Algumas proteínas presentes nos taquizoítas de *N. caninum*, como por exemplo as profilinas, mostraram capacidade de ligação a esses receptores TLR e induzem uma forte resposta imune tipo Th1. Um modelo de vacina que foi proposto por Martinez e colaboradores, utilizou um adjuvante bacteriano (Opr11) que se liga ao receptor TLR2 e uma proteína de micronema do *N. caninum*. Tal vacina induziu um perfil de resposta tipo Th2 (baixas doses de IgG2a e grande quantidade de IL-4 e IL-10) porém, nenhuma proteção aos camundongos foi conferida (AGUADO-MARTINEZ et al., 2016).

Durante a infecção por *N. caninum*, a via de TLR2 induz citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-12 que possuem grande importância no controle da replicação do parasito (BASZLER et al., 1999; BOTELHO et al., 2007). Na ausência dessas citocinas, a produção de IgM, IgG, o reconhecimento dos antígenos de superfície do parasito e a opsonização não sofreram alterações, ou no caso da ausência de IL-12, os níveis de IgG2a até aumentaram. Esses resultados corroboram com o anterior, já que essas citocinas estão intimamente relacionadas com o receptor TLR2 e o perfil de não alteração da produção de anticorpos se manteve para esses camundongos. Então, uma via independente de IL-12 parece ter sido ativada, culminando na maior produção de anticorpos IgG, principalmente da subclasse IgG2a.

A molécula adaptadora citoplasmática MyD88, está relacionada com a maioria dos TLR sendo responsáveis pela indução da síntese de diversas citocinas citoplasmáticas como IL-12, IFN- γ e TNF (TAKEDA and AKIRA, 2005). Na infecção por *N. caninum*, já foi demonstrado que MyD88 é importante no controle do parasitismo e indução dessas citocinas pró – inflamatórias (MINEO et al., 2009). A produção de anticorpos nos camundongos MyD88^{-/-} mostrou-se deficiente para IgM com 30 dias após a primeira imunização e para IgG com 15 dias. A produção dos níveis de IgG1 por ELISA indireto não teve diferenças quando comparados ao WT, mas os níveis de IgG2a tiveram uma diminuição, fato que foi demonstrado também no *imunoblotting* já que, a IgG2a desses animais, com 45 dias após a imunização, não foi capaz de reconhecer nenhuma dessas proteínas de superfície. A lise dos parasitos apesar de não ter sido significativamente menor quando comparados ao grupo WT, teve uma redução. Esse grupo demonstrou ainda uma taxa muito pequena de fagocitose pelos macrófagos mostrando que os anticorpos induzidos na ausência de MyD88 não foram capazes de opsonizar os parasitos de forma eficiente. Trabalhos que desenvolveram modelos de vacinas que exacerbam a via dependente MyD88 induzida por receptores como, TLR2 e TLR9, tiveram resultados de proteção eficaz em bovinos, confirmando a importância dessa molécula na indução da produção de anticorpos (MANSILLA et al., 2016a; MANSILLA et al., 2016b).

Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que óxido nítrico secretado por macrófagos é muito importante para o controle intracelular de *N. caninum*, e que a sua secreção é dependente de IFN- γ (TANAKA et al., 2000; BRAKE, 2002). Com relação a produção de anticorpos, pouco se sabe a respeito do papel do óxido nítrico porém, nosso trabalho mostrou que esse fator está relacionado com a produção de IgM, visto que com 30 dias na ausência de iNOS, esses níveis foram bem menores. A produção de IgG total foi igual quando comparado ao do grupo WT mas, com relação a lise e opsonização dos parasitos, apesar de não ter tido

diferenças significativas, essas funções se mostraram deficientes. Tal fator pode ser explicado pelo fato de que, esses camundongos apresentaram baixos níveis de IgM e apesar da produção de IgG e as subclasses IgG1 e IgG2a não terem tido diferenças com o grupo WT, o reconhecimento dos antígenos de NLA por IgG2a foi bem deficiente, como mostrado no *immunoblotting*, sugerindo que esses anticorpos apesar de terem tido a mesma quantidade de produção, não tiveram a mesma qualidade dos produzidos pelos WT.

Durante a infecção por *N. caninum*, a molécula MHCII tem uma papel chave na apresentação de antígenos para as células TCD4+, induzindo a produção de citocinas pro inflamatórias e também a diferenciação de células B. Nosso trabalho confirmou que MHCII é importante para a produção de anticorpos tanto IgM que com 45 dias tiveram os níveis diminuídos e de IgG e as subclasses IgG1 e IgG2a, que ficaram deficientes em todo o período de imunização. Na ausência dessa molécula, o reconhecimento antigênico das proteínas do NLA foi nulo, tanto para IgG quanto para as subclasses. As funções de lise mediada pelo complemento foram afetadas, visto que MHCII teve a menor taxa, comparada aos outros grupos. A opsonização dos parasitos também foi deficiente, o que diminuiu a área de parasitos fagocitados, fato semelhante ao que aconteceu com os camundongos MyD88^{-/-} e iNOS^{-/-}.

Nos casos citados acima, não houve reconhecimento das proteínas antigênicas do parasito, ou este foi bem diminuído, pela subclasse IgG2a. Estudos mostram que essa subclasse está relacionada principalmente com o perfil de resposta imune tipo Th1, o que corrobora com os resultados obtidos, visto que estamos estudando fatores relacionados a essa via de indução (ANDRIANARIVO et al., 2005).

Alguns trabalhos utilizando vacinas que induzem a resposta imune Th1 obtiveram resultados interessantes. Um recente modelo de vacina, utilizou extrato de proteínas nativas do parasito, juntamente com adjuvante (Providean-AVEC) e foi capaz de exacerbar a resposta imune com o perfil Th1, aumentando IFN- γ e IgG2a. Nesses camundongos imunizados, o parasitismo, bem como lesões histológicas no cérebro não foram encontradas (MANSILLA et al., 2012).

Outro estudo utilizando uma cepa atenuada de *N. caninum* (Nc – Spain 1) também teve um perfil de indução de resposta imune tipo Th1, em um modelo de imunização congênita. Quando utilizada em baixas doses, esse antígeno foi capaz de induzir altos níveis de IgG2a, conferindo proteção ao feto e diminuindo a neosporose cerebral (ROJO-MONTEJO et al., 2012).

Portanto, MyD88, MHCII e iNOS interferem na produção de anticorpos contra NLA e em algumas funções biológicas dos mesmos. O desenvolvimento de vacinas que utilizem, por

exemplo, mecanismos de aumento da ativação dos sinais MyD88 e secreção de iNOS, ou que auxiliem MHCII na apresentação de antígenos podem ser bem eficientes. Deve-se ressaltar que algumas perspectivas no que diz respeito ao entendimento da produção de anticorpos dependentes de fatores essenciais para a resposta imune celular como TLR2, IFN- γ e IL-12 foram elucidadas. Pesquisas a respeito de como todos esses fatores interferem na resposta imune humoral contra *N. caninum* ainda precisam ser melhor elucidadas.

A decorative L-shaped line consisting of a thick vertical line on the left and a thick horizontal line at the bottom, with a thinner vertical line segment extending upwards from the horizontal line.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos foi possível concluir que TLR2 e IFN- γ não interferem na produção dos anticorpos IgM e IgG, já na ausência de IL-12, os níveis de IgG1 e IgG2a aumentaram. A ausência de iNOS demonstrou ser importante para a produção de IgM, a molécula adaptadora MyD88 e o MHCII foram cruciais tanto para a produção de IgM e IgG quanto para a opsonização dos parasitos por anticorpos e posterior fagocitose pelos macrófagos. Deve-se ressaltar que, o reconhecimento antigênico das proteínas imunodominantes do NLA foram alteradas pelos anticorpos IgG2a induzidos nos camundongos MyD88^{-/-}, MHCII^{-/-} e iNOS^{-/-}. Portanto, fatores relacionados a resposta imune Th1 como MyD88, MHCII e iNOS alteram a produção e a qualidade dos anticorpos frente a imunização com NLA.

A decorative L-shaped line consisting of a vertical line on the left and a horizontal line at the bottom, both starting from the same point and extending to the right and down respectively.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-CADER, M.S., AMARASINGHE, A., ABDUL-CAREEM, M.F. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. **Arch Virol**, v. 161, n. 8, p. 2075-2086, 2016.

AGUADO-MARTINEZ, A., BASTO, A.P., MULLER, J., BALMER, V., MANSER, V., LEITAO, A., HEMPHILL, A. N-terminal fusion of a toll-like receptor 2-ligand to a *Neospora caninum* chimeric antigen efficiently modifies the properties of the specific immune response. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 606-616, 2016.

ALMERÍA, S. *Neospora caninum* and Wildlife. **ISRN Parasitology**, v. 2013, n. 23, 2013.

ANDRIANARIVO, A.G., ANDERSON, M.L., ROWE, J.D., GARDNER, I.A., REYNOLDS, J.P., CHOROMANSKI, L., CONRAD, P.A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitol Res**, v. 96, n. 1, p. 24-31, 2005.

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

BARBER, J.S., TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Vet Rec**, v. 139, n. 18, p. 439-443, 1996.

BARTELS, C.J., VAN SCHAIK, G., VELDHUISEN, J.P., VAN DEN BORNE, B.H., WOUDE, W., DIJKSTRA, T. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. **Prev Vet Med**, v. 77, n. 3-4, p. 186-198, 2006.

BASZLER, T.V., LONG, M.T., MCELWAIN, T.F., MATHISON, B.A. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1635-1646, 1999.

BEITING, D.P., PEIXOTO, L., AKOPYANTS, N.S., BEVERLEY, S.M., WHERRY, E.J., CHRISTIAN, D.A., HUNTER, C.A., BRODSKY, I.E., ROOS, D.S. Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88398, 2014.

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

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

BRAKE, D.A. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 5, p. 509-515, 2002.

BUXTON, D., MCALLISTER, M.M., DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

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

COLLANTES-FERNANDEZ, E., LOPEZ-PEREZ, I., ALVAREZ-GARCIA, G., ORTEGA-MORA, L.M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, p. 2491-2494, 2006.

DONAHOE, S.L., LINDSAY, S.A., KROCKENBERGER, M., PHALEN, D., SLAPETA, J.A. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015.

DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTA, J.R., BJERKAS, I., BJORKMAN, C., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., BUXTON, D., ELLIS, J.T., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A., HILL, D.E., HOWE, D.K., JENKINS, M.C., KOBAYASHI, Y., KOUDELA, B., MARSH, A.E., MATTSSON, J.G., MCALLISTER, M.M., MODRY, D., OMATA, Y., SIBLEY, L.D., SPEER, C.A., TREES, A.J., UGGLA, A., UPTON, S.J., WILLIAMS, D.J., LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002a.

DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTA, J.R., BJERKÅS, I., BJÖRKMAN, C., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., BUXTON, D., ELLIS, J.T., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A., HILL, D.E., HOWE, D.K., JENKINS, M.C., KOBAYASHI, Y., KOUDELA, B., MARSH, A.E., MATTSSON, J.G., MCALLISTER, M.M., MODRÝ, D., OMATA, Y., SIBLEY, L.D., SPEER, C.A., TREES, A.J., UGGLA, A., UPTON, S.J., WILLIAMS, D.J., LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002b.

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J., UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., RAJENDRAN, C., MISKA, K., FERREIRA, L.R., MARTINS, J., KWOK, O.C.H., CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Vet Parasitol**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 67, n. 1, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J.P., SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J.P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007a.

DUBEY, J.P., SREEKUMAR, C., KNICKMAN, E., MISKA, K.B., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., HILL, D.E., JENKINS, M.C., LINDSAY, D.S., GREENE, C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 10, p. 1157-1167, 2004.

DUBEY, J.P., VIANNA, M.C., KWOK, O.C., HILL, D.E., MISKA, K.B., TUO, W., VELMURUGAN, G.V., CONORS, M., JENKINS, M.C. Neosporosis in Beagle dogs: clinical

signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Vet Parasitol**,v. 149,n. 3-4,p. 158-166,2007b.

DUNKELBERGER, J.R., SONG, W.C.Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res**,v. 20,n. 1,p. 34-50,2010.

ENTRICAN, G.Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J Comp Pathol**,v. 126,n. 2-3,p. 79-94,2002.

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

FORTHAL, D.N.Functions of Antibodies. **Microbiology spectrum**,v. 2,n. 4,p. 1-17,2014.

GAVIN, A.L., HOEBE, K., DUONG, B., OTA, T., MARTIN, C., BEUTLER, B., NEMAZEE, D.Adjuvant-enhanced antibody responses occur without Toll-like receptor signaling. **Science**,v. 314,n. 5807,p. 1936-1938,2006.

GONDIM, L.F., MCALLISTER, M.M., PITT, W.C., ZEMLICKA, D.E.Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**,v. 34,n. 2,p. 159-161,2004a.

GONDIM, L.F.P., MCALLISTER, M.M., MATEUS-PINILLA, N.E., PITT, W.C., MECH, L.D., NELSON, M.E.TRANSMISSION OF NEOSPORA CANINUM BETWEEN WILD AND DOMESTIC ANIMALS. **Journal of Parasitology**,v. 90,n. 6,p. 1361-1365,2004b.

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**,v. 13,n. 0,p. 133-150,2013.

GUIDO, S., KATZER, F., NANJIANI, I., MILNE, E., INNES, E.A.Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends Parasitol**,v. 32,n. 2,p. 131-143,2016.

HALL, C.A., REICHEL, M.P., ELLIS, J.T.Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Vet Parasitol**,v. 128,n. 3-4,p. 231-241,2005.

HEMPHILL, A.Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. **Infect Immun**,v. 64,n. 10,p. 4279-4287,1996.

HEMPHILL, A., AGUADO-MARTINEZ, A., MULLER, J.Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**,v. 143,n. 3,p. 245-259,2016.

HEMPHILL, A., DEBACHE, K., MONNEY, T., SCHORER, M., GUIONAUD, C., ALAEDDINE, F., MUELLER, N., MUELLER, J.Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Front Biosci (Elite Ed)**,v. 5,n. 23-36,2013.

HEMPHILL, A., GOTTSTEIN, B., KAUFMANN, H.Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**,v. 112 (Pt 2),n. 183-197,1996.

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

HORCAJO, P., REGIDOR-CERRILLO, J., AGUADO-MARTINEZ, A., HEMPILL, A., ORTEGA-MORA, L.M. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite Immunol**, v. 2016.

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

JENKINS, M.C., TUO, W., FENG, X., CAO, L., MURPHY, C., FETTERER, R. *Neospora caninum*: cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profilin. **Exp Parasitol**, v. 125, n. 4, p. 357-362, 2010.

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

KING, J.S., ŠLAPETA, J., JENKINS, D.J., AL-QASSAB, S.E., ELLIS, J.T., WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANDMANN, J.K., GUNN, A.A., O'DONOGHUE, P.J., TRANTER, W.P., MCGOWAN, M.R. Epidemiology and impact of *Neospora caninum* infection in three Queensland tropical dairy herds. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 4, p. 734-737, 2011.

LANDMANN, J.K., JILLELLA, D., O'DONOGHUE, P.J., MCGOWAN, M.R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Aust Vet J**, v. 80, n. 8, p. 502-503, 2002.

LASRI, S., DE MEERSCHMAN, F., RETTIGNER, C., FOCANT, C., LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Vet Parasitol**, v. 123, n. 1-2, p. 25-32, 2004.

LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet Parasitol**, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

LOBATO, J., SILVA, D.A.O., MINEO, T.W.P., AMARAL, J.D.H.F., SEGUNDO, G.R.S., COSTA-CRUZ, J.M., FERREIRA, M.S., BORGES, A.S., MINEO, J.R. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

MACÊDO JÚNIOR, Arlindo Gomes de. Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* com potencial para produção de insumos em diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose.

2013. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MANSILLA, F.C., FRANCO-MAHECHA, O.L., LAVORIA, M.A., MOORE, D.P., GIRALDEZ, A.N., IGLESIAS, M.E., WILDA, M., CAPOZZO, A.V. The immune enhancement of a novel soy lecithin/beta-glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 6, p. 1124-1131, 2012.

MANSILLA, F.C., QUINTANA, M.E., CARDOSO, N.P., CAPOZZO, A.V. Fusion of foreign T-cell epitopes and addition of TLR agonists enhance immunity against *Neospora caninum* profilin in cattle. **Parasite Immunol**, v. 38, n. 11, p. 663-669, 2016a.

MANSILLA, F.C., QUINTANA, M.E., LANGELLOTTI, C., WILDA, M., MARTINEZ, A., FONZO, A., MOORE, D.P., CARDOSO, N., CAPOZZO, A.V. Immunization with *Neospora caninum* profilin induces limited protection and a regulatory T-cell response in mice. **Exp Parasitol**, v. 160, n. 1-10, 2016b.

MCALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., JOLLEY, W.R., WILLS, R.A., MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S.d., CRUVINEL, W.d.M., ANDRADE, L.E.C., SILVA, N.P.d. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 552-580, 2010.

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

MINEO, T.W., OLIVEIRA, C.J., GUTIERREZ, F.R., SILVA, J.S. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 8, p. 825-833, 2010.

MINEO, T.W.A., S.; NASLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 5, 2006.

MONNEY, T., HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Exp Parasitol**, v. 140, n. 52-70, 2014.

MOORE, D.P., ECHAIDE, I., VERNA, A.E., LEUNDA, M.R., CANO, A., PEREYRA, S., ZAMORANO, P.I., ODEÓN, A.C., CAMPERO, C.M. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Vet Parasitol**, v. 175, n. 3-4, p. 245-251, 2011.

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

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M., 2008. Janeway's Immunobiology, 7 ed. Garland Science, New York.

ORTEGA-MORA, L.M., FERRE, I., DEL-POZO, I., CAETANO-DA-SILVA, A., COLLANTES-FERNANDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., UGARTE-GARAGALZA, C., ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

PATITUCCI, A.N., PÉREZ, M.J., ROZAS, M.A., ISRAEL, K.F. Neosporosis canina: Presencia de anticuerpos sericos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 33, n. 227-232, 2001.

PONE, E.J., ZAN, H., ZHANG, J., AL-QAHTANI, A., XU, Z., CASALI, P. Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses. **Crit Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 1-29, 2010.

RASMUSSEN, S.B., REINERT, L.S., PALUDAN, S.R. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. **APMIS**, v. 117, n. 5-6, p. 323-337, 2009.

REGIDOR-CERRILLO, J., ARRANZ-SOLÍS, D., BENAVIDES, J., GÓMEZ-BAUTISTA, M., CASTRO-HERMIDA, J.A., MEZO, M., PÉREZ, V., ORTEGA-MORA, L.M., GONZÁLEZ-WARLETA, M. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Vet Res**, v. 45, n. 1, p. 10-10, 2014.

REICHEL, M.P., ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M., GONDIM, L.F.P., ELLIS, J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

REICHEL, M.P., ELLIS, J.T., DUBEY, J.P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **J Small Anim Pract**, v. 48, n. 6, p. 308-312, 2007.

REICHEL, M.P., MCALLISTER, M.M., POMROY, W.E., CAMPERO, C., ORTEGA-MORA, L.M., ELLIS, J.T. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1455-1470, 2014.

REID, A.J., VERMONT, S.J., COTTON, J.A., HARRIS, D., HILL-CAWTHORNE, G.A., KONEN-WAISMAN, S., LATHAM, S.M., MOURIER, T., NORTON, R., QUAIL, M.A., SANDERS, M., SHANMUGAM, D., SOHAL, A., WASMUTH, J.D., BRUNK, B., GRIGG, M.E., HOWARD, J.C., PARKINSON, J., ROOS, D.S., TREES, A.J., BERRIMAN, M., PAIN, A., WASTLING, J.M. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: *Coccidia* differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002567, 2012.

ROBBE, D., PASSARELLI, A., GLORIA, A., DI CESARE, A., CAPELLI, G., IORIO, R., TRAVERSA, D. *Neospora caninum* seropositivity and reproductive risk factors in dogs. **Exp Parasitol**, v. 164, n. 31-35, 2016.

ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNANDEZ, E., LOPEZ-PEREZ, I., RISCO-CASTILLO, V., PRENAFETA, A., ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. **Vet Res**, v. 43, n. 62, 2012.

- ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNANDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., RODRIGUEZ-BERTOS, A., PRENAFETA, A., GOMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L.M. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. **Vet Parasitol**, v. 175, n. 3-4, p. 220-229, 2011.
- ROSSI, G.F., CABRAL, D.D., RIBEIRO, D.P., PAJUABA, A.C.A.M., CORRÊA, R.R., MOREIRA, R.Q., MINEO, T.W.P., MINEO, J.R., SILVA, D.A.O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Vet Parasitol**, v. 175, n. 3-4, p. 252-259, 2011.
- RUS, H., CUDRICI, C., NICULESCU, F. The role of the complement system in innate immunity. **Immunol Res**, v. 33, n. 2, p. 103-112, 2005.
- SARMA, J.V., WARD, P.A. The complement system. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.
- SCOTT, P., PEARCE, E., NATOVITZ, P., SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **J Immunol**, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987.
- SICUPIRA, P.M., DE MAGALHAES, V.C., GALVAO GDA, S., PEREIRA, M.J., GONDIM, L.F., MUNHOZ, A.D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 185, n. 2-4, p. 305-308, 2012.
- SILVA, D.A., LOBATO, J., MINEO, T.W., MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.
- SINAI, A.P., JOINER, K.A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Biol**, v. 154, n. 1, p. 95-108, 2001.
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. **J Protozool**, v. 36, n. 5, p. 458-463, 1989.
- TAKEDA, K., AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.
- TANAKA, T., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., SUZUKI, N., MIKAMI, T. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. **Parasitol Res**, v. 86, n. 9, p. 768-771, 2000.
- UGGLA, A., STENLUND, S., HOLMDAHL, O.J., JAKUBEK, E.B., THEBO, P., KINDAHL, H., BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.
- UNANUE, E.R., TURK, V., NEEFJES, J. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. **Annu Rev Immunol**, v. 34, n. 265-297, 2016.
- WEN, Y., SHI, Y. Alum: an old dog with new tricks. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 3, p. e25, 2016.

WESTON, J.F., HEUER, C., WILLIAMSON, N.B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Prev Vet Med**, v. 103, n. 2-3, p. 136-144, 2012.

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

WILLIAMS, D.J.L., HARTLEY, C.S., BJÖRKMAN, C., TREES, A.J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v. 136, n. Special Issue 14, p. 1895-1900, 2009.