



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**Papel de vias de reconhecimento inato na resistência frente a infecção oral por *Neospora caninum* em camundongos**

**Flávia Batista Ferreira França**

**Uberlândia – MG**

**Fevereiro – 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**Papel de vias de reconhecimento inato na resistência frente a infecção oral por *Neospora caninum* em camundongos**

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

**Flávia Batista Ferreira França**

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

**Uberlândia – MG**

**Fevereiro – 2019**

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

---

F814p  
2019

França, Flávia Batista Ferreira, 1987

Papel de vias de reconhecimento inato na resistência frente a infecção oral por *Neospora caninum* em camundongos [recurso eletrônico] / Flávia Batista Ferreira França. - 2019.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1215>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Neospora*. 3. Citocinas. 4. Parasitóides - Ecologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Flávia Batista-Ferreira França

"Papel de vias de reconhecimento inato na resistência frente a infecção oral por *Neospora cuniculi* em camundongos"

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Bancos Examinadora:

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2019.

Prof. Dra. Ana Patricia Yatsuda Natsui  
USP

Prof. Dr. João Luis Garcia  
UEL

Prof. Dra. Neide Macia da Silva  
ICBIM/UFU

Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa  
ICBIM/UFU

Prof. Dr. José Roberto Mineo (coordenador)  
ICBIM/UFU

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

# Agradecimientos

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por tudo que fez e tem feito em minha vida e por ter me colocado em uma  
família extraordinária;

Aos meus queridos e amados pais Euripedes e Ione pelo amor, carinho, educação,  
confiança e incentivo. Vocês são a minha inspiração e motivação;

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

Aos meus tesouros, Yasmin, Jordana, Isabella e Beatriz por colocar tanta felicidade  
em minha vida;

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

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, pelo apoio, incentivo, confiança, ensinamentos, pelo tempo disponibilizado e paciência durante todos esses anos de orientação, deste a iniciação científica, suas contribuições me ajudaram muito não só a crescer na área da pesquisa mas também na vida pessoal. Muito obrigada !!!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Maria Santiago por ter me ensinado os primeiros passos dentro do Laboratório de Imunologia, pela confiança, incentivo e pelas conversas na hora do café.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. José Roberto Mineo, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança e incentivo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra Neide Maria da Silva pela colaboração e disponibilidade em me ajudar.

À todos os colaboradores deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa por terem aceito o convite.

Aos amigos que fiz nessa caminhada científica Arlindo, Eduardo, Murilo e Patrício pela paciência, pelos momentos descontraídos, pelos ensinamentos e pela força.

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

Às amigas da Biologia por todos os momentos vividos sempre aguentando minhas manias de velha.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Carolina, Caroline, Cristina, David, Eliézer, Fernando, Heber, Lucas, Mariana, Tamires, Vanessa Miranda, Vanessa Resende, pela ajuda na realização dos experimentos, companheirismo, pelos conhecimentos compartilhados, pelo ótimo convívio, pelos momentos de descontração, tornando os dias sempre agradáveis.

Aos demais companheiros que passaram pelo Laboratório de Imunoparasitologia e que de alguma forma contribuíram para o meu conhecimento e crescimento.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Ana Cláudia, Júnior, 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.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formas evolutivas de <i>N. caninum</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Ciclo Biológico de <i>N. caninum</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Cinética da produção de anticorpos IgG e citocinas de padrão Th1 no soro de camundongos infectados pela via oral por <i>N. caninum</i> .....	45
<b>Figura 4.</b> Animais infectados pela via oral apresentam carga parasitária detectáveis nas porções finais do intestino e aumento na produção de IFN- $\gamma$ no íleo.....	47
<b>Figura 5.</b> Taquizoítos de <i>N. caninum</i> estão presentes no íleo durante a infecção oral.....	48
<b>Figura 6.</b> Lesões hepáticas induzidas por <i>N. caninum</i> durante a infecção oral .....	51
<b>Figura 7.</b> Lesões pulmonares induzidas por <i>N. caninum</i> durante a infecção oral.....	52
<b>Figura 8.</b> Lesões cerebrais induzidas por <i>N. caninum</i> durante a fase crônica da infecção.....	53
<b>Figura 9.</b> Camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ são susceptíveis a infecção oral por <i>N. caninum</i> .....	55
<b>Figura 10.</b> Camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentam uma diminuição do quadro inflamatório após infecção oral por <i>N. caninum</i> .....	56
<b>Figura 11.</b> Apesar de controlar a produção de IL-12, MyD88 não é essencial para o controle da infecção oral por <i>N. caninum</i> .....	59
<b>Figura 12.</b> Animais WT e MyD88 $^{-/-}$ apresentam inflamação tecidual em órgãos abdominais e torácicos.....	60
<b>Figura 13.</b> Animais MyD88 $^{-/-}$ apresentam aumento da carga parasitária em tecidos hepáticos e pulmonares.....	61
<b>Figura 14.</b> Apesar da resistência a infecção, animais Caspase-1/11 $^{-/-}$ apresentam redução na produção de IFN- $\gamma$ durante a infecção oral por <i>N. caninum</i> .....	63
<b>Figura 15.</b> Animais Caspase-1/11 $^{-/-}$ apresentam inflamação tecidual sutil em órgãos abdominais e torácicos .....	64
<b>Figura 16.</b> Apesar da baixa produção de IFN- $\gamma$ , camundongos Caspase-1/11 $^{-/-}$ apresentam carga parasitária similar em tecidos hepáticos e pulmonares.....	65

# *Sumário*

---

---

## SUMÁRIO

RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Parasito .....	17
1.2. Hospedeiros .....	17
1.3. Ciclo de vida e vias de transmissão .....	18
1.4. Patogênese e Patologia .....	21
1.5. Epidemiologia.....	22
1.6. Resposta imune.....	24
1.6.1. Resposta imune celular .....	24
1.6.2. Resposta imune humoral.....	27
1.7. Modelos animais de infecção .....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo geral .....	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1. Animais.....	36
4.2. Cultivo de células HeLa e parasitos <i>N. caninum</i> .....	36
4.3. Preparação de Antígeno solúvel de <i>N. caninum</i> .....	37
4.4. Layout Experimental .....	37
4.5. Ensaio imunoenzimáticos (ELISA) para a quantificação de níveis de anticorpos específicos .....	38
4.6. Homogenato de órgãos .....	39
4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de citocinas .....	39
4.8. Análise histopatológica para determinação de inflamação tecidual <i>in vivo</i> .....	40
4.9. Avaliação da presença de parasitos em cortes congelados.....	40
4.10. Determinação da carga parasitária.....	41
4.11. Determinação de transaminases.....	41
4.12. Análise estatística .....	42
4.13. Normas de Biossegurança .....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Infecção oral por <i>N. caninum</i> induz resposta imune de padrão Th1 .....	44
5.2. <i>N. caninum</i> é capaz de infectar e evadir a resposta imune na mucosa intestinal.....	46

5.3. <i>N. caninum</i> dissemina-se para demais tecidos a partir da mucosa intestinal, induzindo respostas inflamatórias .....	49
5.4. IFN- $\gamma$ é crucial para o controle da infecção oral por <i>N. caninum</i> .....	54
5.5. Participação das vias de reconhecimento inato na indução de IFN- $\gamma$ durante a infecção oral por <i>N. caninum</i> .....	57
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÃO .....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
9. ANEXO.....	95

## RESUMO

*Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório com distribuição mundial, gerando abortamentos em bovinos e perdas bilionárias anuais na área da produção animal. Pesquisas sobre a resposta imune contra esta infecção adotam geralmente modelos murinos através da infecção parenteral. Entretanto, compreender os mecanismos imunológicos após a infecção oral é essencial, uma vez que mimetiza a infecção natural com maior precisão. A resposta imune contra protozoários intracelulares é baseada em respostas imunes de padrão Th1, reguladas através da produção de IFN- $\gamma$ . Assim, neste trabalho, objetivou-se avaliar a resposta imune desencadeada pela infecção oral por *N. caninum* em camundongos, com especial atenção na produção de IFN- $\gamma$  através de vias inatas TLR-MyD88 e Inflamassoma. Para estes experimentos, foram utilizados camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos pela via oral, após o bloqueio do pH estomacal. Os camundongos foram analisados quanto à sobrevivência, lesões teciduais, produção de citocinas e produção de anticorpos específicos. Observamos que camundongos WT infectados via oral apresentaram níveis crescentes de IgG sérica específica, composta principalmente por anticorpos IgG2. DNA de parasitos foi detectado principalmente no jejuno distal e no íleo dos camundongos, embora nenhuma alteração histológica tenha sido detectada em todo o intestino. No entanto, lesões inflamatórias agudas foram observadas nos fígados e pulmões de camundongos infectados por via oral, associados à presença, in situ, de DNA de parasitos e produção de IFN- $\gamma$ . A fim de analisar o papel dessa citocina chave, nós infectamos camundongos geneticamente deficientes em IFN- $\gamma$  com taquizoítos de *N. caninum* utilizando a mesma via. Observamos que camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  apresentaram pouco ou nenhum sinal de morbidade durante os primeiros dias de infecção. No entanto, a partir do sexto dia, camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  sucumbiram rapidamente à infecção, sem sinais de lesão inflamatória nos tecidos analisados. Com tal confirmação, nós investigamos a via responsável pela produção da citocina IFN- $\gamma$  durante a infecção oral, utilizando camundongos deficientes em MyD88 e Caspase-1/11 infectados com *N. caninum*. Foi observado neste experimento uma redução significativa da produção de IFN- $\gamma$  em camundongos Caspase-1/11 $^{-/-}$ , enquanto camundongos deficientes em MyD88 não apresentaram alterações nos níveis desta citocina. Tal resultado foi corroborado pela análise histológica dos tecidos, com redução da lesão de tecidos pulmonares e hepáticos em camundongos Caspase-1/11 $^{-/-}$ , de modo semelhante ao anteriormente observado na ausência de IFN- $\gamma$ . Em conclusão os resultados aqui

apresentados demonstram a rápida passagem do protozoário *N. caninum* pelo intestino delgado de camundongos, lesionando órgãos abdominais e torácicos por meio de processos replicativos e inflamatórios mediados por IFN- $\gamma$ , induzido pela ativação do complexo Inflamassoma. Por meio dos conhecimentos gerados, abre-se a possibilidade de melhor controle da patogenia induzida pela infecção por *N. caninum*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, MyD88, Inflamassoma, IFN- $\gamma$

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is an obligate intracellular parasite with worldwide distribution that causes abortions in cattle and billionnaire losses in livestock. The investigation of immune response against this infection usually adopts parenteral infection in murine models. However, it is essential to understand the immune mechanisms after oral infection which accurately mimics natural condition. Th1 adaptive immune response is crucial to protect against this intracellular protozoan, which is mainly regulated by IFN- $\gamma$  production. Thus, in this work, we aimed to evaluate the immune response triggered by *N. caninum* oral infection in mice, focusing in the IFN- $\gamma$  production induced by innate pathway TLR-MyD88 and inflammasome. For this purpose, we used C57BL/6 mice orally infected with tachyzoites after neutralization of the gastric pH. We analyzed the survival, tissue lesions, cytokine production, and specific antibody production in infected mice. We observed that WT mice infected by oral route presented higher levels of serum specific IgG, composed mainly by IgG2 antibodies. DNA of the parasite was detected mainly in the distal jejunum and ileum, however, no histological alterations were detected through the gut. Meanwhile, acute inflammatory lesions were observed in livers and lungs of orally infected mice, related with the presence, in situ, of parasite DNA and IFN- $\gamma$  production. In order to analyze the role of these key cytokine, we infected IFN- $\gamma$  genetically deficient mice with *N. caninum* tachyzoites by gavage. We observed that IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice presented reduced signs of morbidity during the beginning of infection. However, after six days of infection, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice succumbed quickly to the infection, with no signs of inflammatory lesions in analyzed tissues. After these results, we investigated the pathway responsible for IFN- $\gamma$  production during oral infection using MyD88<sup>-/-</sup> and Caspase-1/11<sup>-/-</sup> mice infected with *N. caninum*. A significant reduction in the IFN- $\gamma$  production in Caspase-1/11<sup>-/-</sup> mice was observed in this experiment, whereas MyD88 deficient mice did not present alterations in the levels of this cytokine. These findings are supported by histological analyses that demonstrated a reduction of lung and liver tissue lesions in Caspase-1/11<sup>-/-</sup> mice, similar to the result previously observed in the absence of IFN- $\gamma$ . In conclusion, this work demonstrated the quick passage of the *N. caninum* protozoa into the small intestine of mice, and then injuring abdominal and thoracic organs through replicative and inflammatory processes mediated by IFN- $\gamma$ . Also, this cytokine is induced by the activation of the inflammasome complex. Overall, we can get the possibility to enhance the control of pathogenicity induced by *N. caninum* infection.

**Keywords:** *Neospora caninum*, MyD88, Inflamassome, IFN- $\gamma$



# *Introdução*

---

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Parasito**

A neosporose é uma doença infecciosa inicialmente descrita por causar distúrbios neurológicos em cães, sendo o agente etiológico o parasito *Neospora caninum*, caracterizado por ser um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Foi reconhecido em 1984 na Noruega infectando cães domésticos apresentando lesões no sistema nervoso central (SNC) e músculos esqueléticos bem como paralisia dos membros posteriores, porém não apresentaram anticorpos reagentes contra *Toxoplasma gondii* (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984; BJERKAS; DUBEY, 1991).

*N. caninum* foi formalmente descrito por Dubey e colaboradores em 1988, quando estes pesquisadores encontraram o parasito em seções histológicas de dez cães nos Estados Unidos (EUA), onde foram observadas estruturas morfológicas distintas das encontradas em *T. gondii* (DUBEY et al., 1988a). Em conjunto, reatividade sorológica, testes imunohistoquímicos negativos para *T. gondii*, diferenças em sinais clínicos, presença de cistos teciduais com paredes mais espessas que as encontradas em *T. gondii* serviram para diferenciar ambos os parasitos (DUBEY et al., 1988a; DUBEY et al., 1988b; BJERKAS; DUBEY, 1991).

### **1.2. Hospedeiros**

Em 1989, a partir do desenvolvimento de testes de diagnósticos foi possível detectar a presença do parasito *N. caninum* em uma grande diversidade de animais de sangue quente (LINDSAY; DUBEY, 1989; DUBEY; SCHARES, 2011; ALMERIA, 2013), todavia, o número de hospedeiros são mais restritos quando comparados com *T. gondii*. Cães, vacas, carneiros, cabras, cavalos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, veados, alpacas, camelos e aves têm sido identificados como hospedeiros naturais, a partir do isolamento parasitário em tecidos bem como a detecção de anticorpos específicos por ensaios sorológicos (DUBEY, 2003; GONDIM, 2006; COSTA et al., 2008; MINEO et al., 2011; DE BARROS et al., 2018). Além disso infecções experimentais foram realizadas com êxito em bovinos, carneiros, cabras, porcos, cães, gatos, camundongos, macacos e pombos (DUBEY et al., 2002; MINEO et al., 2009b), sendo demonstrados como possíveis hospedeiros.

Evidências sorológicas de exposição ao parasito foram demonstradas em diferentes populações humanas (LOBATO et al., 2006; MCCANN et al., 2008; BENETTI et al., 2009; OSHIRO et al., 2015), levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico. Contudo, esta questão gera dúvidas devido ao fato de não haver relatos comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos (PETERSEN et al., 1999).

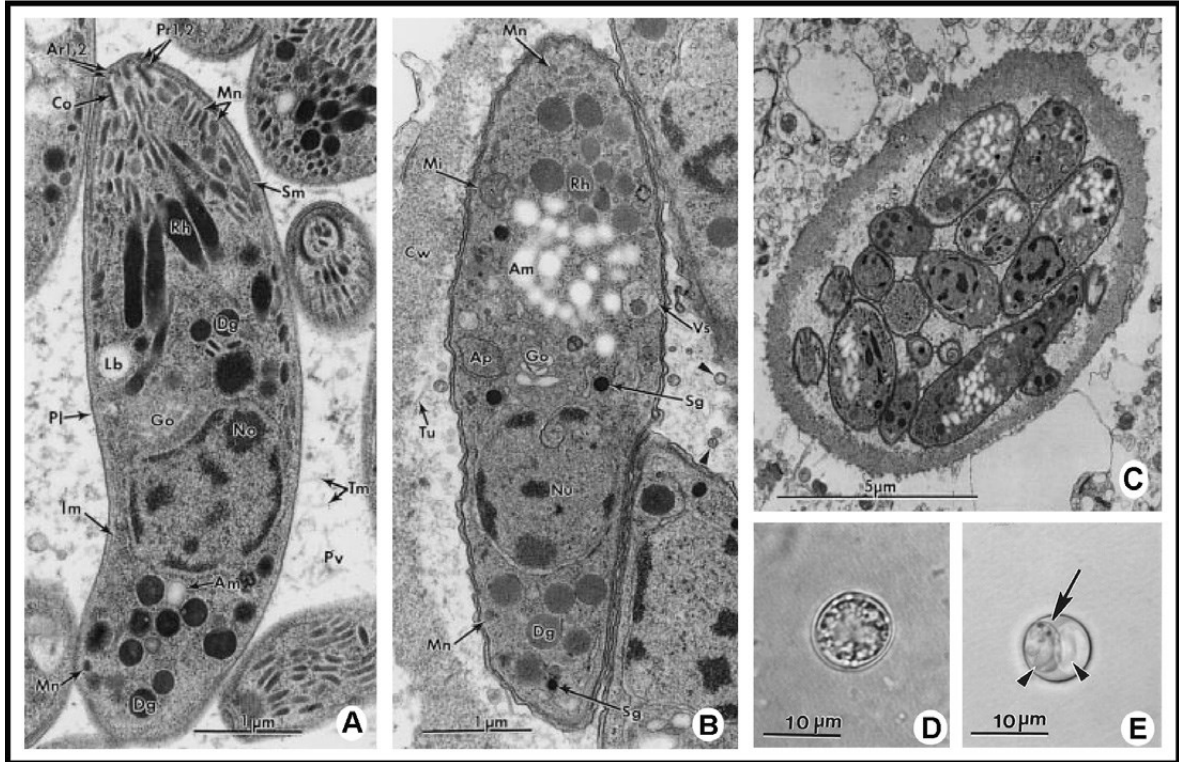
Os relatos iniciais da neosporose demonstraram que cães domésticos são hospedeiros definitivos do parasito devido à reprodução sexuada que ocorre em seu intestino (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). No entanto, estudos posteriores demonstraram que coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), lobo cinzento (*Canis lupus dingo*) (DUBEY et al., 2011) e cães selvagens australianos- dingo (KING et al., 2010) podem ser considerados hospedeiros definitivos de *N. caninum*, apontando a possibilidade de outros canídeos exercerem o papel de hospedeiro definitivos.

### 1.3. Ciclo de vida e vias de transmissão

*N. caninum* é caracterizado por apresentar ciclo de vida heteroxênico, onde o parasito alterna seu ciclo biológico entre hospedeiros definitivos e intermediários, nos quais ocorre o ciclo vital sexuada e assexuada, respectivamente. A fase sexuada ocorre apenas em espécies de canídeos como cachorros, coiotes, lobos, já o ciclo assexuada ocorre tanto em canídeos como em outros mamíferos, além de espécies de aves (THILSTED; DUBEY, 1989; GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2011). O ciclo parasitário é composto por três estágios infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos no interior de oocistos (Figura 1).

A fase assexuada da transmissão horizontal inicia-se a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos não esporulados liberados nas fezes de canídeos pelos hospedeiros intermediários, de forma que os esporozoítos são liberados no intestino dos hospedeiros e infectam células epiteliais transformando-se em taquizoítos (MCALLISTER et al., 1998; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Os taquizoítos são a forma proliferativa de *N. caninum*, sendo responsáveis pela manifestação clínica da doença conhecida como fase aguda, capazes de invadir e replicar em diferentes tipos de células como macrófagos, células neurais, fibroblastos, células musculares e hepatócitos (BARR et al., 1993; DUBEY et al., 2002). A invasão de células hospedeiras e a modulação da resposta imune por estes parasitos são eventos cruciais para a sobrevivência e replicação dos mesmos, envolvendo antígenos de superfície dos parasitos e liberação coordenada de proteínas

presentes em organelas secretórias parasitárias como roptrias, micronemas e grânulos densos, envolvidas no processo de fixação, penetração e formação do vacúolo parasitóforo (VP) (CARRUTHERS; BLACKMAN, 2005; SHARMA; CHITNIS, 2013; BOUCHER; BOSCH, 2015; LI et al., 2015).



**Figura 1: Formas evolutivas de *N. caninum*.** (A) Taquizoíto, (B) bradizoíto, (C) cistos teciduais, (D) oocistos não-esporulado, e (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (cabeça da seta). Fonte: (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013)

Inicialmente a adesão entre parasitos e células hospedeiras é mediada por antígenos de superfícies (SAGs), seguido pela ação de micronemas que liberam adesinas que são importantes para o ataque parasitário à membrana plasmática do hospedeiro, acompanhado pela clivagem proteolítica de proteínas de micronemas por proteases (CARRUTHERS; BLACKMAN, 2005; BINDER; LAGAL; KIM, 2008). Em seguida, proteínas de roptrias são liberadas na interface celular parasito-hospedeiro, formando junção entre a membrana plasmática do parasito invasor e da célula do hospedeiro (BRADLEY; SIBLEY, 2007). Após a fusão, ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo (VP). Por fim, estes parasitos modificam o ambiente no VP por secreção de proteínas de grânulos densos, oferecendo um ambiente propício para a replicação parasitária por endodiogenia, processo de desenvolvimento assexuado (HEMPHILL et al., 1998; VONLAUFEN et al., 2004). Como

forma de adaptação a pressão fisiológica e a resposta imune do hospedeiro, *N. caninum* consegue realizar conversão da forma taquizoíta para bradizoíta (EASTICK; ELSHEIKHA, 2010; SOUZA et al., 2010).

Bradizoítos formam cistos teciduais, possuem replicação assexuada lenta, caracterizando formas de latência do parasito que podem persistir por toda vida em um hospedeiro sem causar qualquer sinal clínico, podendo ser mais comumente encontrados em tecidos nervosos e musculares (DUBEY; LINDSAY, 1990). A fase sexuada se inicia após a ingestão de cistos presentes em tecidos de presas por canídeos, que sobrevivem a passagem pelo estômago. Os bradizoítos, presentes em cistos, são liberados invadindo células epiteliais do intestino e após várias modificações formam oocistos não esporulados, eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo e disseminados no ambiente. Estes oocistos são caracterizados por apresentarem parede externa robusta tornando-os resistentes a temperaturas ambientais extremas, sobrevivendo por longos períodos, e quando em condições favoráveis de oxigenação, temperatura e umidade se tornam esporulados e infectantes. Quando estes oocistos esporulam e são ingeridos pelo hospedeiro intermediário acabam liberando esporozoítos no intestino do hospedeiro transformando-se em taquizoítos (INNES, 2007).

A transmissão vertical ocorre por infecção transplacentária de alta eficiência entre mãe e feto (HIETALA; THURMOND, 1999; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Em bovinos essa via de transmissão tem sido considerada a mais importante envolvendo o parasito em estudo (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014). Este tipo de transmissão pode ser dividido em duas diferentes vias, designadas transmissão transplacentária exógena ou endógena. A transmissão exógena ocorre quando vacas prenhas adquirem a infecção após a ingestão de alimentos contaminados com oocistos, infectando subsequentemente tecidos fetais. A transmissão endógena ocorre devido a recrudescência pela reativação e reconversão de bradizoítos em taquizoítos durante a prenhez e subsequente infecção fetal (Figura 2) (TREES; WILLIAMS, 2005). Outras formas de infecção como lactogênica e venérea têm sido relatadas, contudo maiores investigações relacionadas a essas rotas de infecção devem ser realizadas (MASUDA et al., 2007; MOSKWA et al., 2007).

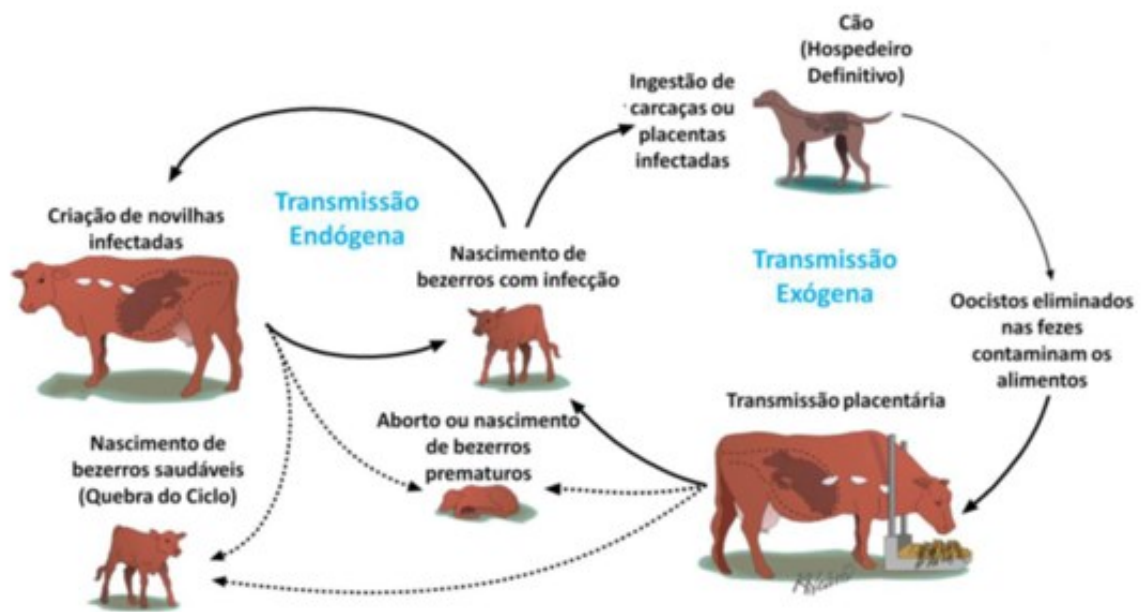


Figura 2: Ciclo Biológico de *N. caninum* (adaptado de McAllister 2016)

#### 1.4. Patogênese e Patologia

A patogênese da neosporose está associada com a invasão e a rápida multiplicação intracelular de taquizoítos de *N. caninum*, sendo disseminados pela corrente sanguínea e sistema linfático, causando inflamação tecidual (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Apesar da ampla variedade de espécies acometidas por *N. caninum*, bovinos e cães são os hospedeiros que apresentam sinais clínicos mais expressivos.

Uma das consequências clínicas mais importantes que ocorrem na infecção por *N. caninum* são os danos causados no sistema nervoso central (SNC) onde este parasito encontra-se encistado, sendo o cérebro o órgão mais comumente afetado (DUBEY, 2004; ELSHEIKHA et al., 2013). Em cães e coiotes, hospedeiros definitivos (GONDIM et al., 2004), a infecção por *N. caninum* pode causar poliradiculoneurite, encefalite, polimiosite e paralisias, sendo a paralisia dos membros posteriores o sinal mais consistente da neosporose neonatal (MINEO et al., 2001; DUBEY; SCHARES, 2011). Pesquisas mostrando a manifestação de sinais clínicos como paresia de membro posterior em ninhadas e infecções em cães jovens sugerem a ocorrência de infecção congênita em canídeos (DUBEY et al., 1988b).

Em bovinos adultos, desordens neurológicas não são identificados nos casos de neosporose, contudo a perda de peso tem sido evidenciada em bovinos de cortes, adicionalmente, bezerros filhos de vacas infectadas podem apresentar alterações neurológicas congênitas (BARLING et al., 2000a), e quando clinicamente normais tem grandes chances de serem portadores da neosporose (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Bovinos podem ser infectados através da ingestão oral de oocistos contendo esporozoítos, denominada transmissão horizontal, ou principalmente pela via transplacentária como um resultado da infecção por oocistos ou por recrudescência da infecção crônica em vacas durante prenhes. Os efeitos prejudiciais da neosporose podem se manter presentes por meses ou anos em um rebanho (BASSO et al., 2010).

Infecções por *N. caninum* são graves o suficiente para levar o feto ao abortamento em bovinos. Além disso, há evidências de que a infecção pelo parasito desencadeie a liberação de citocinas pró-inflamatórias e uma resposta do tipo Th1 na interface materno-fetal, que pode ser prejudicial para gestação. Além de abortamentos, a infecção em vacas prenhes pode induzir danos ao feto, ao útero, nascimento de bezerros natimortos, bezerros recém-nascidos com sinais clínicos ou bezerros saudáveis, mas cronicamente infectados (MINEO et al., 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011; MCALLISTER, 2016; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). Apesar de existir outras infecções que acometem bovinos e causam abortos, *N. caninum* é considerado o parasito mais comum em casos de abortamentos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

## 1.5. Epidemiologia

O filo Apicomplexa é um grupo composto por uma ampla variedade de protozoários intracelulares de extrema importância na medicina humana e veterinária (COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012). *N. caninum* se destaca dentro deste grupo por infectar diferentes espécies de animais de sangue quente em diferentes regiões do mundo (REICHEL et al., 2014).

Casos de neosporose são mais expressivos em bovinos, onde foi descrito pela primeira vez como causador de abortos nestes animais em 1989 no México (THILSTED; DUBEY, 1989), levando a grandes impactos econômicas na indústria de carne e leiteira, com perda de bilhões de dólares anualmente em todo o mundo (ALMERIA, 2013; REICHEL et al., 2013). As perdas econômicas estão intimamente ligadas a problemas reprodutivos

(animais natimortos, abortos, morte fetal e reabsorção), retorno de cio, aumento do intervalo entre partos, o que leva diretamente a perdas na produção de leite (TREES et al., 1999).

Cães domésticos são descritos como potenciais transmissores da neosporose em bovinos, contudo estudos demonstraram a ausência da infecção nestes animais em áreas rurais, o que sugere que canídeos selvagens atuam como hospedeiro definitivo disseminando a infecção (GONDIM et al., 2004; ALMERIA, 2013). Desta forma a presença de raposas, coiotes e outros canídeos selvagens em áreas de pastagens são um fator de risco para a transmissão de *N. caninum* para bovinos de corte e leiteiros (BARLING et al., 2000b).

Presume-se que *N. caninum* possa ser encontrado em todos as regiões do mundo onde exista a criação de gado, no entanto, sua prevalência difere entre os países e entre gado de corte e leiteiro (DUBEY; SCHARES, 2011; HORCAJO et al., 2016). Esta diferença na prevalência pode variar devido as distintas técnicas de diagnósticos utilizadas para a detecção de anticorpos no soro destes animais. *N. caninum* é considerado o parasito transmitido transplacentariamente com maior eficiência em bovinos, a partir de infecções prévias com oocistos ou reativação da infecção (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Estudos indicam que a taxa de transmissão por essa via varia entre 37,1 % e 44,4% (BERGERON et al., 2000; MORE et al., 2009).

Levantamentos realizados em 2013 demonstraram que as perdas econômicas no Brasil chegam a 100 milhões de dólares anualmente com a soroprevalência da neosporose variando entre 2,5 e 14,9% em bovinos de corte e de 14,1 a 34,8% para bovinos de leite (REICHEL et al., 2013). A distribuição da prevalência varia em diferentes regiões brasileiras, onde estudos mostram uma alta positividade no estado de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CORBELLINI et al., 2006; GUEDES et al., 2008; BRUHN et al., 2013; MACEDO et al., 2017). A presença de anticorpos específicos contra *N. caninum* também foram relatadas como altas em búfalos e ovinos (GENNARI et al., 2005; FILHO et al., 2017). Pesquisadores demonstraram que em cães errantes e de áreas rurais a prevalência da neosporose é maior do que em cães da área urbana (MINEO et al., 2004; DA CUNHA FILHO et al., 2008; SICUPIRA et al., 2012). Tal fato pode estar associado a proximidade destes animais com áreas de criação de gado, onde muitas vezes tem-se a exposição de restos de anexos placentários, carcaças e fetos abortados que podem estar contaminados (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).



## 1.6. Resposta imune

### 1.6.1. Resposta imune celular

A infecção por *N. caninum* é controlada tanto pela resposta imune inata quanto pela adaptativa. Embora a resposta imune humoral participe diretamente na neutralização de taquizoítos extracelulares, auxiliando no controle da disseminação da infecção, há poucos relatos sobre a participação desse tipo de resposta, havendo maiores informações sobre a resposta imune celular contra *N. caninum* (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016; MIRANDA et al., 2019).

Após a infecção, a resposta imune inata é ativada a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), presentes em células inatas que acabam por desencadear respostas pró-inflamatórias (HOU et al., 2011; THAISS et al., 2016; MANSILLA; CAPOZZO, 2017). Receptores do tipo Toll são os PRRs mais bem caracterizados sendo localizados na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 E TLR6) ou no endossoma (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) (DE NARDO, 2015; VIJAY, 2018). Estes receptores desempenham importante papel na ativação do sistema imune inato durante a infecção por *N. caninum*, através de moléculas adaptadoras, principalmente MyD88 (Fator de diferenciação mieloide 88), exceto TLR3 (MINEO et al., 2009a; MINEO et al., 2010). A partir da sinalização dependente de MyD88, tem-se a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, responsáveis por gerar mediadores pró-inflamatórios clássicos da resposta imune como IL-12 e IFN- $\gamma$ , essenciais no controle da infecção por *N. caninum* (MINEO et al., 2009a). A relação TLR e MyD88 já foi evidenciada em estudos em que camundongos geneticamente deficientes para TLR2 e infectados por *N. caninum* apresentam deficiência na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  o que levou ao aumento da mortalidade nestes animais (MINEO et al., 2010).

A molécula indutora de interferon- $\beta$  com domínio TIR (TRIF), que ativa fatores regulatórios de interferon (IRFs), culminando na produção de interferon do tipo 1 (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), também são ativadas a partir de TLRs, mais especificamente TLR3, (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019). As citocinas produzidas a partir da via de sinalização dependentes da molécula adaptadora TRIF também tem sido descrita como importantes para

estimular a resposta imune do hospedeiro contra *N. caninum* e inibir a replicação parasitária (MIRANDA et al., 2019).

Recentemente receptores semelhantes a NOD (NLRs) localizados no citoplasma surgiram como importantes componentes da resposta imune inata contra *N. caninum*. A via ativada pelo receptor NOD-2 por exemplo, atua no controle parasitário inicial em infecções por *N. caninum*, contudo exacerba a resposta inflamatória o que contribui para gerar patogênese grave e morte do hospedeiro (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). Adicionalmente, pesquisadores tem mostrado em seus estudos a importância de outros receptores citosólicos imunes inatos como os NLRP1 e NLRP3 em infecção por parasitos intracelulares (EWALD; CHAVARRIA-SMITH; BOOTHROYD, 2014; GORFU et al., 2014). Esses sensores fazem parte da via do inflamassoma, que é considerado um complexo multimérico de proteínas compostos por três componentes principais como a caspase inflamatória, molécula adaptadora (ASC) e um sensor o qual determina a especificidade do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, NLRP12, NAIP1, NAIP2, NAIP5 ou AIM2). Esse complexo é montado a partir da detecção de produtos microbianos ou sinais de estresse, facilitando a restrição da replicação microbiana a partir da indução de respostas inflamatórias com presença de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). Estudos mostram que o inflamassoma é crucial para o reconhecimento de *Leishmania* spp e ativação do sistema imune inato (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Experimentos utilizando camundongos infectados pela via intraperitoneal com *N. caninum* demonstraram que o inflamassoma NLRP3 é importante na resposta imune do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, limitando o crescimento parasitário a partir da clivagem de IL-1 $\beta$  e IL-18 culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  (WANG et al., 2018).

Além de ser a primeira linha de defesa contra o parasito *N. caninum* desempenhando um importante papel no controle inicial da infecção, a resposta imune inata é responsável também por induzir a imunidade adaptativa, restringindo a proliferação parasitária e levando a resistência à infecção. Durante a fase aguda da infecção ocorre a produção de interleucina IL-12 secretada por células dendríticas e macrófagos, responsável pela diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> para a subpopulação Th1, importante em infecções intracelulares. Além disso, tal citocina estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos T, sendo assim um mecanismo de grande importância para a sobrevivência do hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013; MONNEY; HEMPHILL, 2014; ALMERIA; SERRANO-PEREZ; LOPEZ-

GATIUS, 2017; NISHIKAWA, 2017). Células TCD8<sup>+</sup> também são ativadas pela secreção de IL-12 e contribuem significativamente para controlar a infecção aguda, uma vez que produzem IFN- $\gamma$ , levando à ativação de macrófagos (CORREIA et al., 2015). Estudos demonstram que na ausência de IFN- $\gamma$  durante a infecção aguda por *N. caninum*, camundongos apresentam maior susceptibilidade (NISHIKAWA et al., 2001), demonstrando o papel essencial desta citocina na infecção. O rápido recrutamento de macrófagos e células dendríticas para o sítio da infecção melhora potencialmente a resposta imune contra *N. caninum* (DION et al., 2011; ABE et al., 2014; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

A atuação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-6 entre outras, a partir de células do tipo Th2 também são importantes durante a resposta imune contra *N. caninum*. O balanço na produção de citocinas do tipo Th1/Th2 exerce papel crucial na resposta imune celular contra a infecção parasitária, levando à homeostasia. Alguns tipos celulares são importantes para sustentar este balanço Th1/Th2 como linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, células T $\gamma\delta$ , macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (NISHIKAWA et al., 2003). Células Treg também são essenciais para manter a homeostasia celular da resposta imune durante a infecção por *N. caninum* a partir da liberação de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (INNES, 2007; ALMERIA; SERRANO-PEREZ; LOPEZ-GATIUS, 2017). Desta forma pode se observar que para o controle efetivo da infecção por *N. caninum* deve haver um equilíbrio entre a indução da resposta Th1, Th2 e Treg (NISHIKAWA et al., 2003; AGUADO-MARTINEZ et al., 2017).

A resposta imune em bovinos infectados por *N. caninum* se assemelha a observada em modelos murinos, com o controle da proliferação parasitário através da produção de IFN- $\gamma$  (AGUADO-MARTINEZ et al., 2017). Em bovinos tem sido mostrado que citocinas são importantes na modulação da resposta imune na interface materno-fetal (ROSBOTTOM et al., 2007; ALMERIA et al., 2011; ROSBOTTOM et al., 2011; ALMERIA et al., 2016), na qual a resposta do tipo Th1 associada com a infecção pode afetar a gestação e culminar no aborto ou reabsorção fetal, enquanto que a resposta do tipo Th2 pode evitar a rejeição fetal através da produção de IL-4 e IL-10 (QUINN; MILLER; ELLIS, 2004; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014). Contudo, essa resposta na gestação das vacas não gera proteção contra a proliferação parasitária aumentando assim os riscos de transmissão entre mãe e feto (INNES, 2007).

### 1.6.2. Resposta imune humoral

Pesquisas demonstram que a resposta imune humoral também desempenha um papel importante frente à infecção por *N. caninum* (TEIXEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2007; ALMERIA; SERRANO-PEREZ; LOPEZ-GATIUS, 2017). Citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4, entre outras produzidas por células T auxiliares ativadas na presença de patógenos, estão intimamente ligadas com o processo de mudanças de isotipos de anticorpos por ativar células B (AGUADO-MARTINEZ et al., 2017). Anticorpos específicos podem limitar a proliferação de taquizoítos, por meio de neutralização, ativação do complemento e opsonização de parasitos (BARTLEY et al., 2013; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Estudos em bovinos demonstram que a presença de IFN- $\gamma$  (Th1) favorece a produção de anticorpos IgG2, enquanto que a interleucina-4 (Th2) regula a síntese de anticorpos IgG1 (ESTES; CLOSSER; ALLEN, 1994; ESTES et al., 1995). O mesmo perfil é encontrado em camundongos, onde animais infectados com *N. caninum* apresentam uma polarização da resposta Th1 durante a fase aguda com alta produção de IFN- $\gamma$  e IgG2 em relação a IL-4 e IgG1 respectivamente (TEIXEIRA et al., 2005; ROJO-MONTEJO et al., 2009). Pesquisas utilizando bezerros e bovinos revelam que após uma infecção primária ocorre a presença de anticorpos específicos IgM e IgG. Níveis de IgM específicas aparecem duas semanas após a infecção, tendo um declínio após quatro semanas. Já os níveis de IgG aumentam durante a primeira semana de infecção perdurando de três a seis meses pós-infecção primária (DE MAREZ et al., 1999; TREES; WILLIAMS, 2005; WILLIAMS et al., 2009).

Pesquisas utilizando bovinos infectados com *N. caninum* (isolado Nc-1) mostraram pico de sororeatividade por IgM, IgG, IgG1 e IgG2 a partir de sete dias pós infecção (p.i.). Contudo, os níveis de IgM apresentaram baixa reatividade durante todo o período de infecção e IgG e IgG1 foram encontrados com títulos médios decrescentes até 91 dias de infecção (FERRE et al., 2005).

Estudos utilizando imunizações com taquizoítos inativados pelo frio ou pelo calor em camundongos selvagens apresentam altos níveis de IgG2a demonstrando uma resposta imune do tipo Th1 nestes animais quando comparados com camundongos imunizados com outros tipos de antígenos (KLEVAR et al., 2007; STROHBUSCH et al., 2009; FENG; ZHANG; TUO, 2010; HEMPHILL et al., 2013). Rojo-Montejo e colaboradores (2011) mostraram em seus estudos com neosporose congênita e cerebral que camundongos

previamente imunizados apresentam uma alta resposta imune humoral com produção predominante de IgG1 e uma resposta imune celular dominante pela expressão de IFN- $\gamma$ , sugerindo que uma mistura de resposta Th1/Th2 pode ser benéfica para limitar a disseminação e gerar uma proteção contra a infecção congênita por *N. caninum*.

Outros trabalhos utilizando camundongos geneticamente deficientes em células B demonstraram a importância destas células durante a infecção por *N. caninum*, onde foi possível observar altas taxas de mortalidade pós-desafio nestes camundongos (AMMANN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Apesar do conhecimento sobre a participação de anticorpos no combate a vários patógenos, a participação destas imunoglobulinas deve ser melhor elucidada devido às lacunas funcionais ainda existentes no papel das mesmas durante infecções por *N. caninum*.

### **1.7. Modelos animais de infecção**

Para entender os parâmetros cruciais da resposta imune durante a infecção por *N. caninum*, infecções experimentais podem esclarecer vários pontos com relação a patologia, virulência e indução de imunidade. Diferentes modelos de infecção tem sido utilizados no campo da pesquisa, desempenhando um papel chave na avaliação da relação parasito/hospedeiro. Os bovinos considerados hospedeiros intermediários mais importantes por apresentarem grande interesse econômico na infecção por *N. caninum*, são utilizados em infecções experimentais com sucesso (MALEY et al., 2006), contudo o uso destes animais requer maiores habilidades devido ao alto custo, dificuldade no manejo e a necessidade de grandes instalações experimentais (DE MAREZ et al., 1999; HORCAJO et al., 2016). Em contrapartida, ovelhas representam um modelo experimental interessante por serem ruminantes, hospedeiros naturais e apresentarem sistema imunológico e anatomia placentária semelhante aos bovinos. Além disso, o uso destes animais apresentam vantagens em relação aos bovinos por dispender um espaço menor para a criação, facilidade de manuseio e um período gestacional mais curto que em vacas (MORENO et al., 2012; ARRANZ-SOLIS et al., 2015; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2018), porém as doses e a rota de infecção experimental nestes animais necessitam maiores padronizações o que dificulta a reprodutibilidade dos experimentos (HORCAJO et al., 2016).

A maioria dos estudos para investigar a relação parasito hospedeiro e abordagens terapêuticas contra a neosporose são realizados utilizando modelos murinos devido a

acessibilidade, fácil manipulação e baixo custo (HEMPHILL; AGUADO-MARTINEZ; MULLER, 2016), apesar de apresentarem diferenças fisiológicas e imunológicas, bem como susceptibilidade limitada com relação aos hospedeiros naturais. Além disso, os mecanismos da resposta imune também estão sendo elucidados a partir do uso de camundongos geneticamente modificados, o que facilita o entendimento da ação parasitária no hospedeiro (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016; DA SILVA et al., 2017). Estudos demonstram que camundongos representam um modelo viável para o estudo experimental de *N. caninum* (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006), por apresentar características clínicas similares as que ocorrem em hospedeiros infectados naturalmente, como encefalite, miosite (LINDSAY et al., 1995), perdas reprodutivas (LONG; BASZLER, 1996) e eficiente transmissão vertical (LIDDELL; JENKINS; DUBEY, 1999), mimetizando assim os efeitos da infecção experimental em bovinos (HORCAJO et al., 2016).

Embora, a ingestão de oocistos seja a forma de infecção natural dos hospedeiros intermediários, oocistos e cistos teciduais não são amplamente utilizados em infecções experimentais, devido as dificuldades de obtenção dessas formas evolutivas (MCALLISTER et al., 1998; AGUADO-MARTINEZ et al., 2017), enquanto taquizoítos, que é a forma proliferativa mais rápida do parasito, é facilmente obtida em cultura de células em quantidades elevadas. Apesar de haverem tentativas, o isolamento e obtenção de cistos teciduais do parasito em modelos experimentais como camundongos e gerbis é difícil, isso ocorre pelo baixo desenvolvimento de cistos teciduais nestes modelos (MCGUIRE et al., 1997; GONDIM et al., 2001). Desta forma, a inoculação parenteral de taquizoítos é o protocolo mais utilizado em modelos para investigar parâmetros do hospedeiro contra a infecção por *N. caninum*.

A infecção intragástrica com taquizoítos de *N. caninum* tem sido estabelecida com sucesso por diferentes grupos de pesquisadores em modelos murinos como camundongos imunodeficientes (C57BL / 10 ScCr e C5BL / 10 ScSn), animais do tipo selvagem (C57BL/6) e animais BALB/c (TEIXEIRA et al., 2007; FERREIRINHA et al., 2014; FERREIRINHA et al., 2016). Estes estudos mostraram a eficiente ativação da resposta imune durante a infecção, bem como a importância de células do linfonodo mesentérico e epitélio intestinal na produção de citocinas pró-inflamatórias importantes para o controle parasitário durante a infecção oral (CORREIA et al., 2013). Desta forma estudos utilizando modelos orais de infecção com taquizoítos de *N. caninum* se mostram interessantes para

mimetizar a via de infecção natural pelo trato gastrointestinal e entender a resposta imune desencadeada durante a neosporose.

# Justificativa



## 2. JUSTIFICATIVA

A neosporose é uma das doenças que leva a perdas econômicas grandiosas na área da bovinocultura. Assim, cada vez mais tem se procurado entender as funções imunes que influenciam o controle da infecção e o desenvolvimento da doença. Modelos murinos são amplamente utilizados para estudar a resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *N. caninum*. A via intraperitoneal é a mais comumente utilizada para estabelecimento da infecção nas pesquisas científicas. Contudo, estudos que se assemelham a via natural de infecção tornam-se relevantes para esclarecer as peculiaridades envolvidas nesse processo, bem como compreender os mecanismos fisiopatológicos durante a infecção oral por *N. caninum*. Sabe-se que a ativação da resposta imune inata é primordial para se estabelecer proteção inicial e ativar a resposta imune adaptativa do perfil Th1 durante a infecção por *N. caninum*. Proteínas adaptadoras como MyD88 são as mais importantes na transdução de sinal via TLRs, culminando na produção de IFN- $\gamma$ , citocina chave para o controle da replicação parasitária (MINEO et al., 2009a; MINEO et al., 2010). Recentemente complexos denominados Inflamassoma tem-se destacado por desempenhar um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra protozoários intracelulares (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015; STEWART; COOKSON, 2016) . Pesquisadores tem investigado a participação da via do inflamassoma na infecção por *N. caninum*, principalmente na produção de citocinas pró-inflamatórias importantes no controle da replicação parasitária (WANG et al., 2017; WANG et al., 2018). Como já foi observado à importância da imunidade inata através da via intraperitoneal, pesquisas relacionadas com a ativação de vias da resposta imune inata durante a infecção oral tornam-se relevantes e podem contribuir para o desenvolvimento profilático e terapêutico da neosporose, a fim de prevenir a propagação da infecção.

# Objetivos

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Analisar a relevância de fatores imunes cruciais para o controle da infecção pelo protozoário *N. caninum*, mimetizando a via natural da infecção por meio da aplicação de modelo de infecção oral em camundongos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Investigar a eficácia do modelo de infecção oral por *N. caninum* através da análise cinética de parâmetros histológicos e imunológicos;
- Analisar o padrão de migração e carga parasitária em diferentes órgãos dos camundongos infectados em cinética durante modelo de infecção oral pelo protozoário;
- Determinar a relevância da citocina IFN- $\gamma$  para a sobrevivência e indução de patogênese mediante a infecção oral por *N. caninum*;
- Determinar o papel das vias de reconhecimento inato mediadas por MyD88 e Caspase-1/11 no modelo de infecção oral por *N. caninum* induzido em camundongos.

# Material e Métodos

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes em IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ), MyD88 (MydD88 $^{-/-}$ ) e Caspase-1/11 (Caspase1/11 $^{-/-}$ ), com 6-8 semanas de idade, foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C) e alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob o protocolo de número 109/16 (ANEXO 1).

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

Células de epitélio uterino humano da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI 1640 (Life Technologies Corporatin, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), 100 U/mL penicilina (Gibco), 100  $\mu$ g/mL estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem confluência.

Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* isolado NcI e isolado NcLiv expressando constitutivamente a proteína fluorescente mCherry (NcLiv-mCherry), mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas para células, exceto pela adição de SFB ao meio. Após a lise celular, as suspensões parasitárias foram obtidas conforme descrito previamente (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). O sobrenadante contendo a suspensão parasitária foi coletado e centrifugado a 800  $\times$  g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sedimento foi ressuspendido em meio RPMI-1640, e os parasitos contados em câmara hemocitométrica (Neubauer) com o auxílio do corante Azul de Tripán 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) sendo utilizados logo em seguida para infecção de camundongos. Os parasitos restantes foram lavados duas vezes (800  $\times$  g durante 10 minutos a 4°C) com solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), e o sedimento final foi armazenado a -20°C para subsequente preparação de antígenos.

### 4.3. Preparação de antígeno solúvel de *N. caninum*

Antígenos solúvel de *N. caninum* (NLA) foram preparados de acordo com métodos já descritos (MOTA et al., 2016). Brevemente, suspensões parasitárias foram tratadas com coquetel de inibidores de protease (Complete Mini, Roche, Alemanha) e submetidas a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido de sonicação durante cinco minutos a 60Hz em banho de gelo. Posteriormente parasitos lisados foram submetidos à centrifugação ( $10.000 \times g$ , 30 min, 4°C). O sobrenadante resultante foi coletado e a concentração proteica quantificada utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (BRADFORD, 1976). Alíquotas de NLA foram armazenados a -20°C até sua utilização nos procedimentos de ELISA.

### 4.4. Desenho experimental

A infecção oral foi conduzida de acordo com protocolos previamente padronizados (TEIXEIRA et al., 2007). Resumidamente, o pH estomacal foi neutralizado com 100µL de solução de bicarbonato de sódio a 10% por gavagem antes da infecção. Após 15 minutos, os animais foram infectados com isolado Nc1 ou isolado NcLiv-mCherry ( $3 \times 10^7$  taquizoítos/animal) pela mesma via. De acordo com o objetivo de cada ensaio, os experimentos foram conduzidos como descrito abaixo.

Para investigar a eficácia do modelo oral, o padrão de migração do parasito *N. caninum* e a resposta imune desencadeada pela infecção, camundongos WT foram divididos em 5 grupos (5 camundongos / grupo): um grupo controle não infectado (0 dia) e quatro grupos infectados pela via oral com  $3 \times 10^7$  taquizoítos de Nc1 (7, 14, 21 e 28 dias de infecção). Após o tempo de infecção os animais foram anestesiados e sangrados via plexo retro orbital para obtenção de amostras de soros para posterior análise. Em seguida os animais foram sacrificados e segmentos do intestino delgado, tecidos hepáticos, pulmonares e cerebrais foram eutanaziados. A produção cinética de imunoglobulinas específicas foi avaliada em amostras sorológicas pelo método imunoenzimático ELISA indireto (IgGtotal, IgG1 e IgG2), enquanto a quantificação de citocinas em soros e homogenatos de fígado, pulmão e íleo foi realizado pelo método imunoenzimático ELISA de captura (IFN- $\gamma$  e IL-12p40). Segmentos intestinais, fígado, pulmão e cérebro foram submetidos a análise da carga

parasitária por PCR em tempo real e histológica. Adicionalmente, a produção de enzimas marcadoras de lesão hepática como aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) também foram avaliadas em soros. Para análise da localização parasitária, camundongos WT foram infectados com  $3 \times 10^7$  NcLiv-mCherry (parasito fluorescente) seguida pela coleta dos segmentos intestinais 1 e 7 dias p.i. com posterior análise através de técnicas de cortes em criostato com material congelado.

Para determinar a relevância da citocina IFN- $\gamma$  e as vias inatas importantes para a produção da mesma, camundongos WT, IFN- $\gamma^{-/-}$ , MyD88 $^{-/-}$  e Caspase-1/11 $^{-/-}$  infectados pela via oral com  $3 \times 10^7$  taquizoítos de Nc1 foram avaliados durante 30 dias para análise de mortalidade, enquanto amostras de soros de animais que sobreviveram foram submetidos ao ensaio de ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos para confirmação da infecção. Adicionalmente, grupos de camundongos WT, IFN- $\gamma^{-/-}$ , MyD88 $^{-/-}$  e Caspase-1/11 $^{-/-}$  foram infectados com a mesma dose que o grupo anterior e eutanasiados após 5 dias para análise de parâmetros imunológicos. Tecidos intestinais, hepáticos e pulmonares foram submetidos a análise histológica e quantificação da carga parasitária. Adicionalmente AST e ALT foram quantificadas em soros de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ , enquanto a quantificação de citocinas IL-12p40 e IFN- $\gamma$  foi realizada em animais MyD88 $^{-/-}$  e Caspase-1/11 $^{-/-}$ .

#### **4.5. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a quantificação de níveis de anticorpos específicos**

Os níveis séricos de IgG específicos de *N. caninum* e suas subclasses (IgG1 e IgG2) foram medidos por ELISA a partir de amostras advindas de animais infectados e controles, como descrito previamente (MINEO et al., 2010).

Microplacas de alta afinidade (Corning Laboratories Inc, New York, EUA) foram adsorvidas com antígenos de *N. caninum* na concentração 10  $\mu$ g/mL em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6), e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente sítios inespecíficos foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) acrescidos de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) para IgG total e 1% de albumina sérica bovina (BSA – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para IgG1 e IgG2. Amostras sorológicas foram diluídas (1:25) e incubadas a 37°C durante 1 hora para a detecção de IgG total e 2 horas para a detecção de IgG1 e IgG2. Anticorpos específicos anti-IgG de camundongos marcados com peroxidase (1: 1000; Sigma-Aldrich) e anti-IgG1

(1:4000) ou anti-IgG2 de (1: 2000) de camundongo marcado com biotina (Caltag Lab, EUA) foram incubados por 1h a 37°C. Para a detecção de IgG1 e IgG2, os poços foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (1:1000; Sigma-Aldrich) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Entre cada passo, as placas foram lavadas com PBS-T. A reação foi desenvolvida com ácido 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfônico (ABTS; KPL, EUA) e a densidade óptica (DO) determinada a 405 nm em um leitor de placas (SpectraMax M2e, Molecular Devices, EUA).

#### **4.6. Homogenato de órgãos**

Com a intenção de se quantificar a produção de citocinas, órgãos de animais WT previamente infectados foram coletados e processados. Em resumo, 100mg de amostras teciduais foram acrescidas de 500 µL de água ultrapura contendo inibidor de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça). As amostras foram trituradas com o auxílio de um homogeneizador com posterior centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até a utilização nos experimentos.

#### **4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de citocinas**

As concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 foram mensuradas em amostras de homogenatos de íleos, fígados e pulmões (100 mg de tecido) de camundongos WT, e amostras séricas de camundongos dos grupos WT, MyD88<sup>-/-</sup> e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> infectados ou não com taquizoítos de *N. caninum* pela via oral. A quantificação das citocinas foi realizada a partir de kits de ELISA comerciais, conduzidos de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA).

Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (Corning Laboratories Inc, New York, EUA) foram revestidas com anticorpos de capturas anti-camundongos específicos para IFN- $\gamma$  e IL-12p40 e incubadas overnight a 4°C. Posteriormente, para se bloquear os sítios inespecíficos, foi adicionado a placa 10% de soro fetal bovino em PBS 0,01M (pH7,2) por 1 hora. Após o bloqueio, curvas padrões das respectivas citocinas em diluições seriadas e amostras a serem testadas foram acrescidas as placas e incubadas por 2 horas. Para a quantificação da presença das citocinas nas amostras, anticorpos de detecção anti-citocinas murinas conjugadas com biotina e acrescidos de estreptavidina-peroxidase foram incubados



por 1 hora. Entre cada passo, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% (PBS-T). A reação foi desenvolvida com tetrametilbenzidina (TMB) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para interromper a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada a 450 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax M2e, Molecular Devices, EUA). A concentração das citocinas foi determinada a partir da curva padrão com concentrações conhecidas de citocinas, e os resultados foram expressos em pg/mL, de acordo com os limites de detecção para cada ensaio: IFN- $\gamma$  (4,1 pg/mL) e IL-12p40 (15,6 pg/mL).

#### **4.8. Análise histológica para determinação de inflamação tecidual *in vivo***

Amostras de segmentos de intestino delgado, fígados, pulmões e sistema nervoso central (SNC) de camundongos WT infectados e não infectados foram coletadas 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Além disso, fragmentos de intestino delgado, pulmões e fígados de animais WT, IFN<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> foram coletados 5 dias p.i. Os órgãos foram fixados em formalina tamponada a 10% à temperatura ambiente por 24 horas e armazenados em álcool 70% até o processo de inclusão em parafina. Após a inclusão, os órgãos parafinizados foram seccionados (5 $\mu$ m de espessura) e depositados em lâminas microscópicas, seguido pela desparafinização e hidratação para a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) sendo avaliadas alterações morfológicas teciduais. As seções foram fotografadas usando microscópio automatizado (FSX100, Olympus, Japão).

#### **4.9. Avaliação da presença de parasitos em cortes congelados**

Para a detecção de parasitos no intestino delgado, amostras teciduais de segmentos intestinais infectados com *N. caninum* fluorescentes (NcLiv-mCherry) foram coletadas e rapidamente colocados em solução criopreservadora para espécimes teciduais congelados (Tissue Tek O.C.T., Sakura). Esse material foi congelado com o auxílio de solução de acetona e nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. A seguir, o material foi cortado (5 $\mu$ m de espessura) com auxílio de um criostato e depositados em lâminas previamente recobertas com solução aderente de Poli-L-lisina, as quais foram contra coradas para marcação nuclear com ProLong Gold - 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, ThermoFisher). As detecção de fluorescência emitida pelo parasito foi visualizada a partir do microscópio de fluorescência invertido (EVOS, Thermo Scientific).

#### 4.10. Determinação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada no intestino delgado, fígado, pulmão e cérebro pela técnica de PCR em tempo real (qPCR-StepOne Plus, Applied Biosystems, EUA) através do sistema de detecção SYBR green (Promega, Madison, EUA) e normalizada com gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), como previamente descrito (Johnson e Widlanski, 2004). A reação foi realizada utilizando primers específicos para o gene Nc-5 de *N. caninum* (Forward: 3'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-5'; Reverse: 3'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA-5') e GAPDH (Forward: 3'-CTC GTC CCG TAG ACA AAA TGG-5'; Reverse: 3'-AAT CTC CAC TTT GCC ACT GCA-5').

Inicialmente, a extração de DNA foi realizada a partir de 50 mg de cada tecido analisado acrescido de 500 µL de tampão NLB (10mM Tris-HCl, 400nM NaCl e 2mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2), 16 µL de SDS 10% e 8 µL de Solução proteínase K (20mg/mL) e incubados a 50°C overnight. Após incubação, 150 µL de tampão NaCl 6M foi adicionado as amostras seguido pela incubação em gelo por 10 minutos e posterior centrifugação a 12000 × g durante 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado, transferido para outro tubo e acrescentou-se 800 µL de etanol absoluto. O DNA foi coletado e ressuspendido com 150-200 µL de água livre de nucleasse.

As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria (260nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e ajustadas para 40 ng/µL com água livre de DNase (água DEPC). A carga parasitária foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraído de taquizoítos de *N. caninum* que foram incluídos em cada análise. Os resultados foram expressos em pg de DNA do parasito/µg de DNA hospedeiro.

#### 4.11. Determinação de transaminases

A alanina transaminase (ALT/GPT) e aspartato transaminase (AST/GOT) foram medidas em amostras de soro de camundongos WT e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados ou não com taquizoítos de *N. caninum* pela via oral. Estes parâmetros foram realizados para análise das funções hepáticas, utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, Brasil).

#### **4.12. Análise estatística**

Gráficos e cálculos estatísticos foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de Two-way ANOVA utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni, Kruskal-Wallis utilizando o teste de comparação múltipla de Dunn e teste de Mann-Whitney, quando apropriado. A porcentagem de sobrevivência de camundongos foi estimada usando o método de Kaplan-Meier, seguido pela comparação das curvas de sobrevivência através do teste de log-rank - Mantel-Cox. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Valores para  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### **4.13. Normas de Biossegurança**

Os procedimentos realizados durante a execução experimental como coleta e manuseio de materiais biológicos, bem como manipulação de reagentes químicos foram realizados de acordo com normas de biosseguranças cabíveis (MINEO et al., 2005).

Os manejos e cuidados com o bem estar animal foram realizados de acordo com as recomendações contidas no guia para pesquisas biomédicas envolvendo animais do Conselho Internacional para Ciência Animal de Laboratório (ICLAS; International Council for Laboratory Animal Science), e assinado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) através das resoluções normativas publicadas (<https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>). A Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR/UFU) é credenciado pela CONCEA (CIAEP: 01.0105.2014) e Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio; CQB: 163/02)

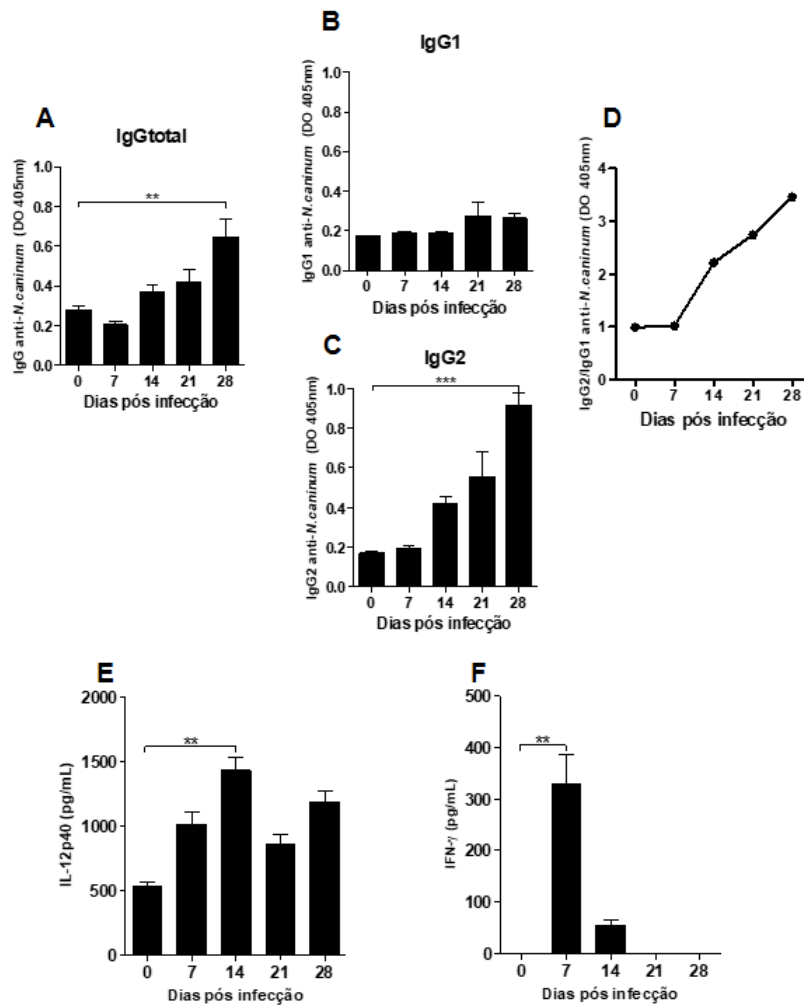
# Resultados

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Infecção oral por *N. caninum* induz resposta imune de padrão Th1

A resposta imune celular e humoral desencadeada pela infecção oral por *N. caninum* ainda não está bem elucidada, portanto, novas abordagens para compreender os mecanismos de ação do parasito nessa rota são relevantes para o campo da pesquisa. Nesse sentido, primeiramente avaliamos a cinética da produção de anticorpos IgG específicos e suas subclasses no soro dos animais infectados pela via oral. Camundongos infectados apresentaram um aumento na produção de anticorpos IgG específicos 28 dias p.i (Figura 3A), demonstrando o sucesso da infecção e a capacidade do parasito em induzir uma resposta imune humoral antígeno-específica. Adicionalmente, tais animais apresentaram produção de baixos níveis de anticorpos IgG1 específicos (Figura 3B), enquanto a produção de IgG2 foi significativamente elevada durante o curso da infecção (Figura 3C). Desta forma, observamos uma predominância de IgG2 sobre os anticorpos IgG1 na infecção oral (Figura 3D).

A fim de avaliar a importância da produção de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  na resposta imune durante a infecção oral por *N. caninum*, mensuramos os níveis séricos desta citocina em camundongos 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Observou-se que, após a infecção, os animais apresentaram aumento na concentração de IL-12p40 sérica durante a fase inicial da infecção, com um pico de produção no 14<sup>o</sup> dia p.i. (Figura 3E). Já os níveis de produção de IFN- $\gamma$  foram maiores no sétimo dia de infecção, com diminuição significativa nas amostras colhidas posteriormente (Figura 3F), indicando que há ativação das principais citocinas pró-inflamatórias para o controle da infecção por *N. caninum*.

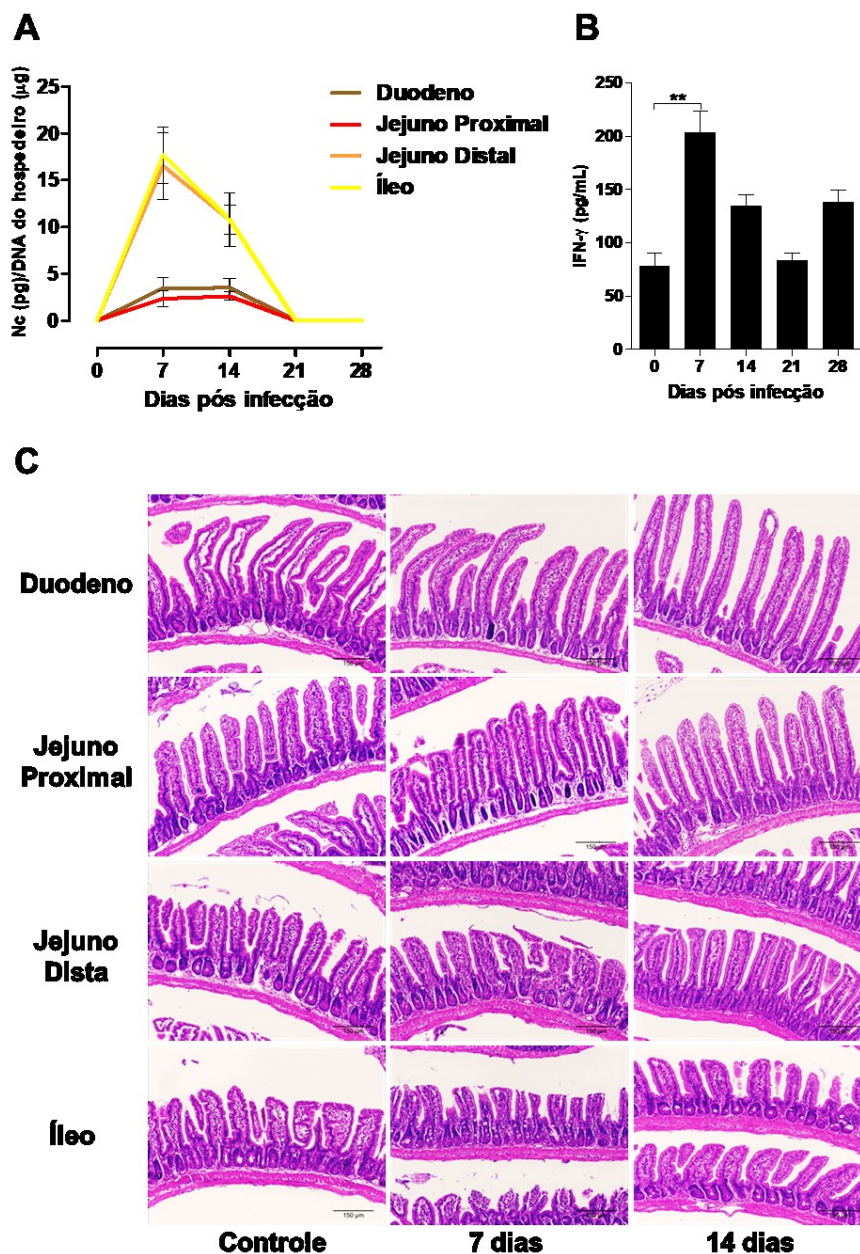


**Figura 3. Cinética da produção de anticorpos IgG e citocinas de padrão Th1 no soro de camundongos infectados pela via oral por *N. caninum*.** Amostras de soros de camundongos WT inoculados com *N. caninum* pela via oral 0, 7 14 21 e 28 dias p.i. foram analisadas. (A) IgG total; (B) IgG1; (C) IgG2; (D) razão IgG2a/IgG1. (E) Produção de IL-12p40 e (F) IFN- $\gamma$ . Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\* $P$ <0,05, \*\* $P$ <0,01, \*\*\* $P$ <0,001) entre os diferentes dias p.i. oral foram realizadas a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de múltipla comparação (Dunn's).

## 5.2. *N. caninum* é capaz de infectar e evadir a resposta imune na mucosa intestinal

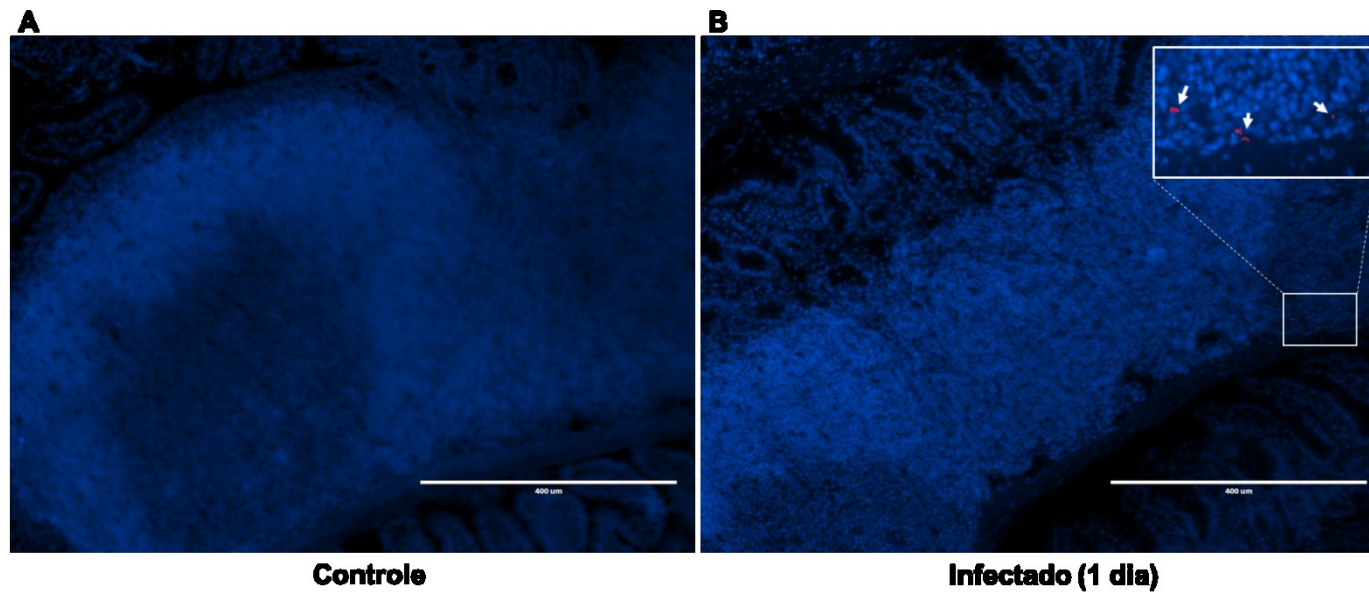
Considerando que a via oral é uma das mais frequentes formas de infecção primária por *N. caninum*, é importante que se elucide os mecanismos da relação parasito-hospedeiro no intestino durante o curso dessa infecção. Assim, o próximo passo foi avaliar a carga parasitária no intestino. Para tanto, a concentração de DNA genômico do parasito *N. caninum* foi avaliada em diferentes segmentos do intestino delgado 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. por qPCR. Os resultados revelaram que os segmentos caudais do intestino delgado, jejuno distal e íleo, apresentavam cargas parasitárias detectáveis nos 7º e 14º dia p.i., seguidos por ausência de detecção de DNA genômico parasitário após 21 dias p.i. (Figura 4A). Não foram encontradas quantidades significativas de DNA genômico nos segmentos iniciais do intestino (duodeno e jejuno proximal). Adicionalmente, a concentração de IFN- $\gamma$  em homogenato tecidual do íleo foi significativamente maior durante a fase aguda da infecção quando comparado com animais não infectados (Figura 4B). Além disso, a partir de análises histopatológicas não houve alteração tecidual nos segmentos analisados durante o curso da infecção (Figura 4C).

Levando em consideração a detecção de DNA parasitário no intestino bem como a ausência de danos teciduais, nosso próximo passo foi investigar a presença do parasito nos diferentes segmentos. A partir da infecção de animais WT com NcLiv-mCherry, foi possível observar a presença de *N. caninum* no íleo após 24 horas de infecção, mais precisamente na lâmina própria deste segmento (Figura 5). Contudo, parasitos Ncliv-mCherry não foram observados em segmentos intestinais no 7º dia p.i. (dados não mostrados), o que pode ser explicado pela ausência do aumento de tecidos linfoides associados a mucosa nos cortes analisados. Estes resultados demonstraram que durante a infecção oral por *N. caninum*, o parasito está localizado na mucosa intestinal, alojando-se preferencialmente em tecidos associados a mucosa, contudo não causa dano tecidual.



**Figura 4.** Animais infectados pela via oral apresentam carga parasitária detectáveis nas porções finais do intestino delgado e aumento na produção de IFN- $\gamma$  no íleo. Quantificação da carga parasitária intestinal por qPCR com 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. (A). Produção de IFN- $\gamma$  no homogenato do íleo com 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. (B). Representação histológica do intestino com 0, 7 e 14 dias p.i. pela coloração de H&E (C) barras representam 150µm. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas entre os diferentes dias p. i. oral foram realizadas a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de múltipla comparação (Dunn's).





**Figura 5. Taquizoítos de *N. caninum* estão presentes no íleo durante a infecção oral.** Animais WT foram infectados com  $3 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* NcLiv-mCherry pela via oral para análise em corte congelado da localização parasitária em tecidos intestinais. Setas brancas indicam taquizoítos de NcLiv-mCherry.

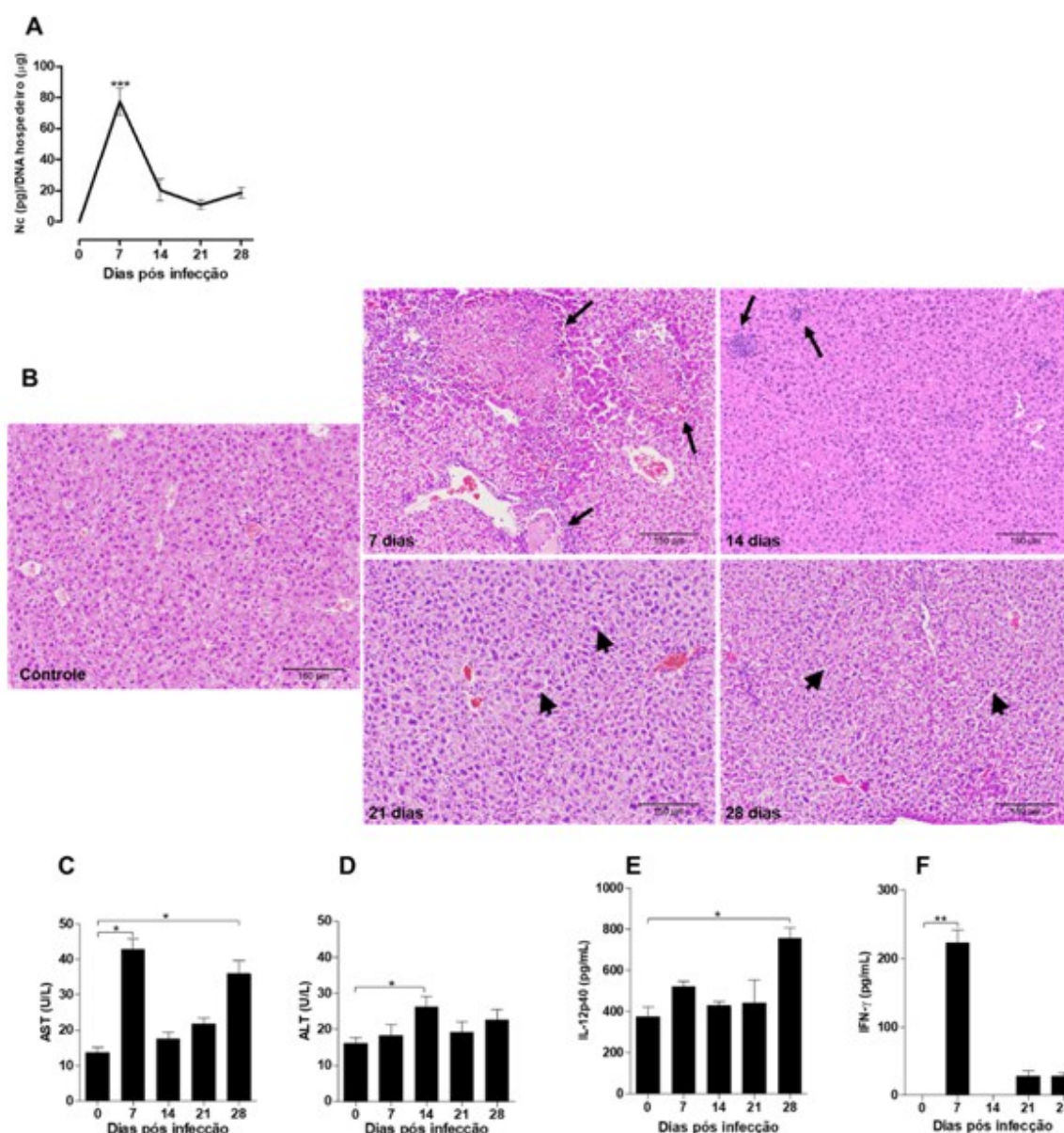
### **5.3. *N. caninum* dissemina-se para demais tecidos a partir da mucosa intestinal, induzindo respostas inflamatórias**

Devido aos resultados descritos acima, foi avaliado a disseminação parasitária em outros tecidos durante a infecção oral por qPCR. Os ensaios demonstraram um aumento da carga parasitária nos tecidos hepáticos após 7 dias p.i., diminuindo para níveis basais após 14 dias p.i., embora o DNA genômico de *N. caninum* ainda fosse detectável durante todo o acompanhamento experimental da infecção (28 dias - Figura 6A). Além disso, através da análise histopatológica do fígado, observamos a presença de infiltrados inflamatórios distribuídos por todo o órgão, causando edema e, eventualmente, necrose na fase aguda (Figura 6B). Durante o curso da infecção, observou-se uma diminuição da lesão tecidual, no entanto, os órgãos ainda apresentavam edema aos 28 dias p.i. (Figura 6B). Nosso próximo objetivo foi avaliar se as funções hepáticas foram afetadas pela infecção, através da detecção das transaminases AST e ALT. A detecção sérica apontou para um aumento significativo na produção de ambas as enzimas no 7º e 14º dia p.i. respectivamente (Figura 6C e Figura 6D). Com base nesses resultados e no aparente controle da infecção nesse órgão, foi investigado a produção de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  *in situ*, devido à importância dessas citocinas durante o processo infeccioso. Observou-se um aumento na produção de IL-12p40 sendo significativamente maior no 28º dia p.i. (Figura 6E), bem como elevada concentração de IFN- $\gamma$  durante a infecção aguda (7 dias p.i.), que diminuiu nos dias subsequentes (Figura 6F).

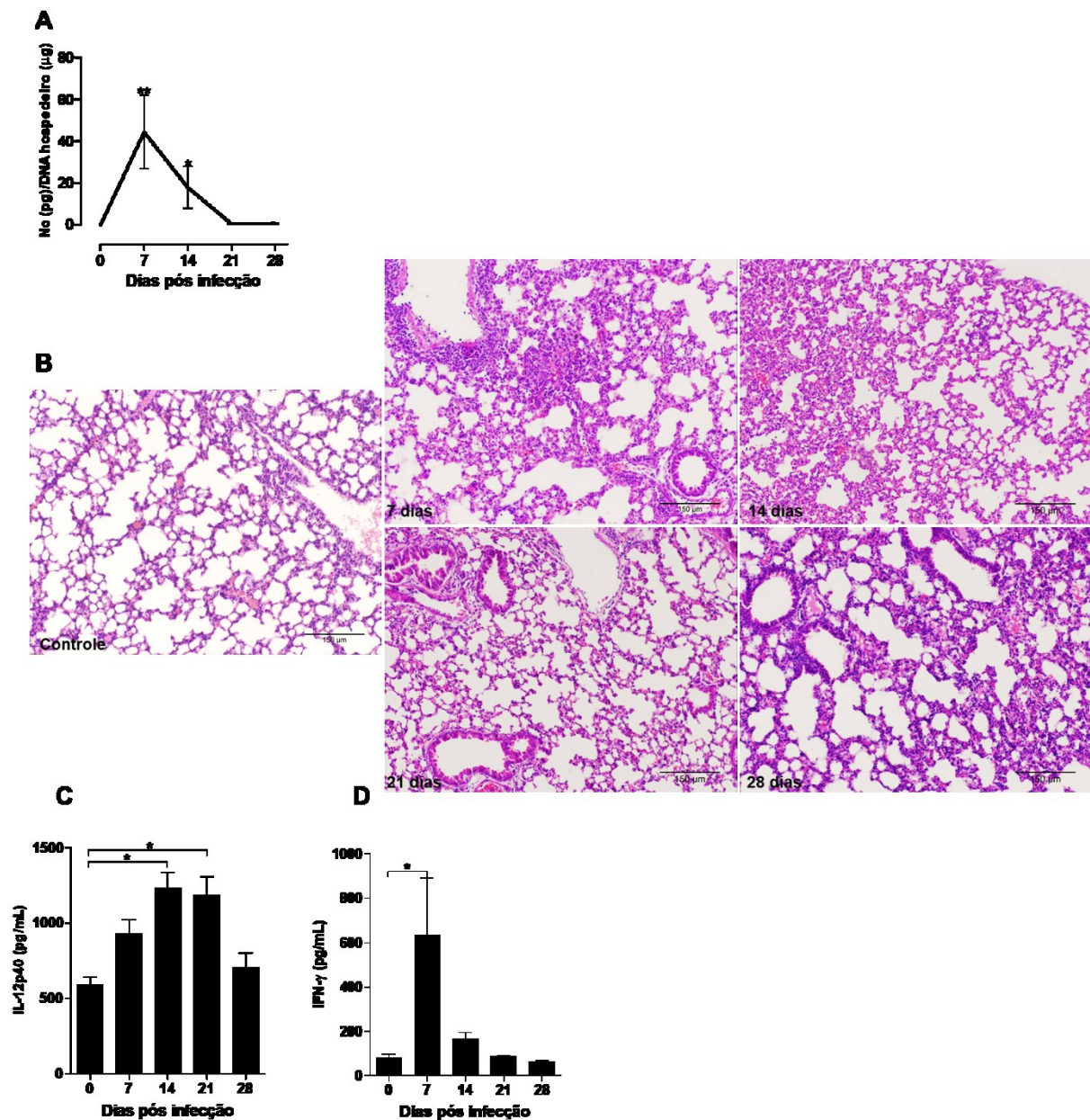
Além disso, foi analisado a migração do parasito para o tecido pulmonar. De maneira similar à observada no fígado, houve um aumento da carga parasitária nos pulmões dos animais durante a infecção aguda (7 e 14 dias p.i.), seguido por níveis indetectáveis nos dias subsequentes (Figura 7A). Análises histológicas revelaram que os pulmões de camundongos infectados apresentavam infiltrados inflamatórios, com perda de espaços alveolares a partir do espessamento do septo pulmonar, sendo observada restauração tecidual leves durante o curso da infecção (Figura 7B). Adicionalmente, a produção de citocinas também foi quantificada *in situ*, onde foi observado um aumento na produção de IL-12p40 na fase inicial da infecção, com picos significativos até o 21º dia p.i. (Figura 7C). Aumento nas concentrações de IFN- $\gamma$  também foram detectados no 7º dia p.i., seguido por diminuição da produção nos dias subsequentes (Figura 7D).

Foi analisado também a carga parasitária no sistema nervoso central de animais infectados pela via oral, observando-se um aumento da carga parasitária 7 e 14 dias p.i. com redução na fase crônica (Figura 8A). Em conjunto, nós analisamos também a presença de infiltrados inflamatórios no cérebro durante o curso da infecção. Nossos resultados demonstraram um aumento no perfil inflamatório no 28º dia p.i. quando comparado com os dias anteriores (Figura 8B).

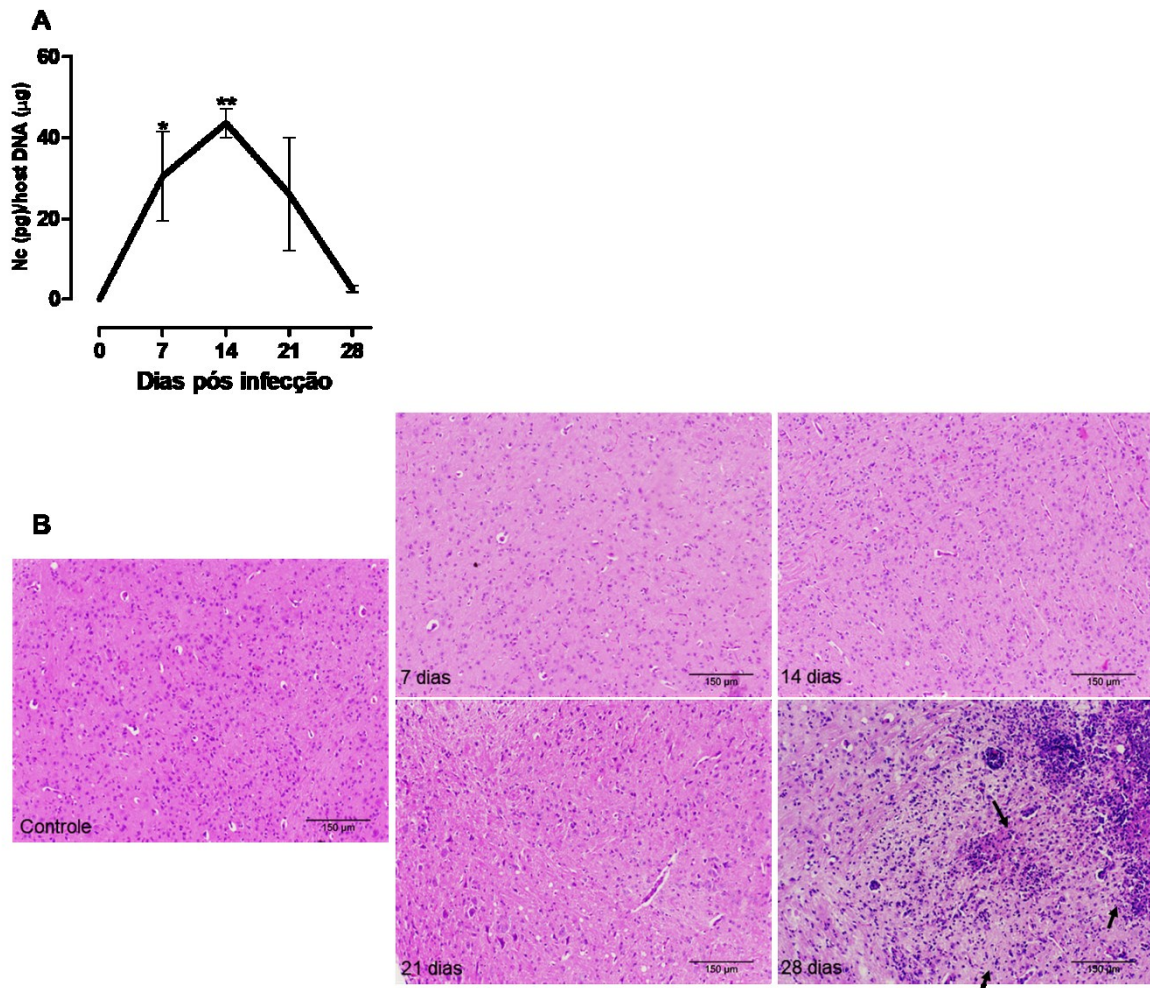
Tomados em conjunto, os dados acima demonstram que durante a infecção oral, *N. caninum* migra rapidamente do intestino para os demais órgãos e ativam processos inflamatórios que controlam a replicação parasitária, contudo induzem lesões decorrentes deste processo.



**Figura 6. Lesões hepáticas induzidas por *N. caninum* durante a infecção oral.** Camundongos WT foram infectados com  $3 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* pela via oral para análise cinética do fígado com 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Carga parasitária no fígado foi analisada por qPCR (A). Imagens representativas dos achados histológicos (B), setas pretas indicam necrose e áreas de infiltrado inflamatório, cabeças de seta indicam região de edema. Produção de AST (C) e ALT (D) no soro. Produção de IL-12p40 (E) e IFN- $\gamma$  (F) em homogenato tecidual. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ) entre os diferentes dias p.i. oral foram realizadas a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de múltipla comparação (Dunn's).



**Figura 7. Lesões pulmonares induzidas por *N. caninum* durante a infecção oral.** Camundongos WT foram infectados com  $3 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* pela via oral para análise cinética do pulmão com 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Carga parasitária no pulmão analisado por qPCR (A). Imagens representativas dos achados histológicos (B). Produção de IL-12p40 (C) e IFN- $\gamma$  (D) em homogenato tecidual. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ) entre os diferentes dias p.i. oral foram realizadas a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de múltipla comparação (Dunn's).

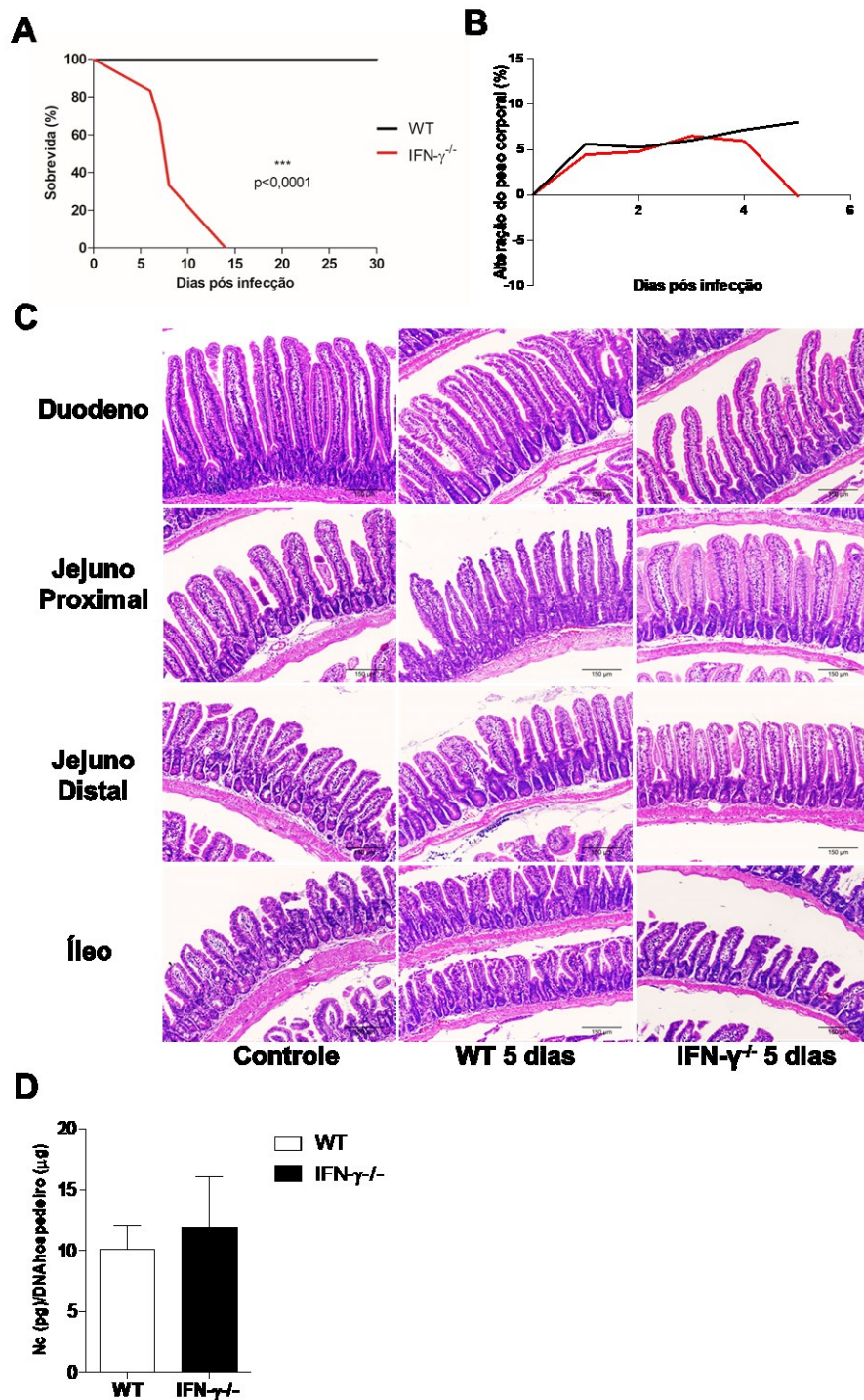


**Figura 8. Lesões cerebrais induzidas por *N. caninum* durante a fase crônica da infecção.** Camundongos WT foram infectados com  $3 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* pela via oral para análise cinética do cérebro com 0, 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Carga parasitária no cérebro analisada por qPCR (A). Imagens representativas de achados histológicos, setas pretas indicam infiltrados inflamatórios (B). Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ) entre os diferentes dias p.i. oral foram realizadas a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de múltipla comparação (Dunn's).

#### 5.4. IFN- $\gamma$ é crucial para o controle da infecção oral por *N. caninum*

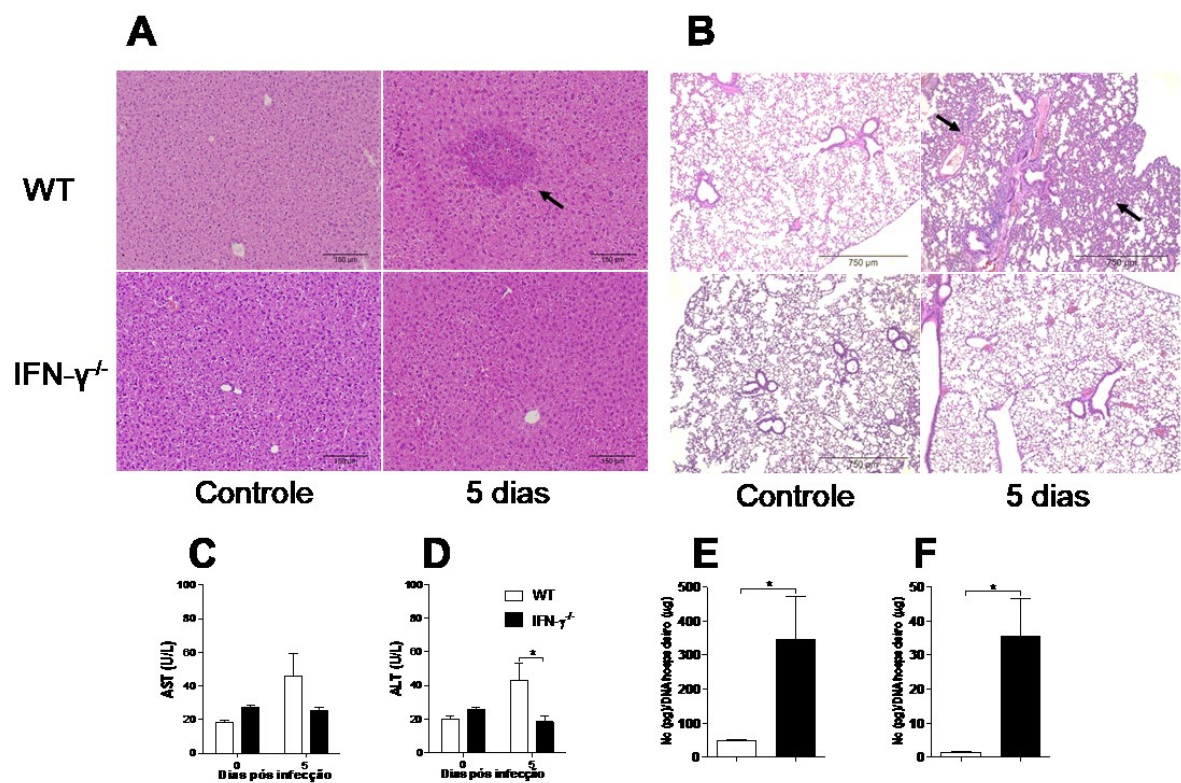
Para se confirmar a relevância da citocina IFN- $\gamma$  no controle da infecção oral por *N. caninum*, camundongos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$  infectados com o isolado - Nc1 de *N. caninum* foram monitorados durante 30 dias para análise de sobrevivência e morbidade. Observou-se que camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  sucumbiram durante a fase aguda da infecção (até o 14º dia p.i., Figura 9A), apesar de não apresentarem morbidade prévia, aqui mensurada pela perda de peso (Figura 9B). Uma vez confirmada a susceptibilidade de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  ao modelo de infecção, avaliou-se possíveis alterações histológicas nos segmentos do intestino delgado em comparação com animais WT, dentro da primeira semana de infecção. Nenhuma diferença no padrão tecidual do intestino foi observada em ambos os grupos analisados (Figura 9C). A carga parasitária também foi determinada na porção final do intestino delgado de animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$ . Ambos os grupos apresentaram quantificação de cópias de DNA genômico de *N. caninum*, contudo nenhuma diferença foi encontrada (Figura 9D).

Como observado anteriormente, o parasito *N. caninum* migra do intestino para outros órgãos como fígado e pulmão, deste modo foi avaliado o perfil inflamatório nestes tecidos. De acordo com os resultados obtidos, camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  não apresentaram alterações histológicas notáveis nos tecidos hepáticos, diferentemente do encontrado nos animais WT (Figura 10A). Em adição, observou-se novamente em camundongos WT perda da área alveolar no pulmão, comprometendo assim a integridade tecidual enquanto que tecidos pulmonares de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  mantiveram-se sem grandes alterações (Figura 10B). Além das análises histológicas, os danos hepáticos também foram avaliados a partir da quantificação das enzimas AST e ALT. Foi observado um aumento na produção de AST (Figura 10C) e ALT (Figura 10D) em animais WT quando comparados com o grupo não infectado, enquanto que a detecção enzimática entre os grupos IFN- $\gamma^{-/-}$  não infectado e infectado não apresentaram diferenças. Além disso foi analisado a carga parasitária nos tecidos hepáticos (Figura 10E) e pulmonares (Figura 10F) por qPCR, no qual foi constatado aumento expressivo do parasitismo em animais IFN- $\gamma^{-/-}$  em ambos os órgãos. Em conjunto, estes resultados indicam que durante a infecção oral a citocina IFN- $\gamma$  desempenha papel chave para a sobrevivência do hospedeiro, principalmente pelo controle da replicação parasitária no fígado e pulmão.



**Figura 9. Camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  são susceptíveis a infecção oral por *N. caninum*.** Sobrevivida de animais WT e IFN- $\gamma^{-/-}$  (A) e peso corporal (B). Curva de sobrevivida foram comparadas usando análise de sobrevivência de Kaplan-Meier através do teste log-rank Mantel-Cox. Análise histológica em diferentes segmentos intestinais 5 dias p.i. (C). Quantificação da carga parasitária por qPCR no íleo 5 dias p.i. (D). Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Análises estatísticas entre grupos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$  foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.





**Figura 10.** Camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  apresentam uma diminuição do quadro inflamatório após infecção oral por *N. caninum*. Análise histológica em tecidos hepáticos (A) e pulmonares (B) 5 dias p.i. oral por *N. caninum*. Setas pretas indicam áreas de infiltrados inflamatórios. Quantificação da produção de AST (C) e ALT (D) no soro de camundongos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$  5 dias p.i. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\* $P < 0.05$ ) entre grupos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$  foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. Quantificação da carga parasitária por qPCR 5 dias p.i. no fígado (E) e pulmão (F). Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ) entre grupos WT e IFN- $\gamma^{-/-}$  foram realizadas usando o teste Mann Whitney.

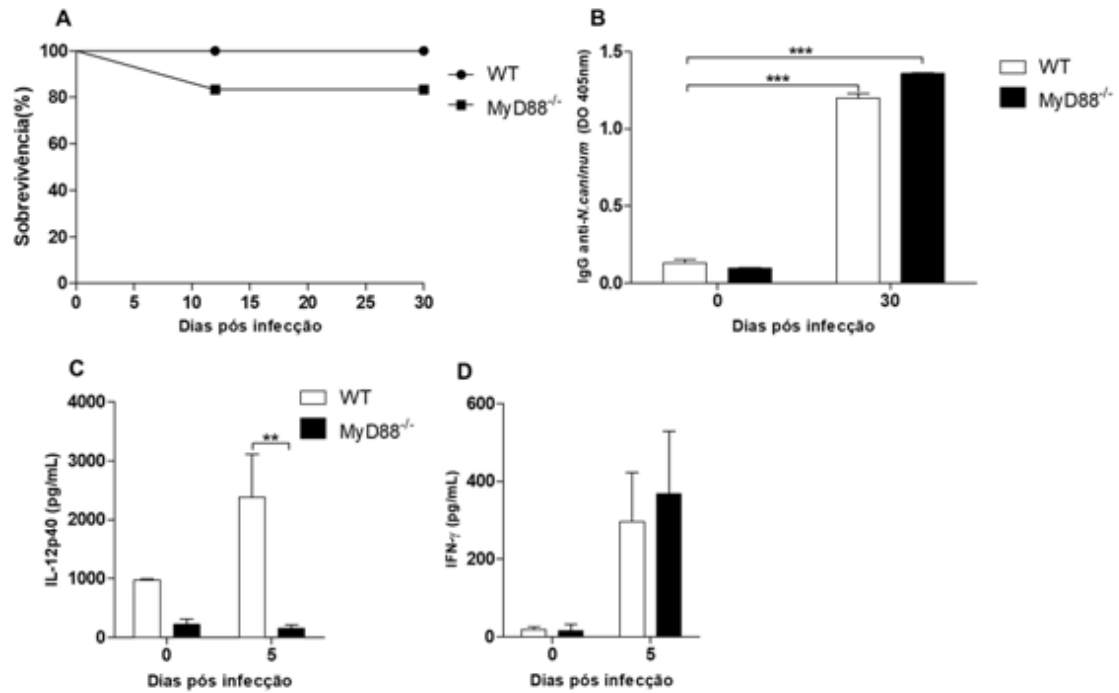
### **5.5. Participação das vias de reconhecimento inato na indução de IFN- $\gamma$ durante a infecção oral por *N. caninum***

Uma vez observada a importância de IFN- $\gamma$  na infecção oral, foi investigado a via responsável pela produção desta citocina no modelo de infecção oral adotado. Para isso, foram realizados experimentos utilizando camundongos geneticamente deficientes para MyD88, proteína adaptadora já descrita como importante para a produção de IFN- $\gamma$  durante a infecção intraperitoneal por *N. caninum* (MINEO et al., 2009a). Camundongos WT e MyD88<sup>-/-</sup> infectados com o isolado Nc1 foram monitorados durante 30 dias para análise de sobrevivência. A partir desse experimento foi observado que somente um camundongo MyD88<sup>-/-</sup> sucumbiu, o que demonstrou um perfil similar na sobrevivência em ambos os grupos infectados, revelando que camundongos MyD88<sup>-/-</sup> não são susceptíveis a infecção oral (Figura 11A). Adicionalmente, a partir de análises por ELISA indireto observou-se que os animais sobreviventes apresentaram produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum* (IgG), demonstrando o sucesso da infecção (Figura 11B). Além disso, quando avaliado os níveis séricos das citocinas IL-12p40 e IFN- $\gamma$  primordiais para o controle parasitário, não observou-se uma produção significativa de IL-12p40 em camundongos MyD88<sup>-/-</sup> (Figura 11C), contudo a concentração de IFN- $\gamma$  foi similar entre os grupos WT e MyD88<sup>-/-</sup> após cinco dias de infecção (Figura 11D).

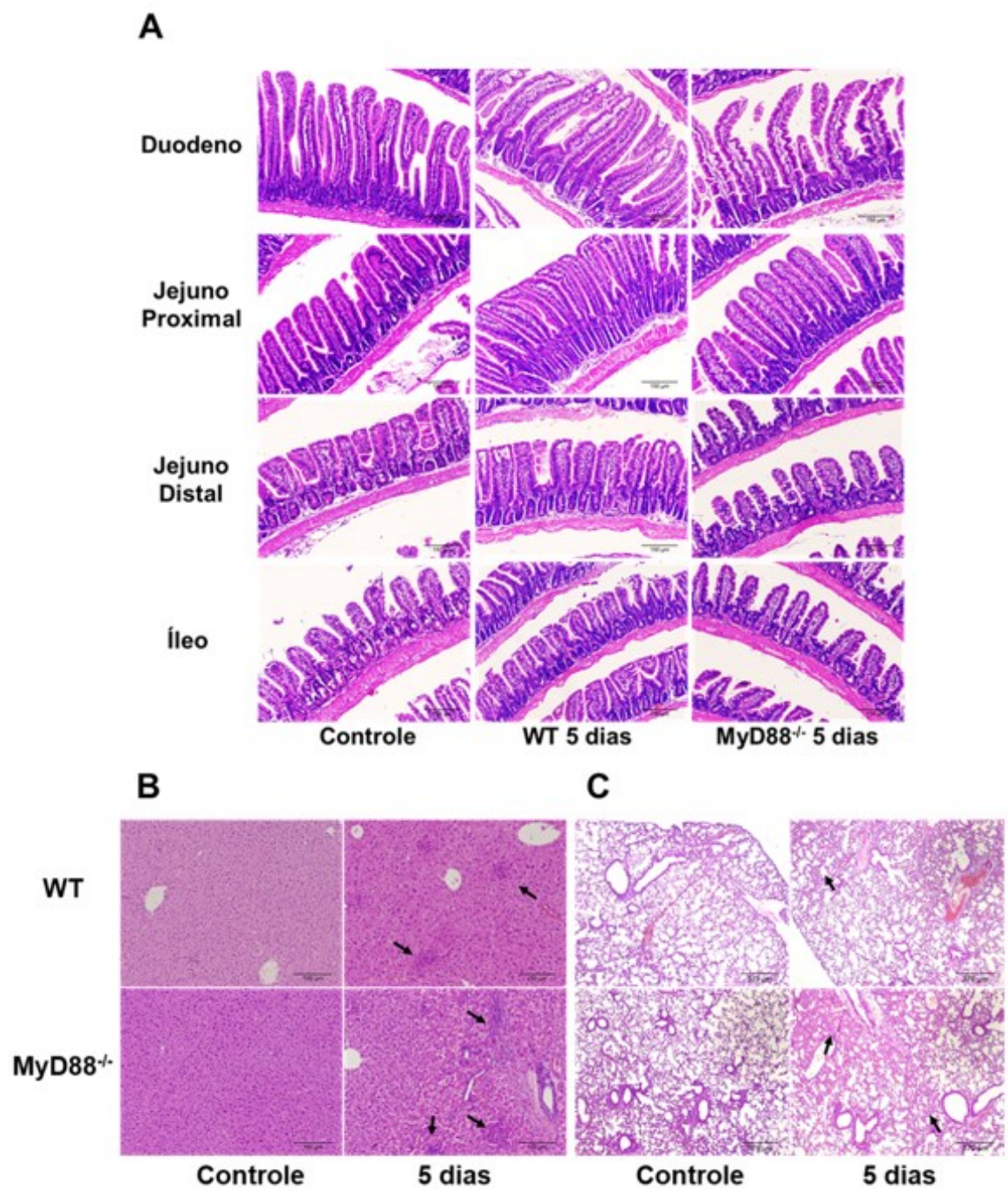
O perfil inflamatório também foi avaliado em tecidos alvos para a disseminação parasitária durante a infecção oral, através da técnica de coloração histológica H&E. Animais WT e MyD88<sup>-/-</sup> não apresentaram alterações histológicas no intestino (Figura 12A), contudo ambos os grupos foram notavelmente afetados 5 dias p.i., com a presença de infiltrados inflamatórios difusos e comprometimento estrutural nos tecidos hepáticos (Figura 12B) e pulmonares (Figura 12C).

Com o objetivo de se verificar a importância da proteína adaptadora MyD88 no controle da carga parasitária, foi realizado a quantificação de cópias do DNA genômico de *N. caninum* presentes no fígado e pulmão de camundongos WT e MyD88<sup>-/-</sup>. Foi observado um aumento significativo da carga parasitária nos tecidos hepáticos (Figura 13A) e pulmonares (Figura 13B) de camundongos MyD88<sup>-/-</sup>. A partir desses resultados foi possível observar que animais com depleção da proteína adaptadora MyD88 apresentam processos inflamatórios e alta carga parasitária, contudo eles conseguem sobreviver até 30 dias p.i.

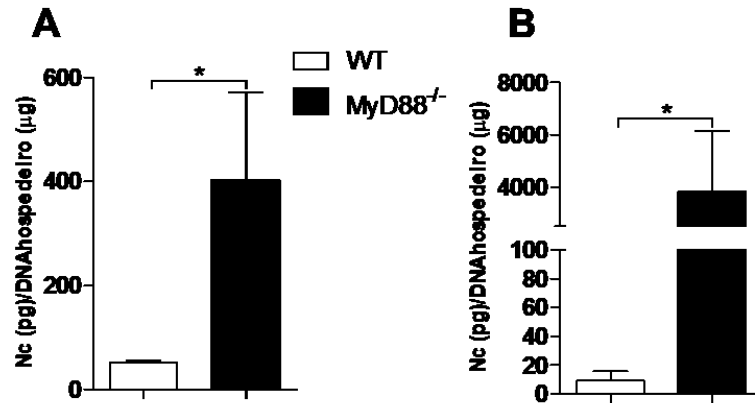
demonstrando que estes animais são resistentes a infecção, o que pode ser explicado pela produção da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ .



**Figura 11. Apesar de controlar a produção de IL-12, MyD88 não é essencial para o controle da infecção oral por *N. caninum*.** Sobrevida de camundongos WT e MyD88<sup>-/-</sup> frente a infecção oral por *N. caninum* (A), comparadas pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier através do teste log-rank Mantel-Cox. IgGtotal sérico antígeno-específico produzida por camundongos WT e MyD88<sup>-/-</sup> (B), após 30 dias de infecção oral. Produção de citocinas séricas IL-12p40 (C) e IFN- $\gamma$  (D) em camundongos MyD88<sup>-/-</sup> 5 dias p.i. oral por *N. caninum*. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001) entre grupos WT e MyD88<sup>-/-</sup> foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.



**Figura 12. Animais WT e MyD88<sup>-/-</sup> apresentam inflamação tecidual em órgãos abdominais e torácicos.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de camundongos WT e MyD88<sup>-/-</sup> cinco dias p.i. oral por *N.caninum*. Intestino(A), fígado (B) e pulmão (C). Setas pretas indicam áreas de infiltrados inflamatórios.

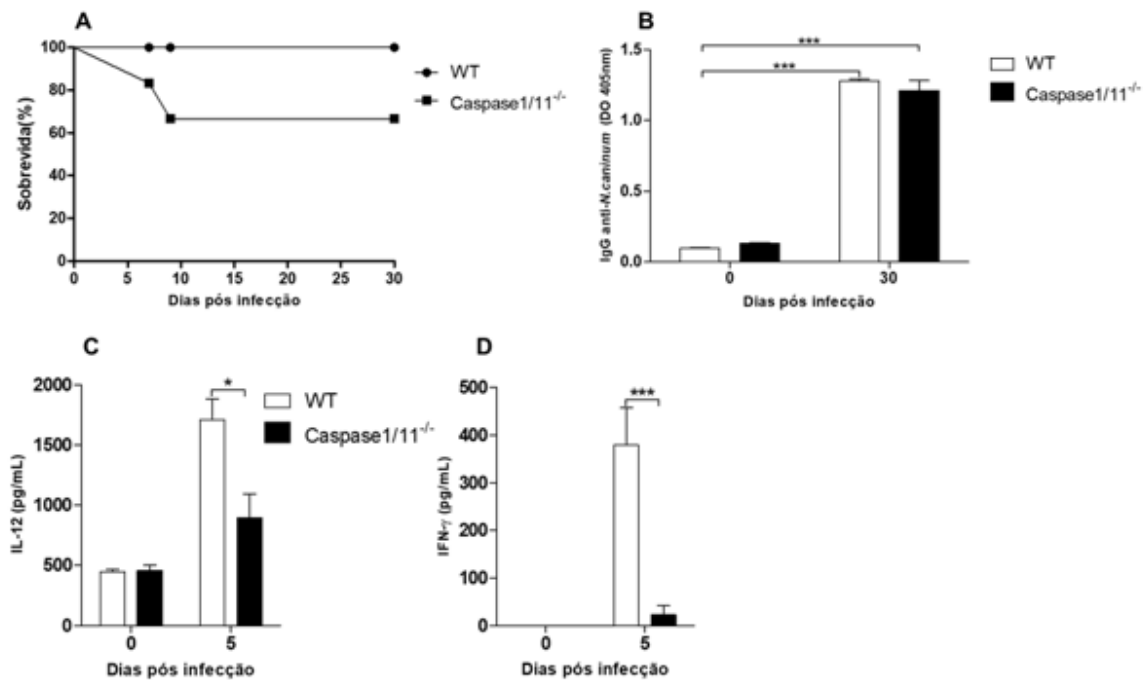


**Figura 13. Animais MyD88<sup>-/-</sup> apresentam aumento da carga parasitária em tecidos hepáticos e pulmonares.** Quantificação da carga parasitária em tecidos hepáticos (A) e pulmonares (B) de camundongos WT e MyD88<sup>-/-</sup> 5 dias p.i. oral por *N.caninum*. Resultados foram expressos como média ± SEM. Diferenças estatísticas (\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001) entre grupos WT e MyD88<sup>-/-</sup> foram realizadas usando o teste de Mann Whitney.

Como os níveis de IFN- $\gamma$  foram similares entre os grupos WT e MyD88<sup>-/-</sup>, avaliamos se a produção desta citocina durante a infecção oral ocorre através da ativação do inflamassoma mediado por Caspase-1/11. Camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> foram infectados e avaliados utilizando-se os mesmos parâmetros adotados para os experimentos em camundongos MyD88<sup>-/-</sup>. Primeiramente foi analisado a susceptibilidade de animais Caspase-1/11<sup>-/-</sup> frente a infecção oral por *N. caninum*. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência de ambos os grupos analisados (Figura 14A), contudo diferentemente do encontrado para camundongos MyD88<sup>-/-</sup>, dois animais Caspase-1/11<sup>-/-</sup> sucumbiram a infecção durante a fase aguda (7 e 9 dias p.i.), enquanto que animais MyD88<sup>-/-</sup> sucumbiram mais tardiamente a infecção (12º dia p.i). Adicionalmente, após 30 dias de infecção os animais que sobreviveram apresentaram produção de anticorpos específicos compatíveis com os animais controles (Figura 14B), demonstrando a soroconversão dos mesmos. A partir da quantificação sérica da citocina IL-12p40, foi observado um aumento da mesma em animais WT quando comparados com animais Caspase-1/11<sup>-/-</sup> (Figura 14C). Curiosamente, camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> apresentaram baixas concentrações de IFN- $\gamma$  sérica (Figura 14D), quando comparado aos camundongos WT.

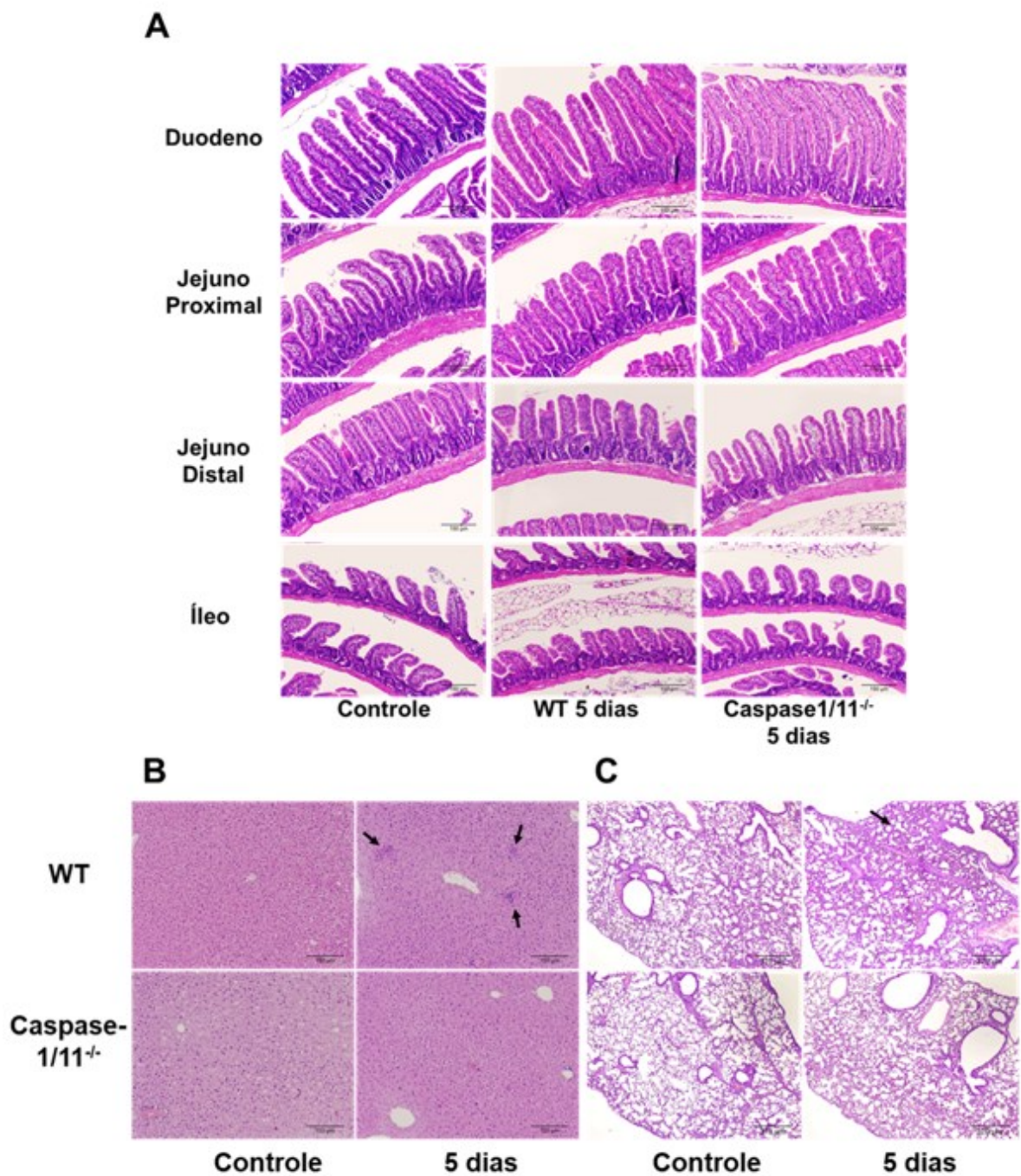
Assim como no grupo de camundongos MyD88<sup>-/-</sup>, inflamações teciduais também foram investigadas em camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup>. Como anteriormente descrito, não foram encontrados lesões nos seguimentos intestinais dos grupos analisados (Figura 15A). Contudo, notou-se uma redução significativa no quadro inflamatório dos tecidos hepáticos (Figura 15B) e pulmonares (Figura 15C) de camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> quando comparados aos animais WT, perfil muito semelhante aquele encontrado nas infecções de camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. A partir da reação de qPCR pela amplificação do gene *Nc5*, observou-se que não houve diferenças significativas na carga parasitária de tecidos hepáticos (Figura 16A) e pulmonares (16B) entre grupos de camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> infectados pela via oral 5 dias p.i.

Mesmo já tendo sido descrito a importância de MyD88 durante a infecção intraperitoneal em modelos murinos, observou-se que durante a infecção oral, que mimetiza a via natural da infecção por *N. caninum*, a via do Inflamassoma é crucial para a produção de IFN- $\gamma$ . No entanto a falta desta citocina não leva a susceptibilidade total do grupo Caspase-1/11<sup>-/-</sup>, o que deve ser melhor elucidado.

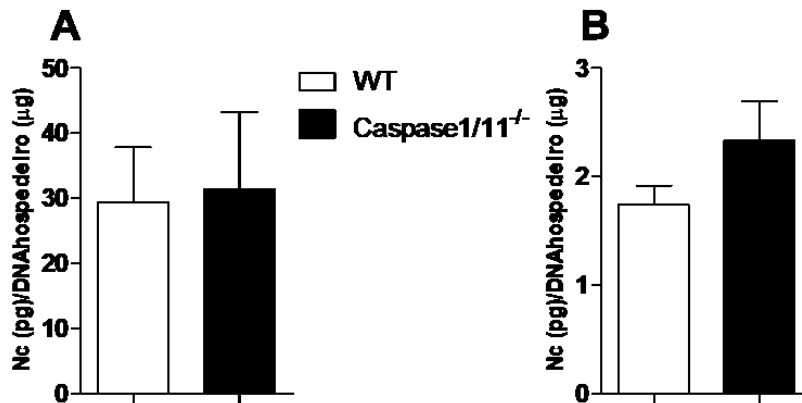


**Figura 14. Apesar da resistência a infecção, animais Caspase-1/11<sup>-/-</sup> apresentam redução na produção de IFN- $\gamma$  durante a infecção oral por *N. caninum*.** Sobrevida de camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> frente a infecção oral por *N. caninum* (A), comparadas pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier através do teste log-rank Mantel-Cox. IgGtotal sérico antígeno-específico produzido por camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> (B) após 30 dias de infecção oral. Produção de citocinas séricas IL-12p40 (C) e IFN- $\gamma$  (D) em camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> 5 dias p.i. oral por *N. caninum*. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\*P<0.05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001) entre grupos WT e Caspase1/11<sup>-/-</sup> foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.





**Figura 15. Animais Caspase-1/11<sup>-/-</sup> apresentam inflamação tecidual sutil em órgãos abdominais e torácicos.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> 5 dias p.i. oral por *N.caninum*. Intestino(A), fígado (B) e pulmão (C). Setas pretas indicam áreas de infiltrados inflamatórios.



**Figura 16.** Apesar da baixa produção de IFN- $\gamma$ , camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> apresentam carga parasitária similar em tecidos hepáticos e pulmonares. Quantificação da carga parasitária em tecidos hepáticos (A) e pulmonares (B) de camundongos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> 5 dias p.i. oral por *N. caninum*. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas (\*P<0.05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001) entre grupos WT e Caspase-1/11<sup>-/-</sup> foram realizadas usando o teste de Mann Whitney.

# *Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

Pesquisas envolvendo mecanismos de resposta imune em modelos murinos durante a infecção oral com taquizoítos de *N. caninum* são essenciais, uma vez que mimetizam a via natural da infecção em hospedeiros intermediários com maior precisão. Lindsay e Dubey (1990) foram os primeiros a demonstrarem uma infecção bem sucedida em camundongos a partir de taquizoítos de *N. caninum* (isolado-Nc1) utilizando uma rota de infecção diferente das tradicionalmente utilizadas na pesquisa científica. Em seus experimentos foi observado que 14 de 20 camundongos Swiss infectados pela via oral morreram de pneumonia aguda entre os dias 7 e 14 p.i., 3 morreram de encefalite enquanto que camundongos sobreviventes apresentaram sinais neurológicos provenientes da infecção. Estes resultados sugerem que taquizoítos de *N. caninum* são capazes de sobreviverem após a passagem pelo trato gastrointestinal em camundongos Swiss (LINDSAY; DUBEY, 1990). Contudo, estes autores levantaram a possibilidade dos taquizoítos penetrarem na mucosa da cavidade oral/esofágica, mesmo antes de chegar ao estômago, disseminando a infecção. Esta hipótese foi criada a partir de experimentos *in vitro* que demonstram que taquizoítos de *N. caninum* não apresentam resistência a pepsina-HCl, importantes na digestão de proteínas. Desta forma, surgiram protocolos utilizando solução neutralizante do pH estomacal para estabelecer com sucesso a infecção oral com taquizoítos de *N. caninum* (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; TEIXEIRA et al., 2007). Adicionalmente, para garantir que o parasito chegue até o estômago e a partir desse órgão dissemine no hospedeiro, Teixeira e colaboradores (2007), administraram taquizoítos de *N. caninum* diretamente no estômago por gavagem, após a neutralização da acidez estomacal.

A partir do protocolo já preestabelecido (TEIXEIRA et al., 2007), foi possível observar no presente estudo que animais infectados pela via oral produziram anticorpos específicos contra *N. caninum*, demonstrando a ativação da resposta imune humoral nesta via de infecção. Estudos mostraram que a produção de imunoglobulinas específicas é importante para inibir a invasão de taquizoítos em células hospedeiras e controlar a replicação parasitária (AGUADO-MARTINEZ et al., 2010; AGUADO-MARTINEZ et al., 2017). Além disso, o perfil de produção de anticorpos está relacionado ao perfil de resposta imune celular desencadeada pelo patógeno (FINKELMAN et al., 1988; AGUADO-MARTINEZ et al., 2017). A partir dos experimentos realizados foi observado uma maior produção de IgG2 em relação a IgG1. Este fato pode ser explicado pelas altas concentrações

de IFN- $\gamma$  encontradas em nossos experimentos durante a fase aguda da infecção, uma vez que esta citocina está relacionada à resposta celular do tipo Th1 em infecções por *N. caninum* (MINEO et al., 2010) e desempenha um papel importante na troca de classe IgG com o isotipo IgG2 predominante (LONG; BASZLER; MATHISON, 1998; ROJO-MONTEJO et al., 2009).

Assim como observado em nossos resultados, em infecções pela via intraperitoneal foi detectado aumento na produção de IFN- $\gamma$  sérica 7 dias p.i., acompanhado de uma diminuição nos dias subsequentes (MINEO et al., 2009a), desta forma assim como na infecção parenteral, a infecção oral de camundongos C57BL/6 é capaz de ativar a resposta imune celular e humoral que controla a multiplicação intracelular parasitária e a infecção aguda. Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos utilizando camundongos C57BL/6 imunossuprimidos e em animais BALB/C (TEIXEIRA et al., 2007; FERREIRINHA et al., 2014; FERREIRINHA et al., 2016). Em bovinos infectados de forma natural ou experimental também foi demonstrado uma resposta imune do perfil Th1 com presença de altos níveis de IFN- $\gamma$  e produção de anticorpos IgG2 específicos (WILLIAMS et al., 2000; ANDRIANARIVO et al., 2005).

A resposta imune da mucosa é considerada importante na proteção do hospedeiros durante a infecção por parasitos intracelulares (BENEVIDES et al., 2013). Deste modo investigações realizadas em nosso estudo durante a infecção gastrointestinal revelaram a presença de DNA parasitário ao longo do intestino delgado e a ativação de uma resposta imune com alta produção de IFN- $\gamma$ . Contudo, não foram detectadas alterações histológicas nas porções intestinais, permanecendo intactas durante a passagem do parasito através da parede intestinal. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, os quais a resposta imune gerada pelas células do epitélio intestinal e dos linfonodos mesentéricos leva a uma proteção importante na mucosa intestinal durante a infecção oral por *N. caninum*, especialmente pelo aumento da produção de citocinas Th1, principalmente IFN- $\gamma$  (TEIXEIRA et al., 2007; CORREIA et al., 2013).

A resposta imune Th1 em infecções orais com cistos de *T. gondii* tem sido associada a inflamação intestinal grave gerada a partir da alta produção de IFN- $\gamma$  e consequente eliminação de células de Paneth, que são responsáveis por secretarem peptídeos antimicrobianos na mucosa intestinal protegendo a mesma contra danos (BENEVIDES et al., 2013; CLEVERS; BEVINS, 2013; BURGER et al., 2018). Ao contrário da infecção por *T. gondii*, o aumento de IFN- $\gamma$  nos tecidos intestinais de camundongos infectados por *N.*

*caninum* não gera dano tecidual, o que pode ser explicado pela preservação de células que são cruciais na proteção da mucosa intestinal. Além disso, a composição da microbiota pode estar envolvida na proteção intestinal em infecções por protozoários (PARTIDA-RODRIGUEZ et al., 2017).

Com o objetivo de avaliar a migração de *N. caninum* para outros órgãos, tecidos hepáticos, pulmonares e cerebrais foram analisados a partir de camundongos infectados pela via oral. Observou-se que parasitos migraram do lúmen intestinal para os órgãos adjacentes, atingindo o fígado e o pulmão, os quais continham alta carga parasitária e grave perfil inflamatório na fase aguda. No sistema nervoso central o DNA parasitário apresentou pico maior no 14º dia de infecção seguida pela redução da carga parasitária porém alterações histológicas aumentaram durante a fase crônica (28 dias). Estes resultados podem ser explicados devido a evasão do parasito à resposta imune e sobrevivência no hospedeiro, gerando um período de latência o que leva a cronificação assintomática da infecção. Reduções similares na detecção de DNA específico de *N. caninum* também foi observado no cérebro de bezerros e camundongos experimentalmente infectados com o parasito (DE MAREZ et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2007). Outros estudos demonstram que camundongos infectados pela via oral com o isolado Nc-2 não sucumbiram a infecção e nem apresentaram sinais clínicos da neosporose, embora tenha sido observado lesões cerebrais similares as encontradas em animais infectados pela via intraperitoneal (LINDSAY; DUBEY, 1990).

Adicionalmente, foi observado em nosso estudo que a ativação da resposta imune celular efetiva contra *N. caninum* em órgãos abdominais e torácicos de animais C57BL/6, fez com que o perfil inflamatório observado nos tecidos durante a fase aguda diminuísse no decorrer da infecção. Os dados encontrados neste trabalho corroboram com estudos anteriores, que demonstraram que camundongos BALB/c imunocompetentes infectados pela via intragástrica com taquizoítos de *N. caninum* apresentavam infiltrados inflamatórios em diferentes órgãos (TEIXEIRA et al., 2007). Estes resultados demonstram que assim como na infecção intraperitoneal, durante a infecção oral ocorre o predomínio da resposta do tipo Th1 com alta produção de citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  sendo primordiais na proteção contra *N. caninum* durante o curso da infecção.

De fato, os patógenos intracelulares migram do local da infecção primária para outros locais através da invasão celular, o que favorece a disseminação do parasito no hospedeiro (LAMBERT et al., 2006; MINEO et al., 2010) Pesquisadores levantam a hipótese de que o

parasito *N. caninum* é transportado do intestino para os linfonodos mesentéricos através de células dendríticas, sendo sistemicamente disseminado no hospedeiro (CORREIA et al., 2013). Em geral, o mecanismo usado pelo parasito para evadir da resposta imune da mucosa e promover uma infecção sistêmica permanece desconhecido e deve ser melhor investigado.

A importância de IFN- $\gamma$  na resistência a infecções por diferentes protozoários intracelulares tem sido extensivamente reportadas (SILVA et al., 2009; FERREIRINHA et al., 2018; NOVAIS et al., 2018). Animais IFN- $\gamma^{-/-}$  infectados pela via intraperitoneal por *N. caninum* são menos resistentes sucumbindo até o 12º dia de infecção, falhando na indução da proliferação de células T e na produção de NO (NISHIKAWA et al., 2001; MINEO et al., 2009a). A partir dessas informações realizamos uma análise utilizando camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$  infectados pela via oral. Os nossos resultados demonstraram que assim como na infecção intraperitoneal, estes animais sucumbem na fase aguda. Experimentos utilizando camundongos C57BL/10 ScCr que não expressam TLR4 e simultaneamente tem uma deficiência em montar respostas imunes mediadas por IL-12 e IFN- $\gamma$ , mostram que estes animais também sucumbem a infecção oral com taquizoítos de *N. caninum* (TEIXEIRA et al., 2007). Outro ponto importante é que a falta da citocina IFN- $\gamma$  funcional não gera danos em tecidos hepáticos e pulmonares, e que os níveis enzimáticos relacionados a danos no fígado não apresentaram diferenças entre animais IFN- $\gamma^{-/-}$  controles e infectados, sendo mais expressivos em animais WT. Estes resultados demonstram a importância da citocina IFN- $\gamma$  para o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da infecção.

A infecção por *T. gondii* em animais deficientes em IFN- $\gamma$  causa lesões teciduais menos graves quando comparados com animais WT (SILVA et al., 2009), contudo o parasitismo tecidual no fígado e pulmão destes animais *knockout* são maiores (LEE; HONG; SEO, 2000; NISHIKAWA et al., 2001; SILVA et al., 2009). Dados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, em que animais IFN- $\gamma^{-/-}$  apresentaram maior parasitismo em tecidos hepáticos e pulmonares quando comparados com animais WT. Estes resultados demonstram que animais IFN- $\gamma^{-/-}$  sucumbem a infecção devido à alta carga parasitária e falhas nos mecanismos inflamatórios teciduais, revelando que esta citocina tem influência direta no controle da replicação parasitária durante a infecção oral.

MyD88 tem sido descrita como uma molécula adaptadora chave durante vários processos infecciosos, resultando na resistência do hospedeiro, sendo ativada por sinais emitidos a partir do reconhecimento de PAMPs por receptores TLR. Experimentos adotando infecções intraperitoneais por *N. caninum*, tem mostrado que na ausência de MyD88

camundongos são mais susceptíveis a infecção, com baixas concentrações de IL-12p40 e um retardo na produção de IFN- $\gamma$  sérica, o que leva a falhas na resposta Th1 efetora (MINEO et al., 2009a). Além disso, estudos utilizando animais IL-12<sup>-/-</sup> infectados com *N. caninum* demonstraram a importância funcional desta citocina na produção de IFN- $\gamma$  e consequente resistência a infecção intraperitoneal (MINEO et al., 2009a; FERREIRINHA et al., 2018). Durante a infecção oral, observou-se que camundongos MyD88<sup>-/-</sup> foram resistentes a infecção, apresentando níveis de IL-12p40 séricas reduzidas, contudo a produção de IFN- $\gamma$  foi semelhante aos animais WT, o que pode explicar a sobrevivência do grupo *knockout*. Confirmando essa hipótese, Mineo e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento de animais deficientes para MyD88 com IFN- $\gamma$  recombinante conferiam resistência à infecção, revelando a importância desta citocina para a sobrevivência do hospedeiro.

Tecidos hepáticos e pulmonares de animais MyD88<sup>-/-</sup> também foram analisados, e assim como encontrado durante infecções intraperitoneais, pôde-se observar um aumento dos infiltrados inflamatórios, bem como elevada carga parasitária quando comparado com camundongos WT nestes órgãos (MINEO et al., 2009a). Contudo, nossos resultados demonstraram que IL12p40 não possui papel primordial na indução de IFN- $\gamma$  durante a infecção oral, além disso, infecções pela via oral desencadeia a ativação da resposta imune protetora em modelos murinos depletados para MyD88, recrutando células inflamatórias e controlando a infecção.

O sucesso da resposta imune desencadeada em infecções por *T. gondii* ocorre também a partir da ativação da via de MyD88, a qual é importante na resistência do hospedeiro a infecção, uma vez que sua depleção aumenta a susceptibilidade dos mesmos (SCANGA et al., 2002). Alguns autores acreditam que outros mediadores inatos participam da resposta imune inicial durante a infecção por *Leishmania*. Essas especulações ocorrem devido à alta produção de células CD4+IFN- $\gamma$ + em animais MyD88<sup>-/-</sup> (VARGAS-INCHAUSTEGUI et al., 2009; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015).

A partir dos resultados até aqui descritos, objetivou-se analisar a via do inflamassoma como possível indutor na produção desta citocina. Sabe-se que a ativação do inflamassoma desempenha importante papel na resposta imune do hospedeiro durante a infecção por diferentes protozoários intracelulares como *Leishmania* spp., *T. gondii* e *T. cruzi*, induzindo a produção e secreção de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (SILVA et al., 2013; GORFU et al., 2014; LIMA-JUNIOR et al., 2017; EVAVOLD; KAGAN, 2018). Em camundongos geneticamente deficientes para NLRP3, ASC e Caspase-1/11 e infectados por



*Leishmania* spp. foi observado que o inflamassoma foi importante no controle da replicação parasitária (LIMA-JÚNIOR et al., 2013; SANTOS et al., 2013;). Além disso, em infecções por *T. gondii* foi demonstrado que NLRP3, ASC e Caspase-1/11 também são essenciais no controle da carga parasitária, principalmente pela produção de IL-18 que contribui para a sobrevivência dos animais infectados (CAVAILLES et al., 2014; GORFU et al., 2014).

A partir dos resultados obtidos, foi visto que na ausência de Caspase-1/11, os níveis de IFN- $\gamma$  séricos foram reduzidos, demonstrando que o inflamassoma está intimamente relacionado a produção desta citocina em modelos de infecção oral. A importância da produção de IFN- $\gamma$  via ativação do inflamassoma foi observado também em modelos de infecção por *L. amazonenses*, a partir de células deficientes para Caspase-1, as quais tiveram a expressão de IFN- $\gamma$  reduzidas, indicando que o inflamassoma é requerido para a produção de IFN- $\gamma$  nesse modelo de infecção (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

Estudos utilizando infecções por *N. caninum* são mais recentes e ainda pouco se sabe sobre o papel desta via durante a infecção. Nosso grupo demonstrou em seus experimentos que *N. caninum* é capaz de ativar caspase-1 endógena e induzir secreção de IL-1 $\beta$  *in vitro*, a partir de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) deficientes em NLRP3, ASC e Caspase-1/11 infectados por *N. caninum*, evidenciando que componentes do inflamassoma participam da resposta imune inata induzida por este parasito (dados não publicados). Outras pesquisas indicam que o inflamassoma ativado por NLRP3 participa da resposta imune contra a infecção por *N. caninum in vitro* (WANG et al., 2017) e também em modelos murinos infectados pela via intraperitoneal, limitando a replicação parasitária, uma vez que camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> apresentaram diminuição na produção de IFN- $\gamma$  sérica, corroborando assim com os resultados encontrados em nossos experimentos (WANG et al., 2018).

A produção de citocinas pró-inflamatórias a partir da ativação do inflamassoma tem demonstrado ser uma peça fundamental no favorecimento de processos inflamatórios nos tecidos infectados, contribuindo para a eliminação do patógeno (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015; SEGOVIA et al., 2018). Como esperado, a redução da produção de IFN- $\gamma$  em camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> levou a diminuição do recrutamento de células inflamatórias para os órgãos periféricos, perfil semelhante ao observado em nossos resultados utilizando camundongos deficientes para IFN- $\gamma$ .

Wang e colaboradores (2018) demonstraram em seus experimentos que a ativação do inflamassoma desempenha um importante papel na limitação do crescimento parasitário

durante a fase aguda da infecção intraperitoneal por *N. caninum*, induzindo principalmente a ativação de uma resposta Th1. Estes autores observaram em seus experimentos que animais Caspase-1/11<sup>-/-</sup> apresentaram um aumento da carga parasitária no cérebro durante a fase aguda da infecção, enquanto no pulmão, semelhante ao encontrado em nosso estudo, foi observado um pequeno aumento sem diferenças significativas. Vale ressaltar que camundongos Caspase-1/11<sup>-/-</sup> não foram totalmente susceptíveis a infecção oral por *N. caninum*, apesar de não produzirem altos níveis de IFN- $\gamma$  como os animais WT, o que também foi visto em infecções intraperitoneais com o mesmo parasito (WANG et al., 2018). A resistência de camundongos deficientes em Caspase-1/11 à infecção por *N. caninum* e os mecanismos envolvidos para explicar a resistência parcial destes animais devem ser melhor elucidados. Uma possível explicação para isso pode ser que a falta de IFN- $\gamma$  leve a um mecanismo de compensação, ativando outras vias da imunidade que atuam no controle parasitário e sobrevivência do hospedeiro.

Todos esses resultados permitem sugerir que a ativação da resposta imune adaptativa ativada a partir de mecanismos imunes inatos são importantes na proteção contra *N. caninum* durante a infecção oral, mais precisamente pela produção de IFN- $\gamma$  via inflamassoma. Além disso, a participação de IL-18 deve também ser melhor investigada nesse modelo de infecção, por ser clivada a partir de Caspase-1, exercer efeitos importantes no início das respostas do tipo Th1 e induzir a produção de IFN- $\gamma$  (OKAMURA et al., 1995; ZHANG et al., 1997).

# Conclusão

---

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos nesse estudo podemos concluir que taquizoítos de *N. caninum* inoculados pela via oral são capazes de infectar diferentes órgãos do hospedeiro. Em contrapartida, também demonstramos que camundongos infectados desenvolvem uma resposta imune protetora, por meio de mecanismos inflamatórios teciduais. Esta resposta inflamatória ocorre a partir da produção de IFN- $\gamma$ , citocina chave para o controle da infecção por *N. caninum*. Além disso, estes resultados indicam que o inflamassoma desempenha papel importante neste mecanismo, desencadeando a produção de IFN- $\gamma$  e proteção do hospedeiro. Com base nestes resultados, almeja-se desvendar futuramente os mecanismos de indução do inflamassoma durante a infecção oral e assim contribuir para o desenvolvimento de medidas terapêuticas ou vacinas contra *N. caninum*.

## Referências

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, C.; TANAKA, S.; IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v.21, p. 1185-1188, 2014. <https://doi.org/10.1128/CVI.00082-14>
- AGUADO-MARTINEZ, A.; BASTO, A. P.; LEITAO, A.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* in non-pregnant and pregnant mouse models: cross-talk between infection and immunity. **International journal for parasitology**, v.47, p. 723-735, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.001>
- ALMERIA, S.; ARAUJO, R. N.; DARWICH, L.; DUBEY, J. P.; GASBARRE, L. C. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite immunology**, v.33, p. 517-523, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01307.x>
- ALMERIA, S. *Neospora caninum* and Wildlife. **ISRN parasitology**, v.2013, p. 947347, 2013.
- ALMERIA, S.; SERRANO-PEREZ, B.; DARWICH, L.; MUR-NOVALES, R.; GARCIA-ISPIERTO, I.; CABEZON, O.; LOPEZ-GATIUS, F. Cytokine gene expression in aborting and non-aborting dams and in their foetuses after experimental infection with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary parasitology**, v.227, p. 138-142, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.006>
- ALMERIA, S.; SERRANO-PEREZ, B.; LOPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial pathogenesis**, v.109, p. 177-182, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.042>
- AMMANN, P.; WALDVOGEL, A.; BREYER, I.; ESPOSITO, M.; MULLER, N.; GOTTSTEIN, B. The role of B- and T-cell immunity in toltrazuril-treated C57BL/6 WT, microMT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasitology research**, v.93, p. 178-187, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1083-y>
- 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. **Parasitology research**, v.96, p. 24-31, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1313-y>
- ARRANZ-SOLIS, D.; BENAVIDES, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; FUERTES, M.; FERRE, I.; FERRERAS MDEL, C.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HEMPHILL, A.; PEREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. **Veterinary research**, v.46, p. 19, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0139-y>
- BARLING, K. S.; MCNEILL, J. W.; THOMPSON, J. A.; PASCHAL, J. C.; MCCOLLUM, F. T., 3RD; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef

calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p. 1356-1360, 2000a. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1356>

BARLING, K. S.; SHERMAN, M.; PETERSON, M. J.; THOMPSON, J. A.; MCNEILL, J. W.; CRAIG, T. M.; ADAMS, L. G. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p. 1361-1365, 2000b. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1361>

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

BARTLEY, P. M.; KATZER, F.; ROCCHI, M. S.; MALEY, S. W.; BENAVIDES, J.; NATH, M.; PANG, Y.; CANTON, G.; THOMSON, J.; CHIANINI, F.; INNES, E. A. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. **Veterinary research**, v.44, p. 91, 2013. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-91>

BASSO, W.; SCHARES, S.; MINKE, L.; BARWALD, A.; MAKSIMOV, A.; PETERS, M.; SCHULZE, C.; MULLER, M.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary parasitology**, v.173, p. 24-31, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.009>

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, p. e88398, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088398>

BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; DOS SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H.; DA COSTA, A. J.; MINEO, J. R.; LOBATO, J.; DE OLIVEIRA SILVA, D. A.; GENNARI, S. M. Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria**, v.18, p. 29-33, 2009. <https://doi.org/10.4322/rbpv.018e1005>

BENEVIDES, L.; CARDOSO, C. R.; MILANEZI, C. M.; CASTRO-FILICE, L. S.; BARENCO, P. V.; SOUSA, R. O.; RODRIGUES, R. M.; MINEO, J. R.; SILVA, J. S.; SILVA, N. M. *Toxoplasma gondii* soluble tachyzoite antigen triggers protective mechanisms against fatal intestinal pathology in oral infection of C57BL/6 mice. **PloS one**, v.8, p. e75138, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075138>

BERGERON, N.; FECTEAU, G.; PARE, J.; MARTINEAU, R.; VILLENEUVE, A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. **The Canadian veterinary journal**, v.41, p. 464-467, 2000.

BINDER, E. M.; LAGAL, V.; KIM, K. The prodomain of *Toxoplasma gondii* GPI-anchored subtilase TgSUB1 mediates its targeting to micronemes. **Traffic**, v.9, p. 1485-1496, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00774.x>

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.70, p. 271-274, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00942230>

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

BOUCHER, L. E.; BOSCH, J. The apicomplexan glideosome and adhesins - Structures and function. **Journal of structural biology**, v.190, p. 93-114, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.02.008>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current opinion in microbiology**, v.10, p. 582-587, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.013>

BRUHN, F. R.; DAHER, D. O.; LOPES, E.; BARBIERI, J. M.; DA ROCHA, C. M.; GUIMARAES, A. M. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. **Tropical animal health and production**, v.45, p. 1093-1098, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0330-y>

BURGER, E.; ARAUJO, A.; LOPEZ-YGLESIAS, A.; RAJALA, M. W.; GENG, L.; LEVINE, B.; HOOPER, L. V.; BURSTEIN, E.; YAROVINSKY, F. Loss of Paneth Cell Autophagy Causes Acute Susceptibility to *Toxoplasma gondii*-Mediated Inflammation. **Cell host & microbe**, v.23, p. 177-190, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.001>

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in parasitology**, v.18, p. 546-552, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)

CARRUTHERS, V. B.; BLACKMAN, M. J. A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. **Molecular microbiology**, v.55, p. 1617-1630, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04483.x>

CAVAILLES, P.; FLORI, P.; PAPAPIETRO, O.; BISANZ, C.; LAGRANGE, D.; PILLOUX, L.; MASSERA, C.; CRISTINELLI, S.; JUBLOT, D.; BASTIEN, O.; LOEUILLLET, C.; ALDEBERT, D.; TOUQUET, B.; FOURNIE, G. J.; CESBRON-DELAUW, M. F. A highly conserved Toxo1 haplotype directs resistance to toxoplasmosis and its associated caspase-1 dependent killing of parasite and host macrophage. **PLoS pathogens**, v.10, p. e1004005, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004005>



CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v.26, p. 253-279, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017045>

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. **Annual review of physiology**, v.75, p. 289-311, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>

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. **Infection and immunity**, v.74, p. 2491-2494, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2491-2494.2006>

CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v.74, p. 130-141, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.11.004>

CORREIA, A.; FERREIRINHA, P.; COSTA, A. A.; DIAS, J.; MELO, J.; COSTA, R.; RIBEIRO, A.; FAUSTINO, A.; TEIXEIRA, L.; ROCHA, A.; VILANOVA, M. Mucosal and systemic T cell response in mice intragastrically infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary research**, v.44, p. 69, 2013. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-69>

CORREIA, A.; FERREIRINHA, P.; BOTELHO, S.; BELINHA, A.; LEITAO, C.; CARAMALHO, I.; TEIXEIRA, L.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A.; APPELBERG, R.; VILANOVA, M. Predominant role of interferon-gamma in the host protective effect of CD8(+) T cells against *Neospora caninum* infection. **Scientific reports**, v.5, p. 14913, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep14913>

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v.38, p.157-159, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.008>

COWPER, B.; MATTHEWS, S.; TOMLEY, F. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. **Molecular and biochemical parasitology**, v.186, p.1-10, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.08.007>

DA CUNHA FILHO, N. A.; LUCAS ADA, S.; PAPPEN, F. G.; RAGOZO, A. M.; GENNARI, S. M.; JUNIOR, T. L.; FARIAS, N. A. Risk factors and prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in urban and rural dogs from Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria**, v.17, p.301-306, 2008.

DA SILVA, M. V.; FERREIRA FRANCA, F. B.; MOTA, C. M.; DE MACEDO JUNIOR, A. G.; RAMOS, E. L.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Dectin-1 Compromises Innate Responses and Host Resistance against *Neospora caninum* Infection. **Frontiers in immunology**, v.8, p.245, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00245>

- DAVOLI-FERREIRA, M.; FONSECA, D. M.; MOTA, C. M.; DIAS, M. S.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DA SILVA, M. V.; QUIRINO, G. F.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S.; MINEO, T. W. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. **Scientific reports**, v.6, p.29289, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep29289>
- DE BARROS, L. D.; MIURA, A. C.; MINUTTI, A. F.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology international**, v.67, p.397-402, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.03.009>
- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International journal for parasitology**, v.29, p.1647-1657, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00154-X)
- DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v.74, p.181-189, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>
- DION, S.; GERMON, S.; GUITON, R.; DUCOURNAU, C.; DIMIER-POISSON, I. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v.41, p.685-695, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.008>
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, p.1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.2, p.230-233, 1990. <https://doi.org/10.1177/104063879000200316>
- DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International journal for parasitology**, v.32, p.929-946, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean journal of parasitology**, v.41, p.1-16, 2003. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary parasitology**, v.126, p.57-72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, v.20, p.323-367, 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Veterinary parasitology**, v.180, p.90-108, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>

EASTICK, F. A.; ELSHEIKHA, H. M. Stress-driven stage transformation of *Neospora caninum*. **Parasitology research**, v.106, p.1009-1014, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1788-z>

ELSHEIKHA, H. M.; MCKINLAY, C. L.; ELSAIED, N. A.; SMITH, P. A. Effects of *Neospora caninum* infection on brain microvascular endothelial cells bioenergetics. **Parasites & vectors**, v.6, p.24, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-24>

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. **Cellular immunology**, v.154, p.287-295, 1994. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1078>

ESTES, D. M.; HIRANO, A.; HEUSSLER, V. T.; DOBBELAERE, D. A.; BROWN, W. C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. **Cellular immunology**, v.163, p.268-279, 1995. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1126>

EVAVOLD, C. L.; KAGAN, J. C. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. **Journal of molecular biology**, v.430, p.217-237, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.019>

EWALD, S. E.; CHAVARRIA-SMITH, J.; BOOTHROYD, J. C. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, v.82, p.460-468, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01170-13>

FENG, X.; ZHANG, N.; TUO, W. *Neospora caninum* tachyzoite- and antigen-stimulated cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells and spleen cells of naive BALB/c mice. **The Journal of parasitology**, v.96, p.717-723, 2010. <https://doi.org/10.1645/GE-1900.1>

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.63, p.1504-1518, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.002>

FERREIRINHA, P.; DIAS, J.; CORREIA, A.; PEREZ-CABEZAS, B.; SANTOS, C.; TEIXEIRA, L.; RIBEIRO, A.; ROCHA, A.; VILANOVA, M. Protective effect of intranasal immunization with *Neospora caninum* membrane antigens against murine

neosporosis established through the gastrointestinal tract. **Immunology**, v.141, p.256-267, 2014. <https://doi.org/10.1111/imm.12191>

FERREIRINHA, P.; CORREIA, A.; TEIXEIRA-COELHO, M.; OSORIO, H.; TEIXEIRA, L.; ROCHA, A.; VILANOVA, M. Mucosal immunization confers long-term protection against intragastrically established *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v.34, p.6250-6258, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.056>

FERREIRINHA, P.; FROIS-MARTINS, R.; TEIXEIRA, L.; ROCHA, A.; VILANOVA, M.; CORREIA, A. Interferon-gamma-dependent protection against *Neospora caninum* infection conferred by mucosal immunization in IL-12/IL-23 p40-deficient mice. **Vaccine**, v.36, p.4890-4896, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.060>

FILHO, P.; OLIVEIRA, J. M. B.; ANDRADE, M. R.; SILVA, J. G.; KIM, P. C. P.; ALMEIDA, J. C.; PORTO, W. J. N.; MOTA, R. A. Incidence and vertical transmission rate of *Neospora caninum* in sheep. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.52, p.19-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.05.006>

FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. **Journal of immunology**, v.140, p.1022-1027, 1988.

GENNARI, S. M.; RODRIGUES, A. A.; VIANA, R. B.; CARDOSO, E. C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. **Veterinary parasitology**, v.134, p.169-171, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.064>

GONDIM, L. F.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O.; JESUS, E. E.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary parasitology**, v.101, p.1-7, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00493-9)

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v.34, p.159-161, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>

GONDIM, L. F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in parasitology**, v.22, p.247-252, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.03.008>

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.13, p.133-150, 2013.

GORFU, G.; CIRELLI, K. M.; MELO, M. B.; MAYER-BARBER, K.; CROWN, D.; KOLLER, B. H.; MASTERS, S.; SHER, A.; LEPPLA, S. H.; MOAYERI, M.; SAEIJ, J. P.; GRIGG, M. E. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine

resistance to *Toxoplasma gondii*. **mBio**, v.5, p.e01117-13, 2014.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.01117-13>

GUEDES, M. H.; GUIMARAES, A. M.; ROCHA, C. M.; HIRSCH, C. [Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of southern Minas Gerais]. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria**, v.17, p.189-194, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612008000400004>

HEMPHILL, A.; GAJENDRAN, N.; SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; JENKINS, M. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. **International journal for parasitology**, v.28, p.429-438, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00193-8)

HEMPHILL, A.; DEBACHE, K.; MONNEY, T.; SCHORER, M.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; MUELLER, N.; MUELLER, J. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in bioscience**, v.5, p. 23-36, 2013. <https://doi.org/10.2741/E593>

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, p.245-259, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001596>

HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International journal for parasitology**, v.29, p.1669-1676, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00102-2)

HORCAJO, P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; AGUADO-MARTINEZ, A.; HEMPHILL, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite immunology**, v.38, p.709-723, 2016.  
<https://doi.org/10.1111/pim.12342>

HOU, B.; BENSON, A.; KUZMICH, L.; DEFRANCO, A. L.; YAROVINSKY, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, p.278-283, 2011.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1011549108>

INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.134, p.1903-1910, 2007.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182007000194>

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v.40, p.945-950, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>

KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A. K.; MOLDAL, T.; BJORKMAN, C.; OLSEN, I. Natural killer cells act as early responders in an experimental

infection with *Neospora caninum* in calves. **International journal for parasitology**, v.37, p.329-339, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.002>

LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cellular microbiology**, v.8, p. 1611-1623,2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>

LEE, A. H.; HONG, J. H.; SEO, Y. S. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma synergistically activate the RANTES promoter through nuclear factor kappaB and interferon regulatory factor 1 (IRF-1) transcription factors. **The Biochemical journal**, v.350, p.131-138, 2000. <https://doi.org/10.1042/bj3500131>

LI, W.; LIU, J.; WANG, J.; FU, Y.; NAN, H.; LIU, Q. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. **Parasitology research**, v.114, p.2893-2902, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4490-3>

LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. **The Journal of parasitology**, v.85, p.550-555, 1999. <https://doi.org/10.2307/3285794>

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L.; MINEO, T. W.; GUTIERREZ, F. R.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature medicine**, v.19, p.909-915, 2013. <https://doi.org/10.1038/nm.3221>

LIMA-JUNIOR, D. S.; MINEO, T. W. P.; CALICH, V. L. G.; ZAMBONI, D. S. Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. **Journal of immunology**, v.199, p.2055-2068, 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700258>

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American journal of veterinary research**, v.50, p.1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of parasitology**, v.76, p.410-413, 1990. <https://doi.org/10.2307/3282676>

LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; COLE, R. A.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. **The Journal of parasitology**, v.81, p.313-315, 1995. <https://doi.org/10.2307/3283943>

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v.82, p.327-333, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00054-0)

LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W.; AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and vaccine immunology**, v.13, p.84-89, 2006.

<https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.84-89.2006>

LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. **The Journal of parasitology**, v.82, p.608-611, 1996.

<https://doi.org/10.2307/3283785>

LONG, M. T.; BASZLER, T. V.; MATHISON, B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **The Journal of parasitology**, v.84, p. 316-320,1998.

<https://doi.org/10.2307/3284489>

MACEDO, C. A. B.; MACEDO, M.; MIURA, A. C.; TARODA, A.; CARDIM, S. T.; INNES, E. A.; KATZER, F.; CANTON, G. J.; CHIANINI, F.; HEADLEY, S. A.; GARCIA, J. L. Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria**, v.26, p.292-298, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017051>

MALEY, S. W.; BUXTON, D.; MACALDOWIE, C. N.; ANDERSON, I. E.; WRIGHT, S. E.; BARTLEY, P. M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; HAMILTON, C. M.; STORSET, A. K.; INNES, E. A. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. **Journal of comparative pathology**, v.135, p.130-141, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.07.001>

MANSILLA, F. C.; CAPOZZO, A. V. Apicomplexan profilins in vaccine development applied to bovine neosporosis. **Experimental parasitology**, v.183, p.64-68, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.009>

MARUGAN-HERNANDEZ, V. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. **Journal of comparative pathology**, v.157, p.193-200, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.08.001>

MASUDA, T.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; OMATA, Y. Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Veterinary parasitology**, v.149, p.130-133, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.037>

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6)

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v.32, p.443-463, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>

MCCANN, C. M.; VYSE, A. J.; SALMON, R. L.; THOMAS, D.; WILLIAMS, D. J.; MCGARRY, J. W.; PEBODY, R.; TREES, A. J. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging infectious diseases**, v.14, p.978-980, 2008. <https://doi.org/10.3201/eid1406.071128>

MCGUIRE, A. M.; MCALLISTER, M. M.; JOLLEY, W. R.; ANDERSON-SPRECHER, R. C. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. **The Journal of parasitology**, v.83, p.647-651, 1997. <https://doi.org/10.2307/3284241>

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

MINEO, T. W.; SILVA, D. A.; COSTA, G. H.; VON ANCKEN, A. C.; KASPER, L. H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary parasitology**, v.98, p.239-245, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00441-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00441-1)

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.; MINEO, J. R.. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.414-417, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000300022>

MINEO, T. W.; ALENIUS, S.; NASLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v.15, p.188-192, 2006.

MINEO, T. W.; BENEVIDES, L.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary research**, v.40, p.32, 2009a. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009015>

MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; MARCIANO, J. A.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary parasitology**, v.159, p.149-153, 2009b. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.024>

MINEO, T. W.; OLIVEIRA, C. J.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and cell biology**, v.88, p.825-833, 2010. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.52>

MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive



birds. **Veterinary parasitology**, v.182, p.352-355, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.022>

MIRANDA, V. D. S.; FRANCA, F. B. F.; DA COSTA, M. S.; SILVA, V. R. S.; MOTA, C. M.; BARROS, P.; PARREIRA, K. S.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. TLR3-TRIF pathway activation by *Neospora caninum* RNA enhances infection control in mice. **Infection and immunity**, 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00739-18>

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental parasitology**, v.140, p.52-70, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.015>

MORE, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BELTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary parasitology**, v.160, p.51-54, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.081>

MORENO, B.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary parasitology**, v.187, p.312-318, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.034>

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology research**, v.100, p.633-636, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0288-7>

MOTA, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; NADIPURAM, S. M.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. *Neospora caninum* Activates p38 MAPK as an Evasion Mechanism against Innate Immunity. **Frontiers in microbiology**, v.7, p.1456, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01456>

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

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary parasitology**, v.116, p.175-184, 2003.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.001>

NISHIKAWA, Y. Towards a preventive strategy for neosporosis: challenges and future perspectives for vaccine development against infection with *Neospora caninum*. **The Journal of veterinary medical science**, v.79, p.1374-1380, 2017.  
<https://doi.org/10.1292/jvms.17-0285>

NOVAIS, F. O.; WONG, A. C.; VILLAREAL, D. O.; BEITING, D. P.; SCOTT, P. CD8(+) T Cells Lack Local Signals To Produce IFN-gamma in the Skin during *Leishmania* Infection. **Journal of immunology**, v.200, p.1737-1745, 2018.

OKAMURA, H.; TSUTSI, H.; KOMATSU, T.; YUTSUDO, M.; HAKURA, A.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; OKURA, T.; NUKADA, Y.; HATTORI, K.; ET AL. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature**, v.378, p.88-91, 1995.

OSHIRO, L. M.; MOTTA-CASTRO, A. R.; FREITAS, S. Z.; CUNHA, R. C.; DITTRICH, R. L.; MEIRELLES, A. C.; ANDREOTTI, R. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p.568-572, 2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0151-2015>

PARTIDA-RODRIGUEZ, O.; SERRANO-VAZQUEZ, A.; NIEVES-RAMIREZ, M. E.; MORAN, P.; ROJAS, L.; PORTILLO, T.; GONZALEZ, E.; HERNANDEZ, E.; FINLAY, B. B.; XIMENEZ, C. Human Intestinal Microbiota: Interaction Between Parasites and the Host Immune Response. **Archives of medical research**, v.48, p.690-700, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.015>

PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JENSEN, L.; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging infectious diseases**, v.5, p.278-280, 1999. <https://doi.org/10.3201/eid0502.990215>

QUINN, H. E.; MILLER, C. M.; ELLIS, J. T. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. **International journal for parasitology**, v.34, p.723-732, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.007>

REGIDOR-CERRILLO, J.; ARRANZ-SOLIS, D.; BENAVIDES, J.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; MEZO, M.; PEREZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; GONZALEZ-WARLETA, M. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Veterinary research**, v.45, p.10, 2014. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-10>

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, L. F.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International journal for parasitology**, v.43, p.133-142, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

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, p.1455-1470, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000158>

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; BLANCO-MURCIA, J.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary research**, v.40, p.49, 2009. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009032>

ROJO-MONTEJO, E.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ-MARCOS, S.; PÉREZ-ZABALLOS, F.; LÓPEZ-PÉREZ, I.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Comparative efficacy of immunization with inactivated whole tachyzoites versus a tachyzoite-bradyzoite mixture against neosporosis in mice. **Veterinary parasitology**, v. 138, p.1372–1383, 2011. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001156>

ROSBOTTOM, A.; GUY, C. S.; GIBNEY, E. H.; SMITH, R. F.; VALARCHER, J. F.; TAYLOR, G.; WILLIAMS, D. J. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite immunology**, v.29, p.219-228, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00936.x>

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, H.; KAISER, P.; HARTLEY, C.; SMITH, R. F.; ROBINSON, R.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS one**, v.6, p.e15799, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015799>

SANCHEZ-SANCHEZ, R.; FERRE, I.; RE, M.; REGIDOR-CERRILLO, J.; BLANCO-MURCIA, J.; FERRER, L. M.; NAVARRO, T.; PIZARRO DIAZ, M.; GONZALEZ-HUECAS, M.; TABANERA, E.; BENAVIDES, J.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of dose and route of administration on the outcome of infection with the virulent *Neospora caninum* isolate Nc-Spain7 in pregnant sheep at mid-gestation. **Veterinary research**, v.49, p.42, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0539-5>

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of immunology**, v.168, p.5997-6001, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.5997>

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v.140, p. 821-832,2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>

SEGOVIA, J. A.; CHANG, T. H.; WINTER, V. T.; COALSON, J. J.; CAGLE, M. P.; PANDRANKI, L.; BOSE, S.; BASEMAN, J. B.; KANNAN, T. R. NLRP3 Is a Critical Regulator of Inflammation and Innate Immune Cell Response during *Mycoplasma pneumoniae* Infection. **Infection and immunity**, v.86, p. e00548, 2018.

SHARMA, P.; CHITNIS, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Current opinion in microbiology**, v.16, p. 432-437, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.004>

SICUPIRA, P. M. L.; DE MAGALHÃES, V. C. S.; GALVÃO, G.; PEREIRA, M. J. S.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Factors associated with infection by *Neospora*

*caninum* in dogs in Brazil. **Veterinary parasitology**, v.185, 305-308, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.029>

SILVA, G. K.; COSTA, R. S.; SILVEIRA, T. N.; CAETANO, B. C.; HORTA, C. V.; GUTIERREZ, F. R.; GUEDES, P. M.; ANDRADE, W. A.; DE NIZ, M.; GAZZINELLI, R. T.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of immunology**, v.191, p.3373-3383, 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203293>

SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental parasitology**, v.123, p.65-72, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.011>

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

STEWART, M. K.; COOKSON, B. T. Evasion and interference: intracellular pathogens modulate caspase-dependent inflammatory responses. **Nature reviews. Microbiology**, v.14, p.346-359, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.50>

STROHBUSCH, M.; MULLER, N.; HEMPHILL, A.; MARGOS, M.; GRANDGIRARD, D.; LEIB, S.; GREIF, G.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. **Parasite immunology**, v.31, p.366-372, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01112.x>

TEIXEIRA, L.; MARQUES, A.; MEIRELES, C. S.; SEABRA, A. R.; RODRIGUES, D.; MADUREIRA, P.; FAUSTINO, A. M.; SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; CORREIA DA COSTA, J. M.; CANADA, N.; VILANOVA, M. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. **Immunology**, v.116, p.38-52, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02195.x>

TEIXEIRA, L.; BOTELHO, A. S.; BATISTA, A. R.; MEIRELES, C. S.; RIBEIRO, A.; DOMINGUES, H. S.; CORREIA DA COSTA, J. M.; CASTRO, A. G.; FAUSTINO, A. M.; VILANOVA, M. Analysis of the immune response to *Neospora caninum* in a model of intragastric infection in mice. **Parasite immunology**, v.29, p.23-36, 2007.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00911.x>

THAISS, C. A.; LEVY, M.; ITAV, S.; ELINAV, E. Integration of Innate Immune Signaling. **Trends in immunology**, v.37, p.84-101, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.12.003>

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.1, p.205-209, 1989.  
<https://doi.org/10.1177/104063878900100301>

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International journal for parasitology**, v.29, p.1195-1200, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00093-4)

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in parasitology**, v.21, p.558-561, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; TAI, W.; XIN, L.; HOGG, A. E.; CORRY, D. B.; SOONG, L. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmanibraziliensis* infection in mice. **Infection and immunity**, v.77, p.2948-2956, 2009. <https://doi.org/10.1128/IAI.00154-09>

VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International immunopharmacology**, v.59, p.391-412, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>

VONLAUFEN, N.; GUETG, N.; NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; VON BLUMROEDER, D.; ELLIS, J.; HEMPHILL, A. In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. **Infection and immunity**, v.72, p.576-583, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.576-583.2004>

WANG, X.; GONG, P.; ZHANG, X.; WANG, J.; TAI, L.; WANG, X.; WEI, Z.; YANG, Y.; YANG, Z.; LI, J.; ZHANG, X. NLRP3 inflammasome activation in murine macrophages caused by *Neospora caninum* infection. **Parasites & vectors**, v.10, p.266, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2197-2>

WANG, X.; GONG, P.; ZHANG, X.; LI, S.; LU, X.; ZHAO, C.; YU, Q.; WEI, Z.; YANG, Y.; LIU, Q.; YANG, Z.; LI, J.; ZHANG, X. NLRP3 Inflammasome Participates in Host Response to *Neospora caninum* Infection. **Frontiers in immunology**, v.9, p.1791, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01791>

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R. F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v.121, p.347-358, 2000. <https://doi.org/10.1017/S0031182099006587>

WILLIAMS, D. J.; HARTLEY, C. S.; BJORKMAN, C.; TREES, A. J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v.136, p.1895-1900, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990588>

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological reviews**, v.265, p.156-171, 2015. <https://doi.org/10.1111/imr.12291>

ZHANG, T.; KAWAKAMI, K.; QURESHI, M. H.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; SAITO, A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. **Infection and immunity**, v.65, p.3594-3599, 1997.

# *Anexo*

---

## 9. ANEXO

Anexo 1: Comprovante de aprovação do Comitê de Ética e Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia.



Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocolo nº 109/16, sob a responsabilidade de **Tiago Wilson Patriarca Mineo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **30 de setembro de 2016**.

(We certify that the project entitled "Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica", protocol 109/16, under the responsibility of Tiago Wilson Patriarca Mineo - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 30th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 31/12/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico e camundongo <i>Knockout</i>
Número de animais	4572
Peso / Idade	20 g / 6-8
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal CBEA - UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 24 de novembro de 2016.

**Prof. Dr. César Augusto Garcia**  
Coordenador da CEUA/UFU