



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3) atua como regulador negativo da
resposta imune frente à infecção por *Neospora caninum***

Vanessa Resende Souza Silva

Uberlândia - MG

Fevereiro-2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3) atua como regulador negativo da resposta imune frente à infecção por *Neospora caninum*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte para obtenção do título de Doutor.

Vanessa Resende Souza Silva

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586
2020 Silva, Vanessa Resende Souza, 1991-
Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3) atua como regulador negativo da resposta imune frente à infecção por *Neospora caninum* [recurso eletrônico] / Vanessa Resende Souza Silva. - 2020.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.139>
Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-, (Orient.).
II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 129 do PPIPA				
Data:	vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte	Hora de início:	14 h 12 min	Hora de encerramento:	18 h 12 min
Matrícula do Discente:	11613IPA008				
Nome do Discente:	Vanessa Resende Souza Silva				
Título do Trabalho:	Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBV) atua como regulador negativo na infecção por <i>Neospora caninum</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos causadores de doenças infecciosas e parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos mecanismos de reconhecimento imunes frente a infecção pelo protozoário <i>Neospora caninum</i>				

Reuniu-se no bloco 2B Sala 2B216 Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, por conferência web e presencialmente, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: A banca examinadora foi composta pelos titulares: Profa. Dra. Angélica de Oliveira Gomes -ICBN/UFTM; Prof. Dr. Álvaro Ferreira Junior - EVZ/UFG - Dr. Murilo Vieira Silva - PROPP/UFU; Prof. Dr. José Roberto Mineo - ICBIM/UFU; Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - ICBIM/UFU - (Orientador) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Sr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a)

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior, em 28/02/2020, às 18:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por Murilo Vieira da Silva, Médico(a) Veterinário(a), em 28/02/2020, às



18:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Mineo, Membro de Comissão**, em 28/02/2020, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Álvaro Ferreira Júnior, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1860033** e o código CRC **0A2B6DDC**.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por ter me dado oportunidades de alcançar meus objetivos, por guiar meus passos,
me dar coragem, persistência e força para superar obstáculos;

Aos meus amados pais Antonio José (*in memoriam*) e Dilma por todo amor incondicional,
exemplo, incentivo, apoio, conselhos, educação, dedicação e confiança;

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

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

Aos meus familiares, que sempre se preocupam comigo e me dão força e carinho para conti-
nuar a conquistar meus sonhos.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4.13

AGRADECIMENTOS

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

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

A Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Santiago pela amizade, incentivo e sugestões dadas.

Aos meus queridos amigos Anderson, Antonielle, Carolina, Cristina, Danielly, Danilo, Eliézer, Flávia, Guilherme, Jacqueline, Júlio, Lívia, Maiara, Mariana, Patrícia, Sara, Sarah Cristina, Tamires e Vanessa Miranda por todo apoio, cuidado e pelos momentos descontraídos que amenizam a saudade de casa.

Aos amigos de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia Caroline, David, Heber, Lucas, Mylla, Murilo e Patrício pela ajuda na realização dos experimentos, pelos conhecimentos compartilhados e pelo ótimo convívio.

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

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

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

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

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa amplamente distribuído pelo mundo, que infecta diferentes espécies mamíferos e aves, dos quais os canídeos atuam como seus hospedeiros definitivos. A infecção possui grande importância econômica por induzir abortos em bovinos e doença neuromuscular em cães. Informações ainda escassas na literatura apontam para papel essencial da resposta imune inata contra *N. caninum*, induzindo uma resposta adaptativa eficaz e consequente controle da infecção. O gene EBI3 codifica uma glicoproteína que participa da formação de duas citocinas heterodiméricas, sendo elas, a IL-35 quando combinada com IL-12p35 e a IL-27 quando combinada com IL-27p28. Estudos prévios relataram que IL-27 pode apresentar funções distintas em infecções por parasitas intracelulares e, considerando a relevância dessa molécula durante a infecção de outros patógenos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relevância do EBI3 durante a infecção por *N. caninum*, utilizando modelos baseados em camundongos geneticamente deficientes. Com base nessas premissas, observou-se que o EBI3 regula negativamente a produção precoce de moléculas efetoras NO e ROS no local da infecção inicial, enquanto induz a redução de citocinas essenciais do perfil Th1 e da produção de IgG total e suas subclasses. Além disso, foi possível observar que camundongos geneticamente deficientes em EBI3 (EBI3^{-/-}) apresentaram maior sobrevivência, recuperação mais rápida do peso corporal e diminuição da carga parasitária na fase crônica associada ao aumento da inflamação no cérebro, se comparado com camundongos do tipo selvagem. Em conclusão, nossos resultados demonstram que o EBI3 é um regulador negativo da resposta imune dirigida contra a infecção por *N. caninum*.

Palavras chave: *Neospora caninum*, EBI3, respostas imunes, citocinas, anticorpos

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan of apicomplexa phylum widespread around the world, that infects several species of mammals and birds and canids act as its definitive host. The infection possess high economic importance due to the induction of abortion in bovine and neuromuscular disease in dogs. Although, the number of information in the literature is limited exit evidence pointing on the essential role of the innate immune response against *N. caninum*, triggering an efficient adaptive response leading to infection control. The EBI3 gene codifies a glycoprotein which participates in two heterodimers formation, which are IL35 when combined with IL12p35 and IL27 when joined with IL27p28. Previous studies reported that IL27 can present distinct functions during infections by intracellular parasites. Considering the importance of this molecule during the infection by other pathogens, this study aimed to evaluate the importance of EBI3 during the infection by *N. caninum* using knockout mice. Following this premise, it was observed that EBI3 regulates negatively the early production of effectors molecules NO and ROS in the local of initial infection meanwhile promote the reduction of cytokines essential to induction of Th1 profile and production of total IgG and its's subclasses. Additionally, it was possible to observe that animals genetically deficient in the production of EBI3 (EBI3^{-/-}) presented an enhanced survival and body weight recovery and a reduced parasite burden during the chronic phase of infection associated with increased inflammation in the brain when compared to wild type mice. In conclusion, our results demonstrated that EBI3 is a negative regulator of the immune response against the infection by *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*, EBI3, immune responses, cytokines, antibodies



Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Parasito e seus hospedeiros.....	12
1.2 Ciclo Biológico e vias de transmissão.....	14
1.3 Patogênese e sinais clínicos.....	16
1.4 Epidemiologia e controle da neosporose.....	17
1.5 Mecanismos da resposta imune induzida por <i>N. caninum</i>	19
1.6 Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3).....	22
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Delineamento experimental.....	30
4.3 Cultivo de células HeLa e parasitos <i>N. caninum</i>	32
4.4 Preparação de antígeno solúvel de <i>N. caninum</i>	32
4.5 Cultura de esplenócitos.....	33
4.6 Determinação da produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	33
4.7 Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	34
4.8 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	34
4.9 Determinação da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR).....	35
4.10 Análise histológica.....	36
4.11 Quantificação de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	36
4.12 Análise estatística.....	37
4.13 Normas de biossegurança.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 EBI3 suprime a indução de mediadores pró-inflamatórios do perfil Th1 durante a infecção por <i>N. caninum</i>	39
5.2 EBI3 reduz a produção de NO e ROS induzida pela infecção por <i>N. caninum</i>	42
5.3 EBI3 inibe a produção de anticorpos IgG anti- <i>N. caninum</i>	42
5.4 EBI3 está diretamente relacionado à susceptibilidade frente <i>N. caninum</i>	46

6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES.....	57
8 REFERÊNCIAS	59
9 ANEXO	74



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Parasito e seus hospedeiros

O protozoário *Neospora caninum*, parasito intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, foi descrito pela primeira vez em 1984 em cães domésticos que apresentavam distúrbios neurológicos e paralisia dos membros posteriores, porém com sorologia negativa para *Toxoplasma gondii* (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Em 1988, Dubey e colaboradores encontraram características básicas que o diferenciava de *T. gondii*, entre elas, cistos teciduais com paredes espessas, paralisia predominante dos membros posteriores em cães, forma de interação com hospedeiros, ciclo de vida e, além da sorologia, testes imunohistoquímicos negativos para *T. gondii*, reconhecendo-o como uma nova espécie (DUBEY, J. P.; CARPENTER; et al., 1988).

N. caninum possui três formas evolutivas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas, sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão da neosporose (Figura 1) (DUBEY, J. P. et al., 2007; DONAHOE et al., 2015). Os taquizoítas possuem forma de meia-lua, com o núcleo na posição central ou terminal e são capazes de invadir e replicar diferentes tipos de células. O parasito consegue, sob pressão fisiológica e do sistema imune, se converter em bradizoítos, os quais possuem multiplicação lenta, apresentam forma alongada, núcleo subterminal e 6 a 12 roptrias. Os bradizoítos são encontrados como cistos teciduais no tecido nervoso e no tecido muscular esquelético de diversos hospedeiros. Por fim, os esporozoítos são alongados, se desenvolvem dentro dos oocistos e são o produto final da fase sexuada do protozoário. Os oocistos infectantes contêm dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (DUBEY et al., 2002; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; KHAN et al., 2019).

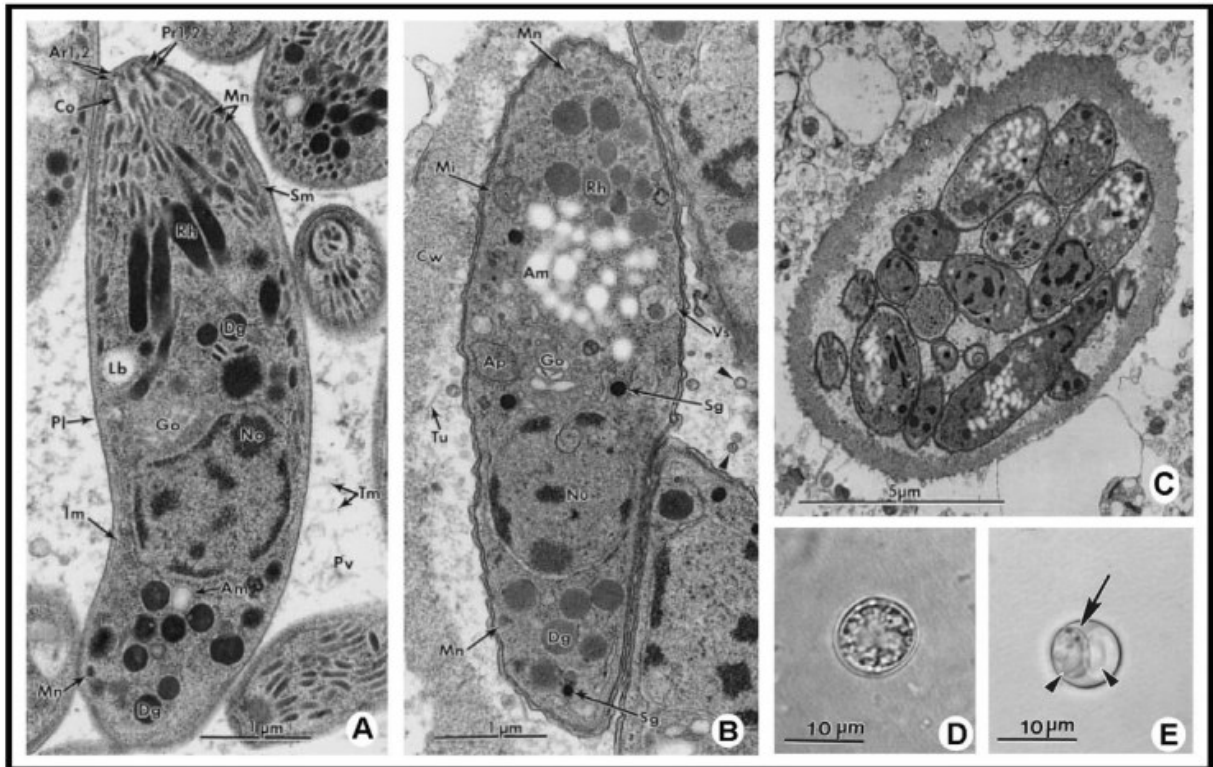


Figura 1: Formas evolutivas de *N. caninum*. (A) Taquizoíta, (B) bradizoíta, (C) cistos teciduais, (D) oocistos não-esporulado, e (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (cabeça da seta).
 Fonte: (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013)

A neosporose possui importância por causar doenças clínicas em cães (LARSON et al., 2004; DUBEY, J. P.; SCHARES, 2011; AROCH et al., 2018; DECÔME et al., 2019). Inicialmente, os cães domésticos foram identificados como hospedeiros definitivos, pois a reprodução sexuada ocorre em seu intestino (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999; PERRUCCI et al., 2017). Posteriormente, devido a infecções experimentais, foi possível classificar outros canídeos exercendo o papel de hospedeiro definitivo, sendo eles, lobos, coiotes e dingos australianos (GONDIM et al., 2004; KLEIN et al., 2019). Adicionalmente, distintas espécies de animais apresentaram sorologia positiva para *N. caninum*, e foram caracterizados como hospedeiros intermediários, entre eles, carneiros, cabras, cavalos, bovinos, macacos, porcos, galinhas e pombos (GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2011; MINEO et al., 2011; DUBEY; ROULIN, 2014; REICHEL et al., 2015; GUI et al., 2020). Em humanos, há evidências sorológicas de exposição ao parasito, apesar de não ter relatos sobre infecção clínica (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999; NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006; McCANN et al., 2008).

1.2 Ciclo Biológico e vias de transmissão

N. caninum caracteriza-se por apresentar ciclo biológico heteroxeno (Figura 2), ou seja, possui suas fases sexuada e assexuada em diferentes hospedeiros. A reprodução sexuada ocorre nos hospedeiros definitivos representados pelos canídeos e a reprodução assexuada ocorre em vários hospedeiros intermediários, tais como, gatos, porcos, carneiros, bovinos e aves (DUBEY et al., 2011; EIRAS et al., 2011; GUI et al., 2020).

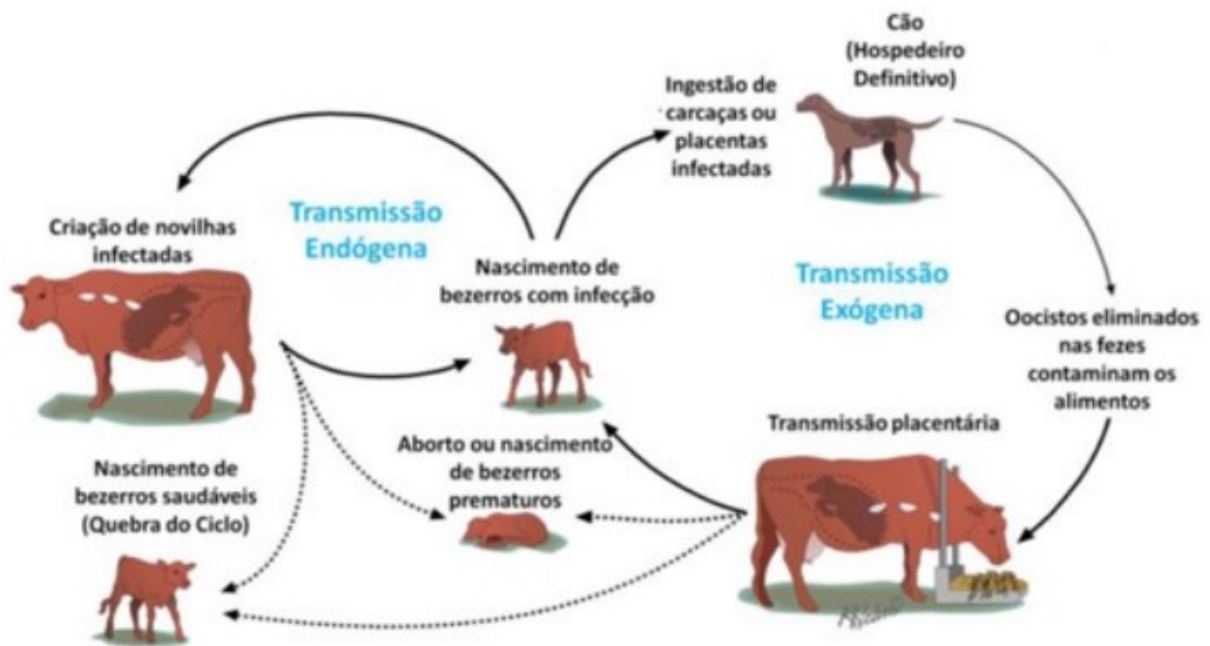


Figura 2: Ciclo Biológico de *N. caninum*. Adaptado de McAllister (2016).

A fase sexuada do ciclo da neosporose inicia-se com a ingestão de cistos, presentes em tecidos de presas, por um hospedeiro definitivo. Após a ingestão, os bradizoítos são liberados e invadem enterócitos. A partir desse momento, ocorre a esquizogonia com formação de esquizontes e liberação de merozoítas. Em seguida, inicia-se a gamogonia com produção final de oocistos não esporulados com subsequente eliminação pelas fezes dos canídeos (TENTER et al., 2000; MONNEY e HEMPHILL, 2014). Os oocistos eliminados são imaturos e precisam de condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade para que ocorra a esporogonia, levando ao desenvolvimento dos oocistos, o qual contém dois esporocistos sendo que cada um contém quatro esporozoítos (DUBEY, 2003; KUL et al., 2015).

A fase assexuada de replicação do parasito durante a transmissão horizontal inicia-se quando hospedeiros intermediários ingerem oocistos esporulados, presentes em água ou ali-

mentos contaminados. Os oocistos passam por digestão químico-enzimática no estômago e duodeno e liberam esporozoítos, os quais invadem o epitélio intestinal e transformam-se em taquizoítos. Estes, por sua vez, são responsáveis por invadir células hospedeiras e modular a resposta imune para sua sobrevivência e multiplicação por endodiogenia. Durante esse processo, são liberadas proteínas parasitárias de organelas como micronemas, roptrias e grânulos densos que auxiliam o processo de fixação, penetração e formação do vacúolo parasitóforo (BARR et al., 1994; DUBEY, J. P., 2003; GOODSWEN et al., 2013; LI et al., 2015). Resumidamente, os parasitos aderem às células do hospedeiro por ação de proteínas de superfície imunodominantes (NcSAG1 e NcSRS2). Logo após, a proeminência apical do parasito entra em contato com a superfície celular ocasionando uma invaginação na membrana e secreção de proteínas de micronemas, que formam uma junção irreversível. Neste momento, as membranas plasmáticas do parasito e do hospedeiro se fundem para formar o vacúolo parasitóforo em torno do taquizoíto. Devido a sua composição, o vacúolo parasitóforo não se funde com lisossomos. Em seguida, há liberação de proteínas de roptrias que facilitam a associação da membrana do vacúolo com organelas celulares do hospedeiro. Por fim, o ambiente no vacúolo é modificado por proteínas de grânulos densos que possibilitam a maturação do vacúolo e sobrevivência do parasito. Em poucas horas após a infecção, os parasitos se multiplicam por endodiogenia e propiciam a lise da célula hospedeira com liberação dos taquizoítas (HEMPHILL et al., 1998; McALLISTER; DUBEY, 2002; NAGULESWARAN et al., 2003; BRADLEY; SIBLEY, 2007).

Os taquizoítas invadem células nucleadas por todo o organismo, tais como, macrófagos, células neurais, células musculares, hepatócitos e causam uma forte resposta inflamatória responsável pelas manifestações clínicas da doença. Devido a pressão fisiológica e a resposta imune, ocorre a transformação de taquizoítos em bradizoítos dando início a outra fase do desenvolvimento assexuado (BARR et al., 1993; TENTER et al., 2000; DUBEY et al., 2002). Os bradizoítas se multiplicam lentamente por endodiogenia e formam cistos teciduais, principalmente em tecidos neurais e musculares, caracterizando formas de latência do parasito que podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem causar sintomas clínicos, embora possa ocorrer uma baixa taxa de reativação espontânea (DUBEY, J. P. et al., 1992; McALLISTER, 2016). Cistos teciduais podem ser ingeridos por vários hospedeiros definitivos, repetindo-se o ciclo.

Além da transmissão horizontal, também pode ocorrer a transmissão transplacentária, a qual foi demonstrada em bovinos e em cães infectados experimentalmente (DUBEY et al., 1992; TAQUES et al., 2016). O parasito é transmitido da mãe para o feto via placenta, considerada a principal rota de transmissão em bovinos, podendo ocorrer por diversas gerações

(LINDSAY et al., 1999; REGIDOR-CERRILLO et al., 2015). Duas formas de transmissão vertical são conhecidas: a infecção transplacentária endógena e infecção transplacentária exógena. A primeira é caracterizada pela reativação da infecção materna durante a gestação e subsequente infecção fetal. Já a infecção transplacentária exógena a qual ocorre como resultado da ingestão de oocistos durante a gestação transmitindo a infecção para o feto (LINDSAY et al., 1999; REICHEL et al., 2014; DONAHOE et al., 2015; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

1.3 Patogênese e sinais clínicos

A invasão e a lise celular, mecanismos extremamente bem sucedidos em protozoários do filo Apicomplexa, são os principais eventos responsáveis pela patogênese da neosporose. A rápida multiplicação intracelular de taquizoítos de *N. caninum* permite sua disseminação pelo organismo, o que pode causar morte celular com consequentes lesões necróticas. (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; LI et al., 2015). *N. caninum* provoca doença clínica importante em cães e bovinos, apesar da ampla variedade de espécies acometidas pelo parasito (DUBEY, J. P., 2003). Alguns fatores são responsáveis pelas manifestações clínicas da neosporose, entre eles, o local do encistamento do parasito, sendo o cérebro um dos órgãos mais afetado (DUBEY et al., 2004; ELSHEIKHA et al., 2013).

A neosporose canina é reconhecida, principalmente, por causar doença neuromuscular em cães. A infecção causa encefalite, polimiosite podendo progredir para a paralisia, sendo a paralisia dos membros posteriores o sinal mais consistente da neosporose neonatal (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002; DUBEY e SCHARES, 2011). Outros sinais clínicos que podem aparecer são paralisia da mandíbula e de nervos faciais, dificuldade de deglutição, atrofia muscular, alterações oculares, convulsões e falência cardíaca (REICHEL; ELLIS, 2009; DONAHOE et al., 2015; MANN et al., 2016). Também pode ocorrer manifestação sub-clínica persistente sendo que, nesses casos, há uma reativação da infecção durante processos de imunossupressão ou gestação, que por sua vez resulta em transmissão placentária para o feto (DUBEY et al., 2002; TAQUES et al., 2016).

N. caninum é considerado um dos parasitos que mais causa falhas reprodutivas em bovinos em todo o mundo (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; COSTA et al., 2012; CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017). Há evidências de que ativação de resposta imune do tipo Th1 pelo parasito na interface materno-fetal prejudique a gestação, além de ocasionar danos na placenta que interrompem o fornecimento de nutrientes (DUBEY et al., 1992; WILLIAMS et

al., 2000; INNES et al., 2005). Sabe-se que vacas soropositivas possuem maior probabilidade de abortar do que vacas soronegativas, o que sugere a reativação da infecção (LINDSAY; DUBEY, 2020). Casos de reabsorção ou mumificação ocorre nos primeiros meses de gestação, já o aborto é mais comum entre o 5º e 7º mês de gestação (DUBEY; LINDSAY, 1993). Em casos de infecção no terceiro trimestre de gestação, bezerros cronicamente infectados podem nascer saudáveis ou apresentarem sinais clínicos como ataxia, paralisia de membros posteriores, diminuição de reflexos patelares, assimetria nos olhos e perda de consciência (DUBEY, 2003; INNES et al., 2005; WILLIAMS et al., 2007; DONAHOE et al., 2015; LINDSAY; DUBEY, 2020). Ocasionalmente, animais infectados com *N. caninum* apresentam defeitos congênitos como hidrocefalia e estreitamento da medula espinhal (LINDSAY; DUBEY, 2020). Em bovinos adultos, a perda de peso é o sinal clínico mais evidente, principalmente, em bovinos de corte (BARLING et al., 2000).

1.4 Epidemiologia e controle da neosporose

A neosporose possui ampla distribuição mundial, com relatos de sua presença em vários países como Estados Unidos, Canadá, Costa Rica, África do Sul, Austrália, Brasil, Japão, Suíça entre outros (ANVARI et al., 2020). No Brasil, encontra-se distribuído em vários estados, sendo relatada a ocorrência do parasito ou soropositividade ao parasito em caninos, bovinos, ovinos e aves (CERQUEIRA-CÉZAR et. al, 2017).

Os canídeos são os hospedeiros definitivos de *N. caninum* e possuem grande importância epidemiológica, pois liberam oocistos no meio ambiente. A soroprevalência global de *N. caninum* em cães, de acordo com Anvari e colaboradores (2020) foi de 17,14% entre 1990 e 2018. A prevalência foi demonstrada por região, sendo que as Américas possuem uma prevalência de 15,15%, África de 26,59%, Europa de 17,94%, Mediterrâneo 23,31%, Sul da Ásia 7,70% e Pacífico 18,52% (BRYCE et al., 2005). Cães domésticos são potenciais transmissores da neosporose para bovinos por serem utilizados como ferramentas na criação de gado. Porém, alguns estudos indicam que canídeos selvagens, como lobos, raposas e coiotes, habitam as áreas de pastagens e atuam como transmissores da neosporose para bovinos de corte e de leite (KING et al., 2010; ALMERIA, 2013). Além disso, estudos demonstram que cães de áreas rurais possuem maior prevalência da neosporose (20 a 97%) do que cães de área urbana (7 a 26%), provavelmente devido a exposição desses cães com carcaças, anexos placentários e fetos abortados

infectados com *N. caninum* (FERNANDES et al., 2004; MINEO et al., 2004; KING et al., 2012; CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).

N. caninum possui grande importância na agropecuária, principalmente na criação de bovinos, devido à queda na produção de leite e de carne de animais infectados (DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL et al., 2013). A queda na produção de leite está relacionada com abortos, morte fetal, reabsorção fetal, retorno de cio e aumento do intervalo entre partos (TREES et al., 1999). Estima-se uma perda econômica mundial de até 2,4 bilhões de dólares por ano em decorrência de abortos provocados por *N. caninum* (REICHEL et al., 2014). No Brasil a soroprevalência da neosporose varia entre 2,5 a 14,9% em bovinos de corte e de 14,1 a 34,8% em bovinos de leite com alta expressividade no estado Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CORBELLINI et al., 2006; GUEDES et al., 2008; BRUHN et al., 2013; REICHEL et al., 2013; CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017; MACEDO et al., 2017). Um dos obstáculos para o controle da neosporose é que o fato das infecções serem perenes, ou seja, pode haver reagudização da infecção. Estima-se que 95% dos fetos infectados são de gestações em que as vacas eram previamente positivas para *N. caninum* (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; REICHEL et al., 2014).

Vários fatores influenciam na prevalência da neosporose, entre eles estão o número de gestações, presença de cães na fazenda, idade do gado, número de oocistos ingeridos, etapa da gestação em que contraiu a doença e resposta imunológica (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). A prevenção da neosporose é o melhor meio de contenção da doença. Algumas medidas podem ser tomadas para evitar a transmissão do parasito. Em relação aos bovinos, é importante restringir o acesso de cães nas proximidades do rebanho para evitar a contaminação ambiental por oocistos presentes nas fezes desses animais, sacrificar animais infectados, selecionar animais soronegativos para a substituição de animais infectados, manter a biossegurança ideal e um bom manejo para evitar estresse, o qual pode favorecer a imunossupressão (WILLIAMS; TREES, 2006; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017; LINDSAY; DUBEY, 2020). Também, faz-se necessário a investigação sorológica de novilhas com potencial reprodutor e a utilização de transferência de embriões de uma fêmea soropositiva a receptoras soronegativas para diminuir a ocorrência de transmissão vertical (BAILLARGEON et al., 2001; LANDMANN et al., 2002; REICHEL et al., 2014; HORCAJO et al., 2016). Em relação aos cães, é necessário evitar a reprodução de cadelas soropositivas, eliminar a alimentação dos cães com carne ou vísceras cruas e impedir o contato com rebanho bovino (REICHEL et al., 2014).

Além da prevenção, outras estratégias já foram testadas para o controle da neosporose como o tratamento com parasiticida e vacinação (REICHEL; ELLIS, 2009; HEMPHILL; AGUADO-MARTINEZ; MULLER, 2016; MANSILLA; CAPOZZO, 2017). O tratamento com coccidiostático toltrazuril retarda a propagação de taquizoítas, porém precisa da participação das células T do hospedeiro para controlar a infecção (SYED-HUSSAIN et al., 2015). E, a única vacina comercial inativada, a Bolivis Neoguard™ (Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) foi retirada do mercado por baixa eficácia (WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012). Atualmente, a melhor opção de controle é desenvolver uma vacina que previna o aborto e a transmissão transplacentária (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).

Devido à grande importância econômica da neosporose e estratégias terapêuticas mal sucedidas, trabalhos têm sido desenvolvidos para prevenir e tratar a neosporose. Esses estudos englobam vacinas com o parasito inativado (ROJO-MONTEJO et al., 2009), uso de subunidades nativas (MOORE et al., 2011; MANSILLA et al., 2012), antígenos de *N. caninum* recombinantes (HEMPHILL et al., 2013; UCHIDA et al., 2013) e vacinas utilizando o parasito vivo (ROJO-MONTEJO et al., 2009; WEBER et al., 2013). No entanto, nenhum desses produtos foi liberado. Assim, as vacinas de nova geração, as quais utilizam proteínas recombinantes, DNA ou vacinas vetorizadas, tornaram-se a principal linha de pesquisa em desenvolvimento por serem fáceis de fabricar e seguras. Essas vacinas experimentais são projetadas para bloquear processos específicos e ativar uma resposta imunológica direcionada que impeça a proliferação de parasitos. O principal obstáculo é a pré-seleção de candidatos que confirmam proteção imunológica. Os candidatos mais estudados foram proteínas envolvidas no ciclo lítico, na adesão/invasão de células hospedeiras, na formação de vacúolos parasitóforos, proteínas de superfície, proteínas secretadas por micronemas, roptrias e grânulos densos. Além disso, para que sejam eficazes, é necessário a combinação com adjuvantes que intensifiquem a resposta imune como, por exemplo, a fusão com ligantes do receptor TLR (HEMPHILL et al., 2016; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).

1.5 Mecanismos da resposta imune induzida por *N. caninum*

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório, portanto, os mecanismos protetores contra o parasito envolvem tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. A resposta imune é semelhante a de outros parasitos intracelulares, em que a imunidade mediada por células é fundamental para a redução da replicação de *N. caninum* (INNES et al., 2002; HEMPHILL,

AGUADO-MARTÍNEZ E MÜLLER, 2016). De acordo com estudos in vivo e in vitro, as respostas imunes protetoras contra a infecção por *N. caninum* são tipicamente dependentes de um perfil Th1, mediado pela produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 e interferon- γ (IFN- γ) (DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015).

A primeira linha de defesa do hospedeiro são as junções intercelulares que fazem uma barreira física para impedir a entrada do parasito. Os enterócitos, ao serem infectados, secretam moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO) e citocinas como a IL-15 que ativam células natural killer (NK) a produzirem interferon- γ (IFN- γ) e quimiocinas que recrutam polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas (DONAHOE et al., 2015; BARROS et al., 2019). Essas células atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que identificam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do parasito e desencadeiam uma resposta pró-inflamatória (MINEO et al., 2010; THAISS et al., 2016; MANSILLA CAPOZZO, 2017).

Os PRRs desempenham um importante papel na ativação do sistema imune durante a infecção por *N. caninum*, sendo os receptores do tipo Toll os mais descritos na literatura (VIJAY, 2018). TLRs ativam moléculas adaptadoras, principalmente MyD88, que por sua vez induz a transcrição de fatores e via de sinalização, como NF- κ B e MAPK respectivamente, os quais são responsáveis por estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-12 e IFN- γ (MINEO et al., 2009b). Já foi demonstrado em estudos com camundongos geneticamente deficientes em TLR2 que há uma queda na produção de IL-12 e IFN- γ e, conseqüentemente, um aumento da mortalidade de animais infectados com *N. caninum*. Portanto, ocorre uma polarização da resposta imune para o perfil Th1 via TLR2 (MINEO et al., 2010). Também, foi observado que a produção de interferon do tipo I (IFN- α e IFN- β) é importante para estimular a resposta imune do hospedeiro e inibir a replicação parasitária. O estímulo dessa citocina ocorre por reconhecimento do RNA do parasito via TLR3, a qual é dependente da molécula adaptadora TRIF que, por sua vez, ativa fatores regulatórios de interferon (IRFs) (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019; MOTA et al., 2019).

Outros receptores também são importantes para a ativação da resposta imune inata, sendo eles, receptores semelhantes a NOD (NLRs) localizados no citoplasma. Os principais receptores NLRs que atuam durante a infecção por *N. caninum* são NOD-2 e NLRP3 (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015; DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). A via ativada por NOD-2 auxilia no controle parasitário de *N. caninum*, mas pode gerar uma intensa resposta inflamatória que pode auxiliar na patogênese e até morte do hospedeiro. Já o receptor NLR3, participa da via

do inflamassoma, que é um complexo multimérico de proteínas montado a partir da detecção de componentes microbianos ou por estresse, induzindo uma resposta inflamatória com produção de IFN- γ através da clivagem de pró-IL1- β e pró-IL-18 em citocinas biologicamente ativas, limitando, assim, o crescimento parasitário (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016; WANG et al., 2018).

Além dos altos níveis de IL-12 estimular a diferenciação de células T CD4⁺ em subpopulações Th1 produtoras de citocinas pró-inflamatórias, esta citocina estimula a ativação de células NK e células TCD8⁺ que lisam células infectadas com formas taquizoítas e secretam altos níveis de IFN- γ , ativando por sua vez macrófagos que eliminam as células infectadas através de mecanismos mediados por intermediários reativos de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio, que bloqueiam o metabolismo do parasito, impedindo a sua sobrevivência (MINEO et al., 2010; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011; MURRAY; WYNN, 2011; HEMPHILL, 2016; BARROS et al., 2019).

Durante a infecção por *N. caninum*, é importante que haja um balanço entre as respostas dos tipos Th1, Th2 e Treg para que, desse modo, não cause lesões teciduais exacerbadas (AGUADO-MARTINEZ et al., 2016). Células do tipo Th2 podem liberar citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-6, e células T reg liberam as citocinas IL-10 e TGF- β . Essas citocinas promovem um balanço com a produção de citocinas Th1 e ajudam a alcançar a homeostasia do hospedeiro (ALMERIA et al., 2014; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014).

A resposta imune humoral também possui um papel importante na infecção por *N. caninum* (TEIXEIRA et al., 2005; ALMERIA; SERRANO-PEREZ; LOPEZ-GATIUS, 2017). A ativação de células B por citocinas como IFN- γ e IL-4 auxiliam na produção e mudança de isotipos de anticorpos. Estes, por sua vez, são capazes de neutralizar, opsonizar e ativar o complemento com a função de limitar a replicação de formas taquizoítas de *N. caninum* (BARTLEY et al., 2013; AGUADO-MARTINEZ et al., 2016). Em estudos com camundongos, foi possível observar que a resposta imune do tipo Th1 com a produção de IFN- γ induz a síntese de anticorpos da subclasse IgG2, enquanto que a resposta imune do tipo Th2 com a secreção de IL-4 favorece a produção de anticorpos da subclasse IgG1 (ROJO-MONTEJO et al., 2009). O balanço entre Th1/Th2 é necessário para limitar a infecção e gerar homeostasia.

1.6 Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3)

Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3) foi identificado pela primeira vez em 1996, a partir da indução de sua expressão em linfócitos B infectados pelo vírus Epstein-Barr (DEVERGNE et al., 1996). A proteína codificada por esse gene é uma glicoproteína secretada, a qual faz parte da família de hematopoietina associada à subunidade p40 da IL-12. Essa proteína pode formar citocinas heterodiméricas, a qual quando combinada com IL-12p35 forma IL-35 e quando combinada com IL-27p28 forma a IL-27. Tanto IL-35 quanto IL-27 pertencem à família de citocinas IL-6/IL-12 e carecem de ligação dissulfeto, sendo portanto, menos estáveis e secretadas em menor quantidade do que os membros da família ligados a dissulfeto, como IL-12 e IL-23 (WIRTZ et al., 2005; COLLISON et al., 2007; KUCHROO, 2012; VIGNALI, 2012; FUJITA, 2013;).

A IL-35 é um heterodímero de cerca de 75 kDa descoberto em 1997 (DEVERGNE et al., 1997). Porém, apenas em 2007 foi revelado sua função e relevância fisiológica, a qual apresenta semelhanças à estrutura de IL-12, IL-23 e IL-27. A IL-35 pode ser produzida por células T reguladoras, células B e células TCD8⁺ e sinaliza por via dos receptores gp130 e 12Rβ2 (COLLISON et al., 2007; COLLISON; VIGNALI, 2012). Possui propriedades anti-inflamatórias, com o mecanismo predominante de suprimir a proliferação de células T e converter células T nãives em células T produtoras de IL-10 (PFLANZ et al., 2002; COLLISON et al., 2012; JENSEN et al., 2017).

IL-27p28 foi eventualmente reconhecido no final dos anos 90 através de uma abordagem computacional para identificar novas citocinas da família IL-6 (PFLANZ et al., 2002). É produzida por uma variedade de células, como macrófagos e células dendríticas, em resposta a ligantes de TLRs e citocinas pró-inflamatórias e sinaliza via receptor de IL-27, o qual é composto por IL27Rα e gp130 (PFLANZ et al., 2004; KALLIOLIAS; GORGON; IVASHKIV, 2010; MASCANFRONI et al., 2013). Esses receptores estão presentes, principalmente, em linfócitos T CD4⁺ nãives e células dendríticas, mas podem ser encontrados em células B e mielóides. A IL-27 possui efeitos tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios. Promove a expressão de citocinas IL-10 e IFN-γ, limita a produção de IL-17 por células TCD4⁺ e células NK. Em mastócitos e eosinófilos, a IL-27 pode promover respostas pró-inflamatórias, aumentando a expressão de IL-1, TNF-α e IL-6, já em neutrófilos, a IL-27 limita a secreção de citocinas IL-6 e IL-12p40 (VILLARINO; HUANG; HUNTER, 2004; POT et al., 2011)

Estudos mostram que a IL-27 previne a resposta inflamatória induzida por Th1, Th2 ou Th17. A IL-27 pode inibir diretamente os fatores de transcrição GATA3 e ROR γ T, suprimindo assim os linfócitos Th2 e Th17 (LUCAS; GUILARDI; SAUVAGE, 2003; HUNTER; KASTELLEIN, 2012). Também induz a polarização para células Tr1 e é capaz de induzir a sinalização de STAT 1 e STAT3, que eventualmente leva ao aumento da secreção de IL-10, cujo efeito promove a supressão de células efectoras (POT et al., 2009; HALL et al., 2012) Além disso, antagoniza a produção de IL-12, necessária para manutenção do perfil Th1 e induz a expressão da molécula PD-L1 (HIRAHARA et al., 2012). Em relação às células dendríticas, sabe-se que a IL-27 estimula a expressão da molécula CD39, desse modo, promove a conversão de ATP em metabólitos ADP ou AMP. Esses metabólitos inibem a inflamação por inibição da produção de IL-1 β (MASCANFRONI et al., 2013). Além disso, as células B ativadas são induzidas por IL-27 a expressar T-bet, assim ocorre a troca de isotipo para IgG2a (TAKEDA et. al., 2003).

Embora não haja relatos sobre as especificidades envolvendo EB13 na infecção por *Neospora caninum* em camundongos, já foram realizados estudos com protozoários, tais como, *Trypanossoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Toxoplasma gondii* (QUIRINO et al., 2016; MEDINA et al., 2017; PARK et al., 2019) . Medina e colaboradores, usando camundongos IL27 $R\alpha^{-/-}$ demonstraram que a IL-27 suprime a atividade das células Th1 e a produção de IFN- γ , reduzindo os danos durante a infecção por *Trypanossoma cruzi*. Já em estudos com *Leishmania infantum*, observou-se que a IL-27 é uma citocina reguladora que impulsiona a suscetibilidade do hospedeiro para a infecção (QUIRINO et al., 2016). Parque e colaboradores (2019) demonstraram que a IL-27p28 pode atuar como regular negativo das respostas imunes humoral e celular durante a toxoplasmose. Nesse estudo, os pesquisadores compararam as respostas de camundongos transgênicos e geneticamente deficientes em IL27p28 durante a infecção por *T. gondii* e observaram que tanto a superexpressão como a deficiência em IL-27p28 resultam em maior suscetibilidade ao parasito com redução da população de células T efectoras, inibição dos títulos de anticorpos específicos e falha no controle da replicação do parasita no sistema nervoso central.



Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A neosporose é uma doença que apresenta grande importância econômica, principalmente na bovinocultura, por gerar perdas econômicas relacionadas à reprodução. Esta doença tem requerido atenção especial de produtores e médicos veterinários por causar abortos, queda na produção de leite de animais soropositivos, infertilidade associada à mortalidade fetal e reabsorção, repetição de cio, gastos com reposição de animais e assistência veterinária (REICHEL et al., 2013). Além disso, causa vários sinais clínicos em cães (DUBEY; SCHARES, 2011). Devido à grande importância da neosporose, cada vez mais há pesquisas direcionadas para entender o mecanismo, o controle, a prevenção e o tratamento dessa infecção.

Vários estudos com modelos murinos, inclusive com camundongos geneticamente deficientes, vem sendo utilizados para compreender a resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *N. caninum*. Sabe-se que a resposta do tipo Th1 com o envolvimento da proteína adaptadora MyD88 e consequente produção de IFN- γ é essencial para o controle da replicação parasitária. Outros fatores envolvidos na proteção do hospedeiro também já foram elucidados, como complexo inflamassoma e participação de citocina IFN tipo I (MINEO et al., 2010; MIRANDA et al., 2019). Neste sentido, pesquisas relacionadas com outros mediadores inflamatórios e anti-inflamatório são importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Desse modo, observando que a resposta imune contra *N. caninum* é predominante do tipo Th1, que há falta de estudos que abordem o papel de EBI3 durante a infecção e observado a importância do mesmo em infecções por protozoários intracelulares, principalmente como supressor na imunopatogênese de diversas doenças inflamatórias, EBI3 faz-se um excelente alvo para estudo (QUIRINO et al., 2016; MEDINA et al., 2017; PARK et al., 2019); LINDSAY; DUBEY, 2020).

Nesse sentido, considerando a necessidade de melhor compreender a participação de citocinas durante a infecção por *N. caninum* e visto importância cada vez mais reconhecida de EBI3 na interação parasito-hospedeiro e na modulação da resposta imune do hospedeiro frente a inúmeros patógenos, este trabalho é proposto com a finalidade de avaliar as respostas imunes celulares e humorais para melhor compreender os mecanismos imunológicos desencadeados pelo protozoário *N. caninum*, com a intenção de se desenvolver medidas profiláticas que auxiliem no controle da infecção causada por este protozoário e de seus efeitos deletérios a bovinocultura.

Com isso, seria possível o desenvolvimento de métodos preventivos e terapêuticos eficazes contra a neosporose, visando aumentar os escores reprodutivos na criação destes ruminantes e induzindo, por consequência, melhorias de rendimento e competitividade externa neste importante setor da economia nacional.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do Gene 3 induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBI3) durante a infecção experimental de camundongos pelo protozoário *Neospora caninum*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel de EBI3 na produção *in vivo* e *in vitro* de citocinas durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*;
- Verificar a relevância de EBI3 na produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*;
- Analisar a carga parasitária de animais WT e EBI3^{-/-} na fase aguda e crônica da infecção por *N. caninum*;
- Avaliar a inflamação tecidual durante as fases aguda e crônica da infecção por *N. caninum*;
- Avaliar o papel de EBI3 na sobrevivência e morbidade de camundongos frente à infecção;
- Quantificar a produção de anticorpos séricos antígeno-específicos das classes IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a em camundongos do tipo selvagem e geneticamente deficiente em EBI3 infectados experimentalmente.



Materiais e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes em EBI3 (EBI3^{-/-}), com seis a oito semanas de idade, foram obtidos e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2°C), sem restrição de água e alimento. Todos os procedimentos seguiram as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob o protocolo de número 109/16 (ANEXO 1).

4.2 Delineamento experimental

Com o objetivo de avaliar a importância de EBI3 na resistência do hospedeiro, foram realizadas análises das fases aguda e crônica da infecção. Para tanto, animais WT e EBI3^{-/-} (5 camundongos / grupo) foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com a dose sub-letal de 5x10⁶ taquizoítos de *N. caninum* (isolado NcLiv). Também foram coletadas as mesmas amostras de animais não infectados WT e EBI3^{-/-}, as quais serviram como controle de cada experimento. Foram coletadas amostras de soro, lavado peritoneal, células do lavado peritoneal e cérebro em diferentes tempos de acordo com o padrão de migração temporal do parasito (figura 3A e 3B), conforme previamente descrito por Collantes-Fernandez e colaboradores (2006). Além disso, foi realizado o desafio de camundongos WT e EBI3^{-/-}, no qual foram infectados via i.p. com dose de 1x10⁷ taquizoítos de *N. caninum* para a ensaio de morbidade e mortalidade (figura 3C).

A fase aguda da infecção foi analisada por quantificação de citocinas, dosagem de NO, dosagem de ROS e análise da carga parasitária após 1 e 3 dias de infecção. A quantificação de citocinas (IFN- γ e IL12p40) em soro e lavado peritoneal foi realizada utilizando ensaio imunoenzimático ELISA de captura. O NO foi dosado por kit comercial em amostras de lavado peritoneal. Já para a dosagem de ROS utilizou-se sonda de marcação para células do lavado peritoneal. Também foi realizada a análise da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR) em células do lavado peritoneal. Adicionalmente, foi realizado o ensaio *in vitro* de esplenócito para quantificação de IFN- γ após 72 horas de infecção.

Já a fase crônica da infecção foi analisada por quantificação da carga parasitária por qPCR, bem como, por análise histológica por hematoxilina e eosina de tecido cerebral após 30 dias de infecção. A produção cinética de imunoglobulinas específicas foi avaliada em amostras sorológicas por método imunoenzimático ELISA indireto (IgG total, IgG1 e IgG2a).

Por fim, foi realizado o desafio de camundongos WT e EBI3^{-/-}, no qual foram infectados via i.p. com dose de 1x10⁷ taquizoítos de *N. caninum*. Após a inoculação, esses animais foram acompanhados diariamente por sinais clínicos, como morbidade (alteração no peso corporal) e mortalidade durante 30 dias.

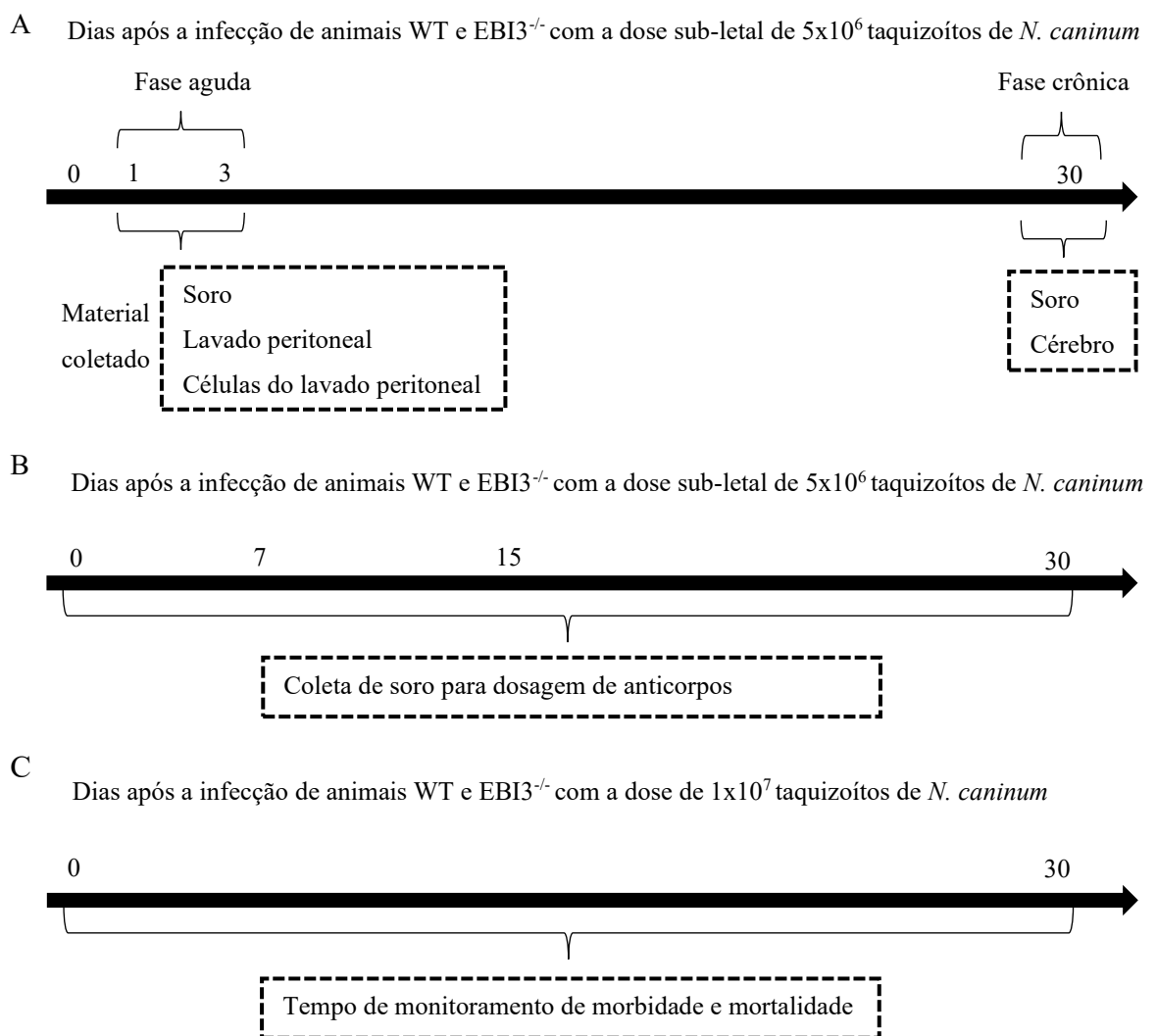


Figura 3: Tempos de coleta de material para a realização dos experimentos. Animais WT e EBI3^{-/-} foram infectados com 5x10⁶ taquizoítos de *N.caninum* para coleta de material para análise da fase aguda e crônica da infecção (A) e para a coleta de soro para dosagem de anticorpos (B). Animais WT e EBI3^{-/-} foram infectados com 1x10⁷ taquizoítos de *N.caninum* para análise de morbidade e mortalidade (C).

4.3 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 com meio RPMI 1640 (Life Technologies Corporatin, Carlsbad, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 100 U/mL de penicilina (Gibco), em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C até atingirem a confluência (Dubey et al., 1988).

Posteriormente, as células foram desaderidas com EDTA 0,1mM e o sobrenadante foi centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuscitado em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e utilizado para o inóculo de novas garrafas de células HeLa, as quais foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* do isolado Nc-Liv (BARBER et al., 1995) e mantidas em passagens regulares (48-72 horas) nas mesmas condições anteriormente descritas para células, exceto pela adição de SFB.

Em seguida, o sobrenadante contendo os parasitos livres foi coletado e centrifugado a 800 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 sem adição de SFB e contados em câmara hemocitométrica (Neubauer) com a adição de Azul de Tripan 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para a identificação dos parasitos viáveis a serem utilizados em experimentos *in vivo* ou *in vitro*. Os parasitos restantes foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2) a 800 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento parasitário foi armazenado a -20 °C até a preparação do antígeno solúvel de *N. caninum*.

4.4 Preparação de antígeno solúvel de *N. caninum*

O antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) foi preparado de acordo com métodos já descritos por Silva et al. (2007). Resumidamente, as suspensões parasitárias foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (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 60 Hz em banho de gelo. Posteriormente, parasitos lisados foram centrifugados (10.000 x g, 30 min, 4 °C), o sobrenadante foi coletado e a sua concentração proteica determinada pelo método de Bradford (Sigma

Chemical Co., St. Louis, EUA). Aliquotas de NLA foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até sua utilização em reações imunoenzimáticas (ELISA).

4.5 Cultura de esplenócitos

Os baços de animais *naive* WT e EBI3^{-/-} foram coletados e macerados em *cell strainer* para obtenção de suspensões celulares, as quais foram lavadas e centrifugadas (400 x g, 10 minutos, 4°C) em meio RPMI. O sedimento resultante foi ressuscitado em 1 mL de tampão de lise de hemácias (0.16 M NH₄Cl e 0.17 M Tris-HCl [pH 7,5]) para cada baço e, em seguida, incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a suspensão celular foi lavada duas vezes (400 x g, 10 minutos, 4°C) com meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L- glutamina (2 mM), 2-βmercaptoetanol (50 mM) e 10% de SFB. O sedimento final foi ressuscitado em meio RPMI suplementado e realizou-se a contagem de células viáveis em câmara hemocitométrica, usando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% em PBS. A suspensão celular obtida foi cultivada em placas de cultura de 96 poços em quintuplicata (2×10^5 células/poço/200 µL) e infectadas por taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0,5) ou mantidos apenas como meio de cultura para servirem como controle da reação. As células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior análise de IFN-γ.

4.6 Determinação da produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

As concentrações das citocinas IL-12p40 e IFN-γ foram mensuradas em amostras de soro, lavado peritoneal e sobrenadante de cultura de esplenócito por Kits de ELISA comerciais, conduzidos de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA).

Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade de 96 poços (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram revestidas com anticorpo de captura específico para cada citocina e incubadas *overnight* a 4°C. Posteriormente, foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e realizado bloqueio de sítios inespecíficos com 10% de SFB em PBS 0,01M (ph 7,2) por uma hora. Em seguida, foram adicionadas as amostras a serem testadas e curvas padrões com concentrações conhecidas em diluições dupla-seriadas, as quais ficaram incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas

com PBS-T e incubadas com anticorpos de detecção anti-citocinas murinas conjugadas com biotina e acrescidos de estreptavidina-peroxidase por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T e reveladas com o substrato enzimático (H_2O_2 a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para bloquear a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA) a 450 nm. A concentração final das citocinas foi determinada a partir de curvas padrão com concentrações conhecidas de proteínas recombinantes e os valores foram expressos em pg/mL, observando os respectivos limites de detecção para cada ensaio: IL12p40 (15,6 pg/mL) e IFN- γ (4,1 pg/mL).

4.7 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A dosagem indireta de NO em lavado peritoneal de camundongos WT e EBI3^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* foi determinada a partir de kits comerciais (R&D Systems Inc., EUA) baseado na conversão enzimática de nitrato para nitrito por nitrato redutase. Um volume de 50 μ L de amostra foi acrescentado à placa de 96 poços paralelamente a curva padrão, seguido pela adição de NADH e nitrato redutase. Posteriormente a reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C. A reação foi desenvolvida por detecção colorimétrica utilizando reagente de Griess após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA) a 540 nm com correção de 690 nm. A concentração de nitrato/nitrito para cada amostra foi estimada em relação a curva padrão de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 0.78 μ mol/L.

4.8 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Células do lavado peritoneal de animais WT e EBI3^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* por um dia ou três dias foram coletadas e plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placa escura de 96 poços. Também foram coletadas e plaqueadas células do lavado peritoneal de animais WT e EBI3^{-/-} não infectados que foram utilizados como controle do experimento. Posteriormente, foram incubadas com a sonda de diacetato de 2', 7'- diclorofluorescina (5 μ M; DCFDA, Sigma-Aldrich) em meio RPMI com 2% de SFB a 37°C e 5% de CO₂ durante 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados por três vezes com PBS/BSA 2%. A leitura foi

realizada com excitação de 488nm e emissão de 535nm em leitor de placa (*SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA).

4.9 Determinação da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR)

A carga parasitária em amostras de células do lavado peritoneal e tecido cerebral dos animais WT e *EBI3^{-/-}* infectados com *N. caninum* foi quantificada pela amplificação específica de cópias de DNA por meio de *Real-time* PCR (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; WIDLANSKI, 2004).

Primeiramente, foi adicionado 500 µL de tampão NLB (10mM Tris-HCL, 400 mM NaCl e 2mM Na₂EDTA, pH 8,2), 16 µL de SDS 10% e 8 µL de solução de proteinase K (20mg/mL) em amostras de *pellet* celular ou em 50mg de tecido e foram incubadas a 50 °C *overnight* para a extração de DNA genômico. Após a incubação, foi acrescentado 150 µL de tampão NaCl 6 M em banho de gelo por 10 minutos com posterior centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado, transferido para outro tubo e acrescentou-se 800 µL de etanol absoluto. Por fim, o DNA foi coletado e ressuspensionado com 150 µL de água livre de nuclease. A concentração de DNA foi determinada por espectrofotômetro UV (20nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e ajustadas para 40ng/µL com água livre de DNase (água DEPC).

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'). As reações para os genes *Nc5* e GAPDH foram realizadas em tubos separados. Em ambos os casos, a mistura de PCR (volume total de 25 µl) continha *master mix* (GoTaq qPCR, Promega, Madison, WI, EUA), 10 pmol de cada primer e 100 ng e 5 ng de molde de DNA para a sequência de gene de *Nc5* e GAPDH, respectivamente. As curvas de diluição (fator de diluição x 10) para ambas as sequências foram preparados a partir de *N. caninum* e DNA genômico de camundongos extraído separadamente e usada para quantificação absoluta. Todas as amostras foram realizadas em triplicada. A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de *Nc-5* nas amostras

comparado com a curva padrão. Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito / μg de DNA total.

4.10 Análise histológica

Amostras de tecido do sistema nervoso central (SNC) de camundongos WT e EB13^{-/-} previamente infectados por 30 dias foram coletadas e fixadas em formol 10% tamponado com fosfato por 24 horas à temperatura ambiente, seguido da adição de álcool 70% e submetidas a procedimentos padrão de inclusão em parafina. Após a inclusão, os órgãos parafinizados foram seccionados a 5 μm de espessura e depositados em lâminas microscópicas. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas para a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) e posterior avaliação de alterações morfológicas teciduais (MINEO et al., 2009). Os cortes foram fotografados utilizando o microscópio invertido automatizado (FSX100, Olympus, Japão).

4.11 Quantificação de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os níveis séricos de IgG específicos de *N. caninum* e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) foram mensurados por ELISA indireto a partir de amostras de animais infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* após 7, 15 e 30 dias e amostras controles, como descrito previamente (MINEO et al., 2010).

A reação foi realizada em microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc, New York, EUA) sensibilizadas com antígenos de *N. caninum* (NLA) na concentração 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluído em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6), e incubadas por 18 horas a 4°C. Após o processo de sensibilização, os sítios inespecíficos foram bloqueadas 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 IgG2a por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras 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 IgG2a. 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 1 hora 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, foi realizada a lavagem dos poços com PBS-T. A reação foi desenvolvida com ácido 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfônico (ABTS; KPL, EUA) e a leitura da densidade óptica (DO) foi obtida a 405 nm em leitor de placas (SpectraMax M2e, Molecular Devices, EUA).

4.12 Análise estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Dependendo de cada protocolo experimental, os dados foram analisados pelo método Two-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, Teste T ou Mann Whitney. Taxas de sobrevida foram estimadas utilizando método de Kaplan-Meier sendo a curva de sobrevida comparadas através do teste Log-rank (Mantel-Cox).

4.13 Normas de biossegurança

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



Resultados

5 RESULTADOS

5.1 EBI3 suprime a indução de mediadores pró-inflamatórios do perfil Th1 durante a infecção por *N. caninum*

Conforme descrito anteriormente por diversos grupos de pesquisa, o perfil de resposta imune do tipo Th1 é essencial para o controle da replicação de *N. caninum* e, conseqüentemente, para a resistência do hospedeiro frente a infecção (MINEO et al., 2010; BARROS et al., 2019; MOTA et al., 2019; MIRANDA et al., 2019). Com o intuito de analisar o padrão de resposta celular induzido na ausência de EBI3 durante a infecção por *N. caninum*, mensuramos a produção dos principais mediadores deste padrão de resposta imune, sendo eles IL-12p40 e IFN- γ (Figura 4), em amostras de soro e lavado peritoneal após 1 e 3 dias de infecção. Foi encontrado um aumento significativo IL-12p40 em amostras do lavado peritoneal de 1 e 3 dias de infecção de camundongos EBI3^{-/-}, porém não foram observadas diferenças significativas desta citocina no mesmo período em amostra de soro.

Em relação ao IFN- γ , também houve aumento de concentração desta citocina em camundongos EBI3^{-/-}, sendo estatisticamente relevante em amostras de soro de 1 e 3 dias de infecção e lavado peritoneal após 1 dia de infecção. Adicionalmente, como forma de comprovar o incremento de produção de IFN- γ em camundongos EBI3^{-/-} infectados com *N. caninum*, realizamos a estimulação *in vitro* de esplenócitos de camundongos WT e EBI3^{-/-} *naive* com taquizoítas vivos (MOI 0,5; Figura 5) para verificar a produção de IFN- γ após 72 horas. Observamos que, assim como em amostras de soro e lavado, a quantidade de IFN- γ produzida foi significativamente maior em células advindas de camundognos EBI3^{-/-}.

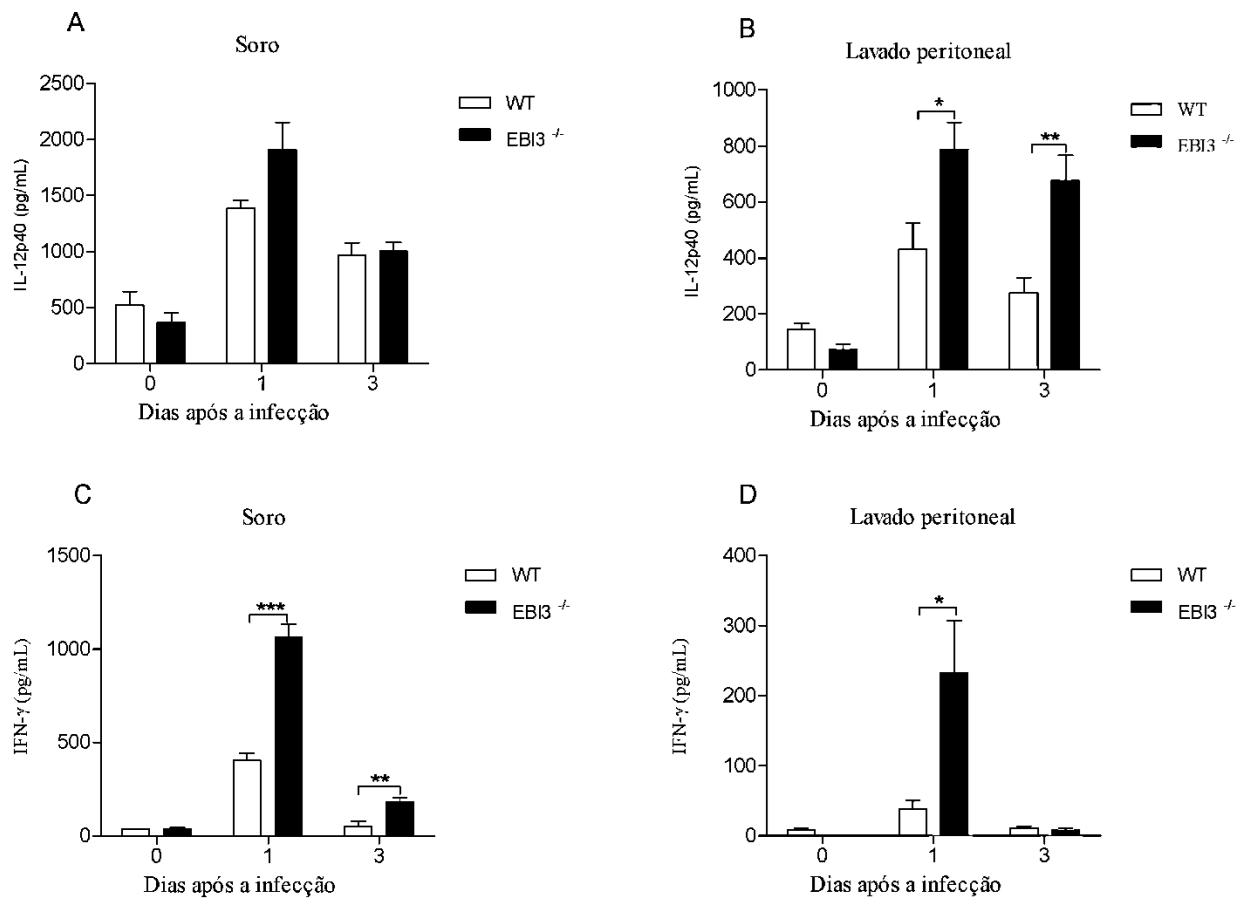


Figura 4: EBI3 regula negativamente a produção de IL-12p40 e IFN- γ por camundongos infectados por *N. caninum*. Camundongos WT e EBI3^{-/-} foram infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*, sendo mensurado a quantidade de IL-12p40 e IFN- γ (A, C) em amostras de soro e (B, D) lavado peritoneal, após 0, 1 e 3 dias de infecção. Os valores são expressos como média \pm SEM, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni (*P<0,05, ** P<0,01 e ***P<0,001).

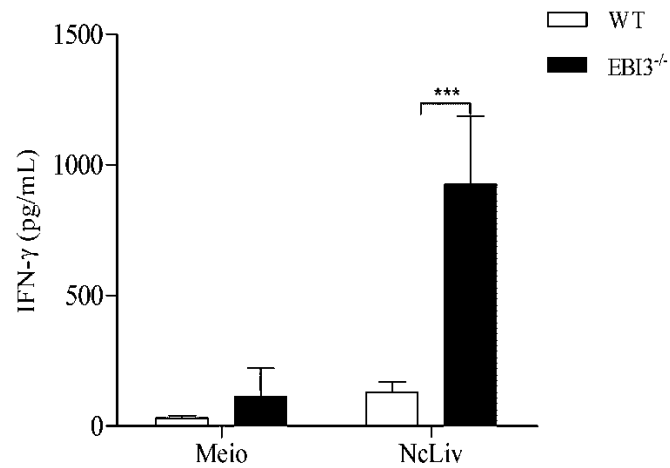


Figura 5: A ausência de EBI3 promove o incremento de produção de IFN- γ por esplenócitos murinos estimulados com taquizoítas de *N. caninum*. Esplenócitos de camundongos WT e EBI3^{-/-} foram estimuladas com taquizoítas de *N. caninum* (NcLiv) (MOI 0,5) por 72 horas para mensuração da produção de IFN- γ no sobrenadante de cultura. Os valores são expressos como média \pm SEM, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido pelos pós teste de Bonferroni (***) $P < 0,001$).

5.2 EBI3 reduz a produção de NO e ROS induzida pela infecção por *N. caninum*

Devido ao aumento de concentração de citocinas indutoras de um perfil de resposta imune do padrão Th1 frente a infecção por *N. caninum* em camundongos EBI3^{-/-}, buscou-se determinar os níveis das moléculas efetoras NO e ROS durante a fase aguda da infecção. A concentração de NO (Figura 6) foi determinada em amostras de lavado peritoneal de camundongos WT e EBI3^{-/-} inoculados com 5x10⁶ taquizoítos, após 1 e 3 dias de infecção. Níveis aumentados de NO foram encontrados após 1 dia de infecção na ausência de EBI3, corroborando com aumento de IL-12p40 e IFN- γ observados nos camundongos geneticamente deficientes após infecção. A produção de ROS (Figura 7) foi dosada em células do lavado peritoneal de animais infectados com 5x10⁶ taquizoítos após 1 e 3 dias de infecção, por meio de sonda fluorescente específica (DCFDA). Com base em tal layout experimental, foi observado um aumento da intensidade de fluorescência da sonda em células advindas de camundongos EBI3^{-/-} após 3 dias de infecção, se comparados aos camundongos WT infectados com o mesmo tempo de infecção.

5.3 EBI3 inibe a produção de anticorpos IgG anti-*N. caninum*

Com o objetivo de se avaliar o envolvimento de EBI3 na resposta imune humoral contra *N. caninum*, a produção de anticorpos IgG (Figura 8A) e suas subclasses IgG1 (Figura 8B) e IgG2a (Figura 8C) antígeno-específicos foi mensurada em amostras de soro extraídas de camundongos WT e EBI3^{-/-} após 7, 15 e 30 dias de infecção. Observou-se que camundongos EBI3^{-/-} apresentaram uma maior concentração de IgG total a partir do sétimo dia de infecção, o qual apresentou um aumento no 15º dia e se manteve ao 30º dia de infecção, em comparação com animais WT. As subclasses IgG também foram avaliadas e, corroborando com os resultados de encontradas para IgG total, camundongos EBI3^{-/-} produziram maiores concentrações de IgG1 e IgG2a após 15 e 30 dias de infecção.

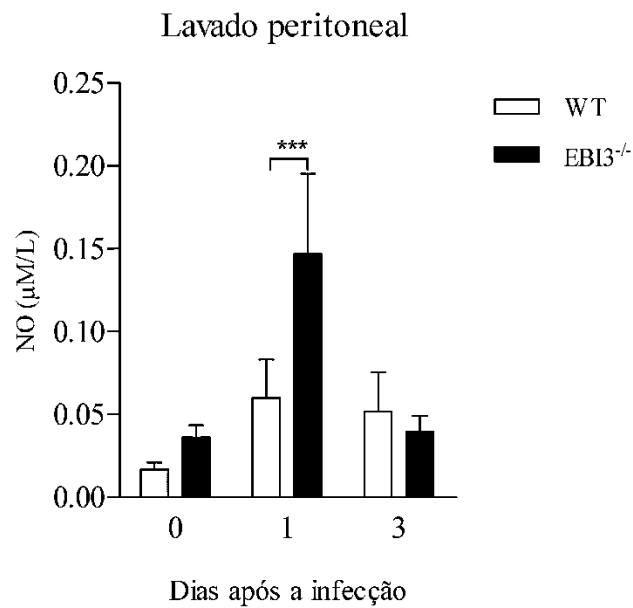


Figura 6. Produção de óxido nítrico na fase aguda da infecção por *N. caninum*. Amostras de lavado peritoneal foram obtidas de animais WT e EB13^{-/-} infectados por 0, 1 e 3 dias com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. A análise da concentração de nitrito foi realizada por ensaio de Griess. Os valores são expressos como média \pm SEM, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido pelos pós teste de Bonferroni (***) $P < 0,001$).

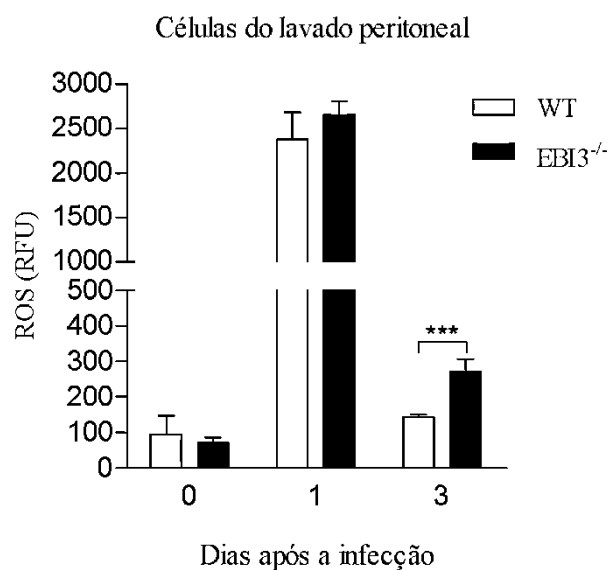


Figura 7. Produção diferencial de espécies reativas de oxigênio na fase aguda da infecção por *N. caninum*. Células de lavado peritoneal foram obtidas de animais WT e EBI3^{-/-} infectados por 0, 1, 3 dias com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* e marcadas com sonda para detecção específica de ROS (DCFDA). Os valores foram expressos como média de unidades relativas de fluorescência (RFU) \pm SEM, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni (***) $P < 0,001$).

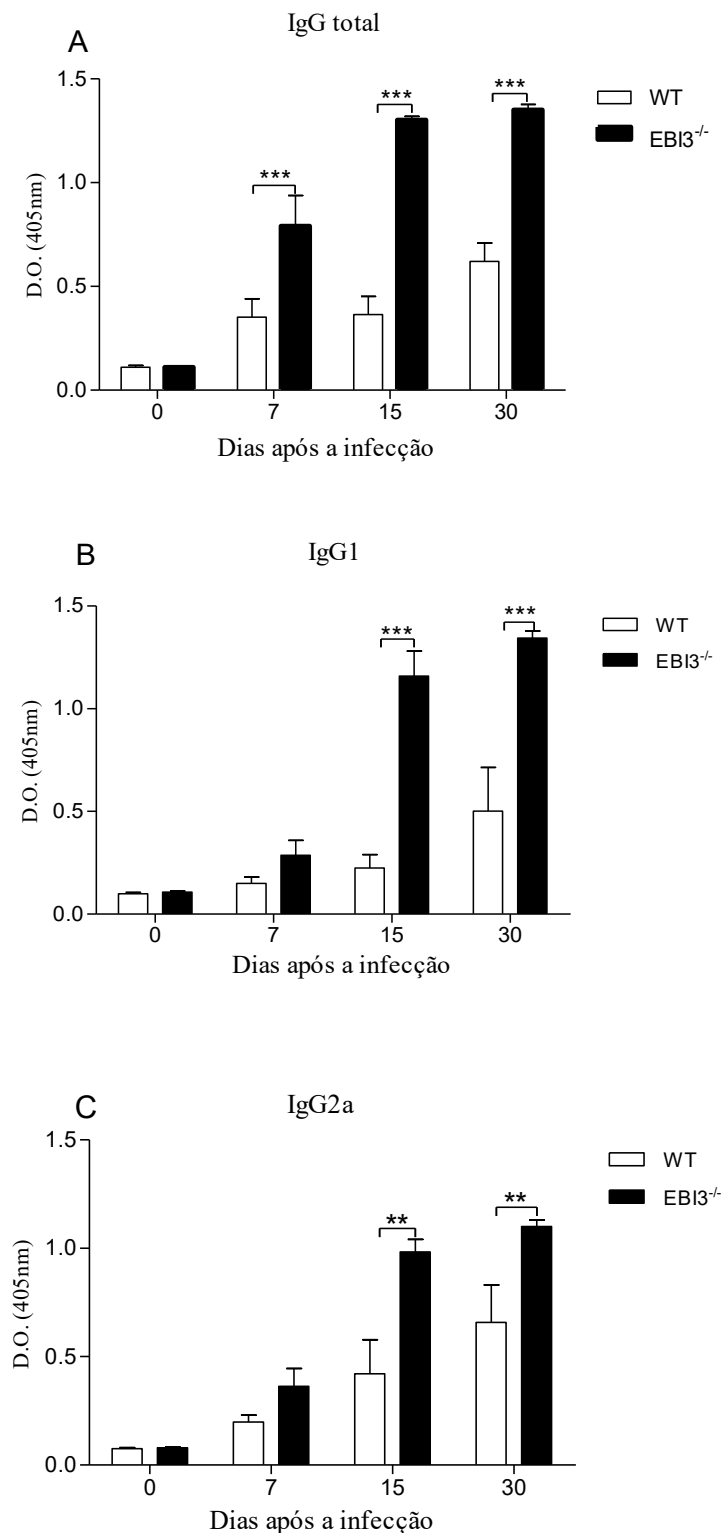


Figura 8. Cinética da produção de anticorpos IgG antígeno-específicos. Anticorpos antígeno-específicos (A) IgG total, (B) IgG1 e (C) IgG2a foram mensurados em camundongos WT e EB13^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-Liv). A produção de anticorpos foi mensurada após 0, 7, 15 e 30 dias após infecção em amostras de soro obtidas de ambos os grupos. Os valores são expressos como DO média \pm SEM, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni (**P<0,01, ***P<0,001).

5.4 EBI3 está diretamente relacionado à susceptibilidade frente *N. caninum*

Com o objetivo de se determinar o papel de EBI3 no controle da replicação parasitária, quantificou-se o número de cópias do locus Nc5 de *N. caninum*, por meio da técnica de qPCR, em amostras de células do lavado peritoneal após 1 e 3 dias de infecção, bem como amostras de cérebro colhidas após 30 dias de infecção. Durante a fase aguda da infecção, não foram observadas diferenças no parasitismo de células peritoneais advindas de camundongos WT e EBI3^{-/-} após 1 (Figura 9A) e 3 dias (Figura 9B) de infecção. Entretanto, foi observado na fase crônica da infecção uma redução significativa da carga parasitária do tecido cerebral (Figura 8C) de camundongos EBI3^{-/-} em relação aos camundongos WT infectados em paralelo.

Com base nestes resultados, foi verificado o estado inflamatório do sistema nervoso central de camundongos WT e EBI3^{-/-} após 30 dias de infecção (Figura 10). A análise histopatológica de secções de amostras de cérebro advindas de ambos os grupos revelou aumento de infiltrados inflamatórios de padrão tanto focal como difuso em camundongos EBI3^{-/-} quando comparado aos animais do tipo selvagem, conforme observado no incremento significativo (*P<0,05) do score inflamatório do grupo de camundongos geneticamente deficientes.

Por fim, como forma de se demonstrar a relevância de EBI3 para o agravamento da infecção, camundongos WT e EBI3^{-/-} foram desafiados com 1x10⁷ taquizoítos viáveis de *N. caninum*. Após o desafio, os animais foram acompanhados diariamente, por 30 dias, para análise da sobrevivência (Figura 11A) e peso (Figura 11B). Observamos que camundongos WT começaram a sucumbir após nove dias de infecção e somente 15% sobreviveram. Em contraste, 100% dos camundongos EBI3^{-/-} resistiram ao protocolo de infecção descrito. Quanto ao peso dos camundongos durante o experimento, foi observado que camundongos WT apresentaram perda progressiva do peso corporal entre 0 e 2 dias. Após, observou-se uma pequena recuperação do peso entre 2 e 5 dias. Entre 5 e 6 dias após a infecção, é possível observar uma queda abrupta do peso, o qual se mantém entre 6 e 9 pós-infecção. Quanto ao grupo EBI3^{-/-}, houve breve recuperação do peso dos animais após 3 dias de infecção, seguida de nova perda de peso corpóreo que se estabilizou ao 5 dpi em valores de perda de peso menores que 10% até o final do período de observação.

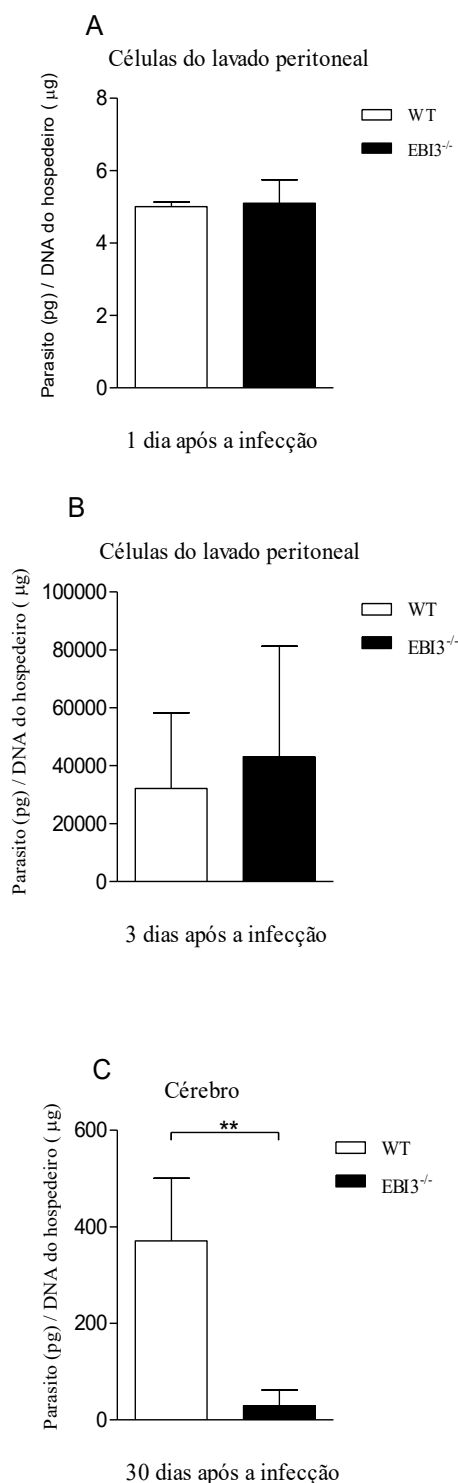


Figura 9. Quantificação da carga parasitária em camundongos WT e EBI3^{-/-} infectados com *N. caninum*. Camundongos WT e EBI3^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum* e células do lavado peritoneal foram colhidas após 1 (A) e 3 dias (B) de infecção e tecido do sistema nervoso central (C) após 30 dias de infecção. Os resultados são expressos pela relação entre amplificação do gene Nc5 e gene GAPDH de camundongo (controle). Os valores são expressos como média e \pm erro padrão da média (SEM) **P<0,01 (teste de Mann Whitney).

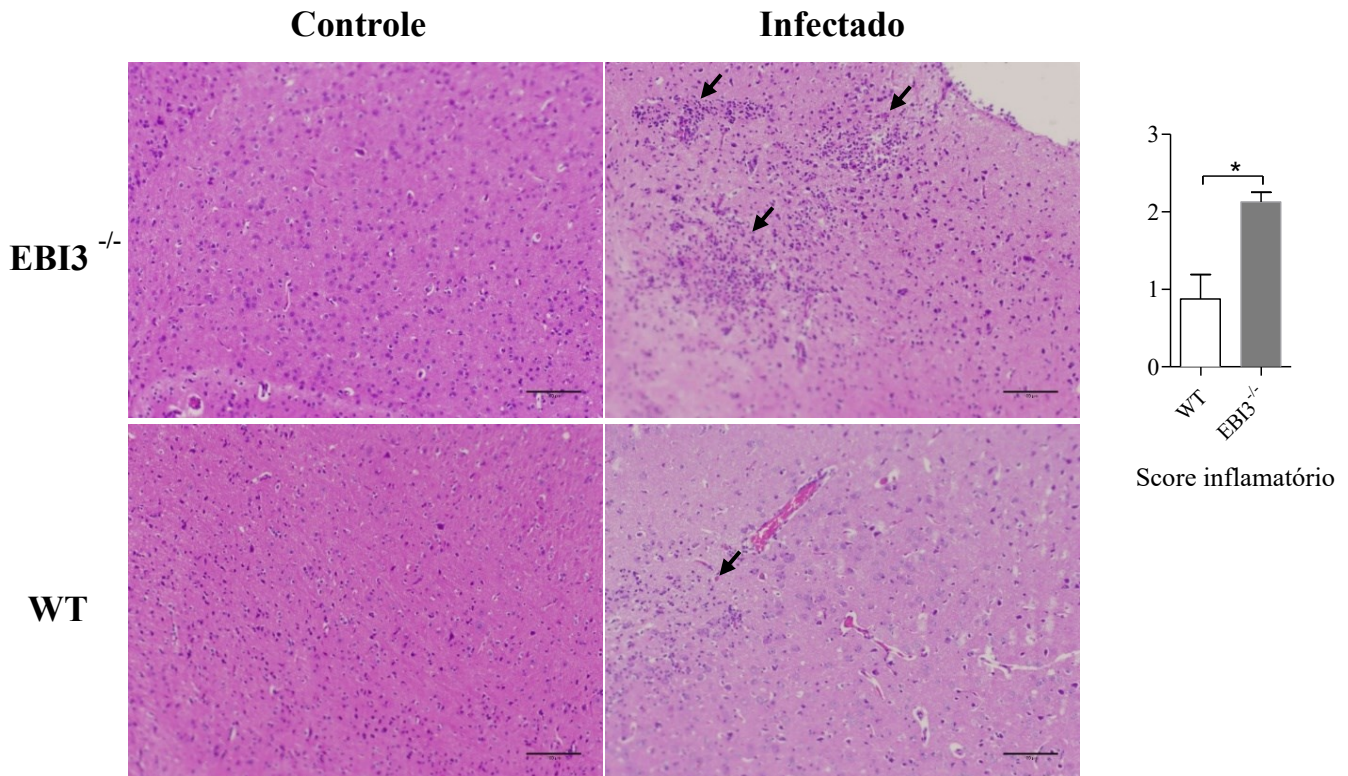


Figura 10. A ausência de EBI3 promove inflamação no cérebro de camundongos durante a infecção por *Neospora caninum*. Análise histológica em amostras de tecido do sistema nervoso central após 30 dias de infecção de camundongos WT e EBI3^{-/-} infectados com 5×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. As setas indicam locais com a presença de infiltrados inflamatórios. (* $P < 0,05$).

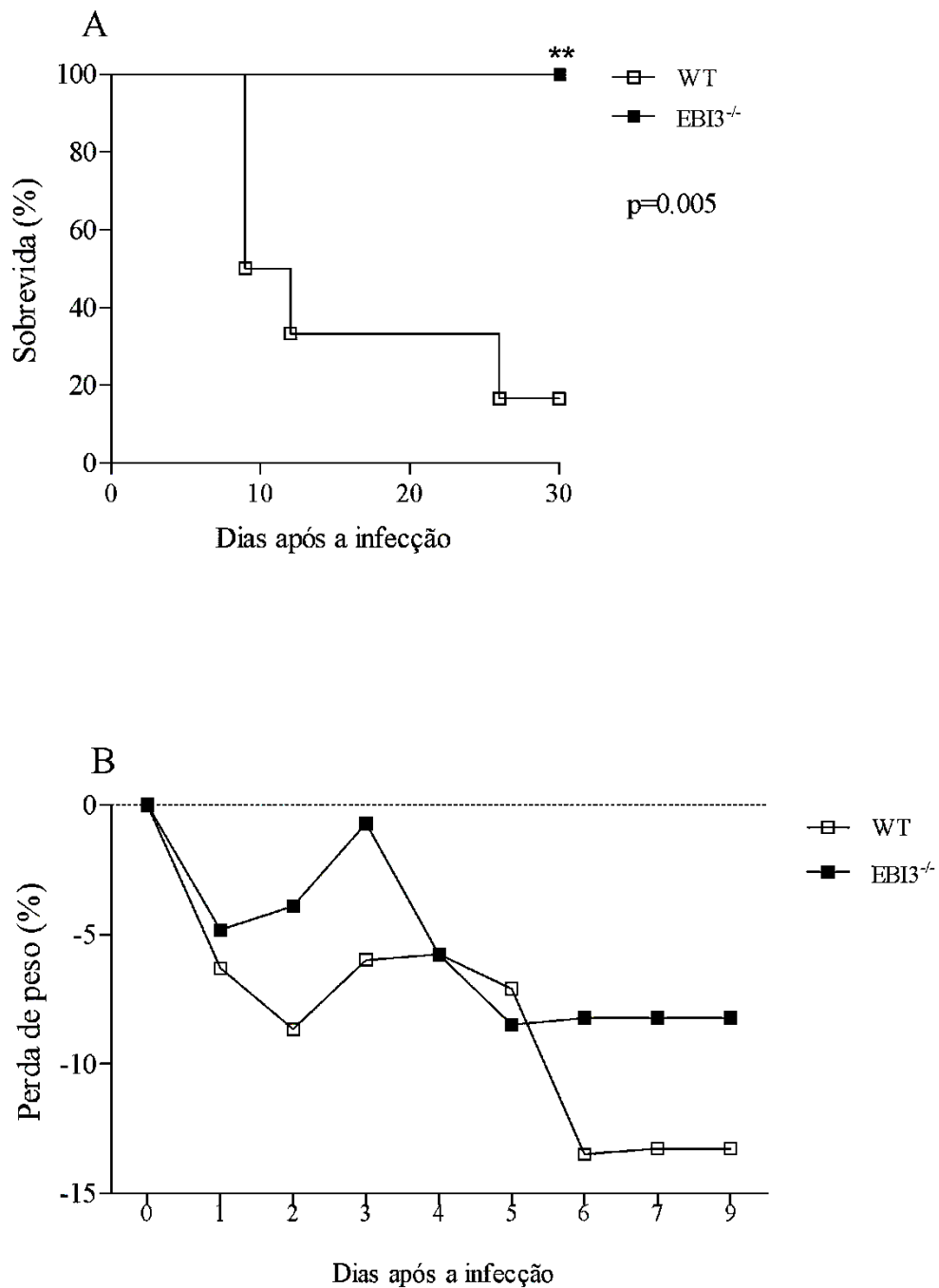


Figura 11. Deficiência em EBI3 aumenta a resistência do hospedeiro contra a infecção por *Neospora caninum*. Animais WT e EBI3^{-/-} (n= 6 animais/ grupo) foram infectados via intraperitoneal com 1x10⁷ taquizoítos de *N. caninum*. Os animais foram acompanhados por 30 dias para determinação da (A) sobrevivida e (B) perda de peso. Os grupos foram comparados usando análise de sobrevivência por Kaplan-Meier, através do teste de log-rank. **P<0.01.



Discussão

6 DISCUSSÃO

Neospora caninum é o parasita intracelular obrigatório que causa neosporose e tem importância médico-veterinária principalmente por causar paralisia neuromuscular em cães e aborto em gado (DUBEY et al., 1988; GOODSWEN et al., 2013). A alta prevalência e importância econômica da neosporose, principalmente para o Brasil que depende da exportação de carne e laticínios, leva a uma necessidade de compreender melhor os mecanismos de resposta imune contra o parasita. O acometimento neuromuscular é o principal sintoma da neosporose e a resposta do tipo Th1 pelo hospedeiro é importante para limitar a infecção controlando o parasitismo, mas quando exacerbada pode lesionar o órgão acometido (MINEO et al., 2010; GOODSWEN et al., 2015). Portanto, para o controle eficiente da neosporose, é crucial entender as interações entre parasito e hospedeiro.

O gene EBI3 codifica glicoproteínas que fazem parte tanto de IL-35 quanto de IL-27. Vários estudos apontam a IL-35 como uma citocina supressora e indicam o papel duplo de IL-27, com atividades tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias na imunopatogênese de diversas doenças (COLLISON et al., 2007; GUO; CAO; ZHU, 2019). Também há estudos com parasitas intracelulares que sugerem essa imunossupressão, o que leva a um perfil de suscetibilidade à infecção, tornando EBI3 um potencial alvo para terapia (MEDINA et al., 2017; QUIRINO et al., 2016; PARK et al., 2019). Observando a importância de EBI3 em diversas infecções com parasitas intracelulares e considerando que não há relatórios descrevendo o seu papel durante a infecção por *N. caninum*, o objetivo deste trabalho foi investigar como a ausência de EBI3 afeta o resultado da infecção por *N. caninum* em modelo murino.

Nossos resultados demonstram que a molécula EBI3 é um regulador negativo relevante na resposta imune contra *N. caninum*. Observamos que durante a infecção, EBI3 exerce um efeito supressor nas células Th1 com diminuição da produção de IFN- γ , NO e ROS. Também notamos a diminuição na produção de anticorpos em camundongos do tipo selvagem. Esses dados corroboram com o resultado encontrado na análise da carga parasitária e na curva de sobrevivência, em que a presença de EBI3 impede o controle eficiente da replicação parasitária e, conseqüentemente, diminui a taxa de sobrevivência.

O desenvolvimento de uma resposta imune Th1 adequada é primordial para a proteção contra parasitas intracelulares como *N. caninum*, principalmente o envolvimento de citocinas como IFN- γ (MINEO et al., 2010; FERREIRINHA et al., 2018; MIRANDA et al., 2019). Desse modo, nós avaliamos a capacidade de animais geneticamente deficientes em EBI3 de produzir

citocinas envolvidas na resposta protetora contra este parasito. Foi observado que animais $EBI3^{-/-}$ apresentaram produção aumentada de IL-12p40 e IFN- γ quando infectados por *N. caninum* em comparação com animais WT. Também foi observado a produção elevada de IFN- γ em cultura de esplenócito de animais $EBI3^{-/-}$. A IL-12 é identificada como um potente indutor da produção de IFN- γ por células T, NK e outros tipos de linfócitos e como potente indutor da diferenciação de células TCD4⁺ para o perfil de resposta imune do tipo Th1 (TRINCHIERI, 2003). Além disso, o aumento de IL-12p40 e IFN- γ pode recrutar macrófagos e células dendríticas e gerar um feedback positivo estimulando mais citocinas pró-inflamatórias (HU et al., 2013). Nossos resultados corroboram com dados encontrados na literatura, em que o aumento de citocinas pró-inflamatórias controlam a replicação parasitária. Já foi demonstrado em estudos com camundongos geneticamente deficientes em TLR2 que uma queda na produção de IL-12 e IFN- γ ocasiona um aumento da mortalidade de animais infectados com *N. caninum*. Portanto, ocorre uma polarização da resposta imune para o perfil Th1 via TLR2 (MINEO et al., 2009; MINEO et al., 2010). Também já foi relatado que camundongos deficientes para MyD88 apresentaram reduções nos níveis de citocinas pró-inflamatórias em relação ao animal do tipo selvagem, quando infectados por *N. caninum* (MINEO et al., 2009). Estudos recentes demonstram que a produção de IFN-I via sinalização TLR3/TRIF em infecções por *N. caninum* pode estimular a produção de IFN- γ , o qual produz resposta imune protetora ao hospedeiro. Estudos com *T. gondii* mostram que a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-12 e IFN- γ , são necessárias para a resistência contra este parasito (GAZZINELLI et al., 1994; SUZUKI et al., 1988).

Em nosso estudo, observamos o aumento de anticorpos IgG totais e suas subclasses IgG1 e IgG2a em animais $EBI3^{-/-}$ em comparação com animais WT. Estudos prévios demonstram que a infecção intraperitoneal com taquizoítos de *N. caninum* em camundongos BALB/c induz a secreção de imunoglobulinas específicas, predominantemente dos isotipos IgG2a e IgM, e que citocinas como IFN- γ estão relacionadas ao processo de alteração de isotipos de anticorpos (TEIXEIRA et al., 2005). Outros estudos também demonstraram que imunizações de camundongos com taquizoítos de *N. caninum* induzem a produção de IgG2a com resposta imune predominante Th1, controlando assim, a infecção (HEMPHIL et al., 2013; INNES; MATTSSON; 2007). Ferreirinha e colaboradores (2018) observaram que, em imunizações via intranasal de camundongos deficientes em IL-12 contra *N. caninum*, o efeito protetor de anticorpos IgG foi intensificada com a presença de IFN- γ . Assim, nossos resultados sugerem que a maior quantidade de IFN- γ pode estar ligada à produção precoce de anticorpos o que pode estar

relacionado a uma regulação da resposta imune e consequente proteção do hospedeiro deficiente em EBI3.

As células fagocíticas em mamíferos desempenham funções essenciais durante infecções por parasitas intracelulares. Além da produção de citocinas como já mencionado, também estimula moléculas co-estimuladoras e mecanismos antimicrobianos como a síntese de reativos de oxigênio que são essenciais no controle de infecções com *T. gondii* e *N. caninum* (MINEO et al., 2009; MONNEY; HEMPHILL, 2014; BARROS et al., 2019). Neste sentido, dosamos os níveis de NO e ROS e observamos que EBI3 modula negativamente a síntese dessas moléculas, visto que no lavado peritoneal dos camundongos EBI3^{-/-} foram encontradas altas concentrações de nitrato/nitrito e de ROS. Esses dados corroboram com o aumento de citocinas inflamatórias encontrado em animais EBI3^{-/-}. Estudos mostram a correlação de IFN- γ na indução de iNOS, bem como no controle de crescimento de parasitos por macrófagos (SIBLEY et al., 1991; LANGERMANS et al., 1992). Em estudo com infecção por *N. caninum* e camundongos deficientes em iNOs, Barros e colaboradores observaram que iNOs é um dos principais mecanismos efetores envolvidos na restrição da replicação parasitária. Também há relatos de infecção com *T. gondii* em que a mortalidade de camundongos iNOs^{-/-} está associada ao controle defeituoso do crescimento do parasito no SNC, aliado a uma capacidade defeituosa de macrófagos de eliminar o parasito (WOODS et al., 2013).

Sabe-se que a alta produção de citocinas pró-inflamatórias podem reduzir a multiplicação parasitária em tecidos de animais infectados (INNES et al., 2007). Dessa forma, de acordo com os resultados encontrados, também avaliamos a carga parasitária e observamos que animais EBI3^{-/-} apresentaram menor quantidade de DNA de *N. caninum* durante a fase crônica da doença, sugerindo que na ausência de EBI3 os animais são capazes de controlar a replicação parasitária. Além disso, realizamos a análise histopatológica do cérebro e encontramos uma intensa inflamação em animais EBI3^{-/-} confirmando a hipótese de que a carga parasitária é controlada pela resposta imune pró-inflamatória. Para avaliar a importância da molécula EBI3 durante a infecção por *N. caninum*, camundongos EBI3^{-/-} foram infectados com dose letal de NcLiv, e observou-se maiores taxas de sobrevivência em comparação com animais WT. Também foi observado que camundongos EBI3^{-/-} apresentaram melhor índice de morbidade, pois tiveram menor taxa de perda de peso. Vários trabalhos com *N. caninum* indicam a importância da ativação do perfil Th1 para o controle da carga parasitária e consequente sobrevivência. Miranda e colaboradores (2019) pesquisando a ativação da via TRIF pelo RNA do *N. caninum*, observaram que a produção de IL12p40, TNF, IFN e NO reduziu a carga parasitária de camundongos

infectados e contribuiu para a sobrevivência dos animais. Também já foi observado em trabalho com MyD88, que a ativação da resposta imune Th1 participa no controle da mortalidade, morbidade e parasitismo durante a infecção por *N. caninum* (MINEO; BENEVIDES et al., 2009). Juntos, nossos resultados indicam a importância do EBI3 na suscetibilidade à infecção por *N. caninum*.

Alguns estudos com IL-27 revelaram que camundongos deficientes em receptores da interleucina 27 produziram várias citocinas pró-inflamatórias em excesso, tais como TNF- α e IL-6 e IFN- γ , resultando em resposta imune exagerada (VILLARINO; HUANG; HUNTER, 2004; YOSHIDA et al., 2001). Por reduzir resposta protetora do tipo Th1, como observado nesse trabalho, EBI3 já foi descrito como atuante na suscetibilidade da replicação de parasitos. No caso de infecções por *T. gondii*, Park e colaboradores (2019) relataram que a perda ou superexpressão de IL27p28 resultou em maior suscetibilidade ao parasito, atuando como regulador negativo das respostas humorais e celulares da toxoplasmose. Também observaram que a suscetibilidade à toxoplasmose devido a superexpressão de IL27p28 ocorre devido a um grande defeito em produção de títulos IgM e IgG específicos para *T. gondii*, o que leva a aumento da carga parasitária no sistema nervoso central. Em outro estudo com o protozoário *T. gondii*, após serem desafiados, camundongos WSX1^{-/-} geraram uma resposta Th1 exacerbada e controlaram a replicação do parasito, porém esses animais desenvolveram doença inflamatória letal e produção esplênica elevada de IL-12 e IFN- γ (VILLARINO et al., 2003). Hall e colaboradores (2012) também observaram em infecção por *T. gondii* que a IL-27 possui um papel chave, pois promove o desenvolvimento de células Treg especializadas para controlar a imunidade mediada por células Th1 em locais de inflamação.

Adicionalmente, corroborando com resultados encontrados em que a presença de EBI3 diminui a resposta inflamatória, Medina e colaboradores (2017) em estudo realizado com *T. cruzi* demonstraram que a IL-27 atua como um regulador chave da inflamação suprimindo células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ , reduzindo assim a inflamação miocárdica. Também já foi observado em infecções com o mesmo protozoário, que camundongos WSX1^{-/-} desenvolveram necrose hepática devido a inflamação exacerbada a qual foi mediada por IFN- γ e TNF (HAMANO et al., 2003).

Rosas e colaboradores (2006) demonstraram que durante a infecção por *L. donovani* a via IL-27 / TCCR (WSX-1) não é necessária para a indução de uma resposta protetora Th1 e produção de IFN- γ . Eles observaram que os animais TCCR^{-/-} produziram significativamente mais IL-12, IFN- γ e TNF- α durante a fase aguda da infecção quando comparado a camundongos

do tipo selvagem. Também foi observado neste estudo que os camundongos TCCR^{-/-} apresentaram resistência à infecção por *L. donovani* e controlaram o crescimento do parasita em seus órgãos, indicando que a sinalização de IL-27 / TCCR não é necessária para proteção contra *L. donovani*.

Quirino e colaboradores (2016) encontraram resultados semelhantes ao nosso em relação à replicação parasitária durante a infecção por *L. infantum*. Foi relatado que camundongos EBI3^{-/-} infectados com *L. infantum* foram capazes de controlar a replicação parasitária de maneira eficiente quando comparados com animais WT, apesar de níveis reduzidos de IFN- γ , o qual difere dos nossos resultados encontrados para IFN- γ . No entanto, resultados diferentes foram encontrados em estudo realizado com *T. cruzi*, em que ausência de EBI3 ou IL27 α foi associada a uma maior parasitemia após infecção pela cepa Tulahuen. O aumento do parasitismo em camundongos durante o modelo de doença de Chagas pode ser devido ao papel regulador de EBI3, o qual pode inibir a ativação de macrófagos alternativos dependentes de Th2.

Outros estudos também tem mostrado a importância de EBI3 na suscetibilidade de infecções. Em um estudo realizado por Chen e colaboradores (2016) com pneumonia pneumocócica pós infecção por influenza, foi observado através de análise clínica que pacientes com infecção por influenza apresentaram níveis maiores de IL-35 em comparação com indivíduos normais, fato este que contribuiu para o aumento da suscetibilidade à pneumonia pneumocócica secundária por inibir, em partes, a resposta imune. Sabe-se que a IL-35 possui propriedades anti-inflamatórias, com o mecanismo predominante de suprimir a proliferação de células T e converter células T naïves em células T produtoras de IL-10 (COLLISON et al., 2007). Rinchai e colaboradores (2012) investigaram a produção de IL-27 durante septicemia causada por bactéria gram-negativa *Burkholderia pseudomallei*. Neste estudo, foi observado que os níveis de transcrição de mRNA e da proteína IL-27 foram significativamente elevados em pacientes com sepse, e que ao bloquear o receptor de IL-27 solúvel antes da infecção foi possível observar uma significativa redução de bactérias.

Juntos, nossos resultados demonstraram que a molécula EBI3 promove a suscetibilidade de camundongos durante a infecção por *N. caninum*, exercendo um efeito supressor nas células Th1 com diminuição do IFN- γ . Além disso, a presença de EBI3 impede o controle eficiente da replicação parasitária e a produção de anticorpos em comparação com camundongos do tipo selvagem. Essas descobertas abrem caminho para novas estratégias terapêuticas que podem neutralizam ou inibir EBI3 em infecções por *N. caninum*.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

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

- EBI3 suprime a indução de mediadores pró-inflamatórios do perfil Th1;
- EBI3 é capaz de suprimir a produção de anticorpos (IgG) e suas subclasses (IgG1, IgG2a);
- EBI3 é capaz de diminuir a inflamação tecidual;
- EBI3 contribui para a replicação parasitária e aumenta a suscetibilidade à infecção.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que EBI3 participa da supressão de mecanismos imunes essenciais para o controle da infecção por *N. caninum* em modelo murino, e que esta via de proteína pode ser tida como alvo potencial de intervenção terapêutica e profilática.



Referências

8 REFERÊNCIAS

- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; BASTO, A. P.; MÜLLER, J.; BALMER, V.; MANSER, V.; LEITÃO, A.; HEMPHILL A. N-terminal fusion of a toll-like receptor 2- ligand to a *Neospora caninum* chimeric antigen efficiently modifies the properties of the specific immune response. **Parasitology**, v. 143, p. 606-16, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000056>
- ALMERIA, S. *Neospora caninum* and Wildlife. **ISRN parasitology**, v.2013, p. 947347, 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/947347>
- ALMERIA, S.; SERRANO-PÉREZ, B.; DARWICH, L.; ARAUJO, R. N.; LOPEZ-GATIUS, F.; Dubey, J. P.; GASBARRE, L. C. Maternal and fetal immune response patterns in heifers experimentally infected with *Neospora caninum* in the second trimester of pregnancy—A descriptive study. **Veterinary parasitology**, v. 204, p.146-152, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.006>
- 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>
- ANVARI, D.; SABERI, R.; SHARIF, M.; SARVI, S.; HOSSEINI, S. A.; MOOSAZADEH, M.; DARYANI, A. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dog Population Worldwide: A Systematic Review and Meta-analysis. **Acta Parasitologica**, p.1-18, 2020. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00163-4>
- AROCH, I.; BANETH, G.; SALANT, H.; NACHUM-BIALA, Y.; BERKOWITZ, A.; SHAMIR, M.; CHAI, O. *Neospora caninum* and *Ehrlichia canis* co-infection in a dog with meningoencephalitis. **Vet Clin Pathol**, v. 47, p.289-293, 2018. <https://doi.org/10.1111/vcp.12582>
- 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.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 71, n. 2, p. 236-42, 1994.
- BARROS, P. D.; MOTA, C. M.; DOS SANTOS MIRANDA, V.; FERREIRA, F. B.; RAMOS, E. L. P.; SANTANA, S. S.; COSTA, L. F.; PAJUABA, A. C. A. M.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. Inducible Nitric Oxide Synthase is required for parasite restriction and inflammatory modulation during *Neospora caninum* infection. **Veterinary parasitology**, p. 276, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108990>
- 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>

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>

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

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>

BRYCE J.; BOSCHI-PINTO C.; SHIBUYA, K. BLACK, R.E. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. **WHO estimates of the causes of death in children. Lancet** 365:1147–1152, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71877-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71877-8)

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)

CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. (2017). All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26(3), p. 253-279, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017045>

CHEN, Y.; WANG, C. J.; LIN, S. H.; ZHANG, M.; LI, S. Y.; XU, F. Interleukin-35 is upregulated in response to influenza virus infection and secondary bacterial pneumonia. **Cytokine**, v. 81, p.23-27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.016>

COLLISON, L. W.; DELGOFFE, G. M.; GUY, C. S.; VIGNALI, K. M.; CHATURVEDI, V.; FAIRWEATHER, D.; MURRAY, P. J. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. **Nature immunology**, v.13(3), p.290, 2012. <https://doi.org/10.1038/ni.2227>

COLLISON, L. W.; VIGNALI, D.A.A. Interleukin-35: odd one out or part of the family?. **Immunological reviews**, v. 226.1, p.248-262, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00704.x>

COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J.; KUO, T. T.; BOYD, K.; WANG, Y., VIGNALI, K. M.; VIGNALI, D. A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v.450(7169), p. 566-569, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature06306>

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>

COSTA, H. F. D.; STACCHISSINI, A. V. M.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; GENNARI, S. M.; MODOLO, J. R. Reproductive failures associated with antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats in the state of Sao Paulo, Brazil. **Braz. j. vet. res. anim. Sci**, v.49, p. 67-72, 2012. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v49i1p67-72>

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>

DECÔME, M.; MARTIN, E.; BAU-GAUDREAU, L.; O'TOOLE, E. Systemic disseminated *Neospora caninum* infection with cutaneous lesions as the initial clinical presentation in a dog. **Can Vet J.**, v.60, p. 1177-1181, 2019.

DEVERGNE, M; HUMMEL, H.; KOOPEN. "A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent EpsteinBarr virus infection in B lymphocytes," **Journal of Virology**, vol. 70, no. 2, pp. 1143–1153, 1996. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.1143-1153.1996>

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; SLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology**. Parasites and wildlife, v. 4, n. 2, p. 216-38, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean journal of parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-46, Jul 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of comparative pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.004>

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

- DUBEY, J. P.; JENKINS, M.C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 181, p. 382-387, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018>
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, p. 452-458, 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90099-2)
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992.
- 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>
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-67, 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- DUBEY, S.; ROULIN, A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 3, p. 327-38, 2014. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12231>
- EIRAS, C. et al. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive veterinary medicine**, v. 98, p.128-132, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.10.014>
- 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>
- FERNANDES, B. C.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L.; CARVALHO, J. M.; OLIVEIRA, W. G.; CURY, M. C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais-Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.016>
- FERREIRINHA, P.;FRÓIS-MARTINS, R.; TEIXEIRA, L.; ROCHA, A.; VILANOVA, M.;CORREIA, A. Interferon- γ -dependent protection against *Neospora caninum* infection conferred by mucosal immunization in IL-12/IL-23 p40-deficient mice. **Vaccine**, v. 36(32), p. 4890-4896, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.060>
- FUJITA, H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, p. 3-8, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.04.028>
- GAZZINELLI, R.T.; HIENY, S.; WYN, T.A.; WOLF, S.; SHER, A. 1993. Interleukin 12 is required for the Tlymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 90, p. 6115-6119, 1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6115>

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>

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-61, Feb 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>

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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>

GRAHAM, D.A.; CALVERT, V.; WHYTE, M.; MARKS, J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. **The Veterinary Record**, v.144, n.24, p.672-673, 1999. <https://doi.org/10.1136/vr.144.24.672>

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>

GUI, B. Z.; LV, Q. Y.; GE, M.; LI, R. C.; ZHU, X. Q.; LIU, G. H. First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. **Transboundary and Emerg Diseases**, v. 67, p. 29. 2020. <https://doi.org/10.1111/tbed.13358>

GUO, Y.; CAO, W.; ZHU, Y. Immunoregulatory Functions of the IL-12 Family of Cytokines in Antiviral Systems. **Viruses**, v. 11(9),p. 772, 2019. <https://doi.org/10.3390/v11090772>

HALL, A. O. H.; BEITING, D. P.; TATO, C.; JOHN, B.; OLDENHOVE, G; LOMBANA, C. G.; HARRIS, T. H. The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. **Immunity**, v. 37(3),p. 511-523, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.014>

HAMANO, S.; HIMENO, Y; MIYAZAKI. “WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production,” **Immunity**, vol. 19, no. 5, pp. 657–667, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00298-X)

HECKER, Y. P.; CANTÓN, G.; REGIDOR-CERRILLO, J.; CHIANINI, F.; MORRELL, E.; LISCHINSKY, L.; ORTEGA-MORA, L. M.; INNES, E. A.; ODEÓN, A.; CAMPERO, C. M.; MOORE, D. P. Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 214, p. 247-54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.015>

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>

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.; 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)

HIRAHARA, K.; GHORESCHI, K.; YANG, X. P.; TAKAHASHI, H.; LAURENCE, A.; VAHEDI, G.; CHEN, Q. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. **Immunity**, v.36(6), p.1017-1030, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.024>

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

HU, J.; KINN, J.; ZIRAKZADEH, A. A.; SHERIF, A.; NORSTEDT, G.; WIKSTROM, A. C.; WINQVIST, O. The effects of chemotherapeutic drugs on human monocyte-derived dendritic cell differentiation and antigen presentation. **Clinical & Experimental Immunology**, v.172(3),p. 490-499, 2013. <https://doi.org/10.1111/cei.12060>

HUNTER, C. A.; KASTELEIN, R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. **Immunity**, v.37(6), p.960-969, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.003>

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>

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitology**, v. 18, p. 497-504, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02372-3)

INNES, E. A.; MATTSSON, J. G. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 2, p. 43-4; discussion 44-5, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.12.004>

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBANREDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>

JENSEN, H.; CHEN, S. Y.; FOLKERSEN, L.; NOLAN, G. P.; LANIER, L. L. EBI3 regulates the NK cell response to mouse cytomegalovirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114(7), p. 1625-1630, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700231114>

JOHNSON II, D. C.; WIDLANSKI, T. S. A reversible safety-catch method for the hydrogenolysis of N-benzyl moieties. **Tetrahedron letters**, v. 45(46), p. 8483-8487, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.09.118>

- KALLIOLIAS, G. D.; GORDON, R. A.; IVASHKIV, L. B. Suppression of TNF-alpha and IL-1 signaling identifies a mechanism of homeostatic regulation of macrophages by IL-27. **J. Immunol**, v.185, n.11. p.7047-56. 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001290>
- KHAN, A.; SHAIK, J. S.; SIKORSKI, P.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E. Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. **Engineering**, v.6, p. 10-19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.02.010>
- KING, J. S.; BROWN, G. K.; JENKINS, D. J.; ELLIS, J. T.; FLEMING, P. J.; WINDSOR, P. A.; SLAPETA, J. Oocysts and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 85–92, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.027>
- 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>
- KLEIN, C.; BARUA, S.; LICCIOLI, S.; MASSOLO, U. Neospora caninum DNA in Coyote Fecal Samples Collected in an Urban Environment. **J Wildl Dis**, v. 55, p. 196-199, 2018. <https://doi.org/10.7589/2018-02-027>
- KUL, O.; ATMACA, H. T.; ANTEPLIOGLU, T.; OCAL, N.; & CANPOLAT, S. *Neospora caninum*: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. **Journal of Comparative Pathology**, v.153, p.9–13. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.03.005>
- LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN FURTH, R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. **Journal of immunology**, v. 148, n. 2, p. 568-74, 1992.
- LARSON, R. L.; HARDIN, D. K.; PIERCE, V. L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1597-604, May 15 2004. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1597>
- 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>
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.36, p.205–222, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-33, 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>

LUCAS, S.; GHILARDI, N., Li, J.; DE SAUVAGE, F. J. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100(25), p. 15047-15052, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536517100>

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>

MANN, T. R.; CADORE, G. C.; CAMILLO, G.; VOGEL, F. S.; SCHMIDT, C.; ANDRADE, C. M. Canine cutaneous neosporosis in Brazil. **Veterinary dermatology**, v. 27, p. 195-97, 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12294>

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>

MANSILLA, F. C.; FRANCO-MAHECHA, O. L.; LAVORIA, M. A.; MOORE, D. P.; GIRALDEZ, A. N.; IGLESIAS, M. E.; WILDA, M.; CAPOZZO, A. V. The immune enhancement of a novel soy lecithin/beta-glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 6, p. 1124-31, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.007>

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>

MASCANFRONI, I. D.; YESTE, A.; VIERA, S. M.; BURNS, E. J.; PATEL, B., SLOMA, I.; KUCHROO, V. K. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. **Nature immunology**, v.14(10), p.1054, 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2695>

McALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, p. 443-63, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-8, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00138-6)

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>

MEDINA, T. S.; OLIVEIRA, G. G.; SILVA, M. C.; DAVID, B. A.; SILVA, G. K.; FONSECA, D. M.; PEREIRA, A. C. Ebi3 prevents *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by dampening IFN- γ -driven inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1213, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01213>

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, J. R.; SLIVA, 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, p.273, 2005. <https://doi.org/10.7476/9788570785237>

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

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>

MINEO, T. W.; OLIVEIRA, C. J.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S. Recognition by Tolllike 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>

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/10.1101/327999>

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>

MOORE, D. P.; ECHAIDE, I.; VERNA, A. E.; LEUNDA, M. R.; CANO, A.; PEREYRA, S.; ZAMORANO, P. I.; ODEON, A. C.; CAMPERO, C. M. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Veterinary parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 245-51, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.020>

MOTA, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; NADIPURAM, S. M.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHLEGEL, 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>

- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 269–285, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 89, p. 557-563, 2011. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710409>
- NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; HEMPHILL, A. Neospora caninum and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. **Experimental parasitology**, v. 104, p. 149-158, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00137-1)
- NAM, H.; KANG, S.; CHOI, W. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v.36, n.4, p. 269-275, 1998. <https://doi.org/10.3347/kjp.1998.36.4.269>
- PARK, J.; DeLONG, J. H.; KNOX, J. J.; KONRADT, C.; WOJNO, E. D. T.; HUNTER, C. A. Impact of Interleukin-27p28 on T and B Cell Responses during Toxoplasmosis. **Infection and immunity**, v. 87, p. 12, 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00455-19>
- PERRUCCI, S.; GAVAZZA, A.; ROCCHIGIANI, G.; NARDONI, S.; ZBRIGER, A.; LUBAS, G.; MANCIANTI, F. *Neospora caninum* oocyst shedding in a naturally infected dog from Italy. **Vet Parasitol Reg Stud Reports**, v.10, p. 10-12, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.01.005>
- 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>
- PFLANZ, S.; HIBBERT, L.; MATTSON, J.; ROSALES, R.; VAISBERG, E.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. **The Journal of Immunology**, v. 172(4), p. 2225-2231, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2225>
- PLFANZ, S.; TIMANS, J. C.; CHEUNG, J.; ROSALES, R.; KANZLER, H.; GILBERT, J.; BLUMENSCHNEIN, W. M. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. **Immunity**, v. 16(6), p. 779-790, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00324-2)
- POT, C.; APETOH, L.; AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of TH17 cells by IL-27. **In Seminars in immunology**, Vol. 23, No. 6, pp. 438-445, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.08.003>
- QUIRINO, G. F.; NASCIMENTO, M. S.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SACRAMENTO, L. A.; LIMA, M. H.; ALMEIDA, R. P.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17–Neutrophil Response. **Infection and immunity**, v. 84(8), p.2289-2298, 2016. <https://doi.org/10.1128/IAI.00283-16>

- REGIDOR-CERRILLO, J.; ARRANZ-SOLÍS, D.; BENAVIDES, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A., MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA. *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(1), p. 10, 2014. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-10>
- REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, A. 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.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum*--how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International journal for parasitology**, v. 39, n. 11, p. 1173-87, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.007>
- REICHEL, M. P.; MCALLISTER, M. M.; NASIR, A.; MOORE, D. P. A review of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary parasitology**, v. 212, p. 75-79, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.008>
- REICHEL, M. P.; MCALLISTER, M. M.; POMROY, W. E.; CAMPERO, C.; ORTEGAMORA, L. M.; ELLIS, J. T. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1455-70, Sep 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000158>
- RINCHAI, D.; KHAENAM, P.; KEWCHAROENWONG, C.; BUDDHISA, S.; PANKLA, R.; CHAUSSABEL, D.; LERTMEMONGKOLCHAI, G. Production of interleukin-27 by human neutrophils regulates their function during bacterial infection. **European journal of immunology**, v.42(12), p. 3280-3290, 2012. <https://doi.org/10.1002/eji.201242526>
- ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; BLANCO-MURCIA, J.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary research**, v. 40, n. 5, p. 49, 2009. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009032>
- ROSAS, L.E.; SATOSKAR, A.A.; ROTH, K.M.; KEISER, T.L.; BARBI, J. HUNTER, C.; DE SAUVAGE, J.; SATOSKAR, A.R. Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to *Leishmania donovani* infection but develop severe liver immunopathology. **Am J Pathol**, v.168, p.158 –169, 2006. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050013>
- SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; FUKUTOMI, Y.; KRAHENBUHL, J. L. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. **Journal of immunology**, v. 147, n. 7, p. 2340-5, 1991.
- SILVA, D. A.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143(3-4), p.234-244, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028>

- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D.; REMINGTON, J.S. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science** v. 240, p.516-518, 1988. <https://doi.org/10.1126/science.3128869>
- SYED-HUSSAIN, S. S.; HOWE, L.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; HARDCASTLE, M.; WILLIAMSON, N. B. Vertical transmission in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. **Veterinary parasitology**, v. 208(3-4), p. 150-158, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.036>
- TAKEDA, A.; HAMANO, S.; YAMANAKA, A.; HANADA, T.; ISHIBASHI, T.; MAK, T.W. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. **J Immunol**, v. 170(10):p. 4886–90, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.10.4886>
- TAQUES, G.G.; BARBOSA, T. R.; MARTINI, A.C.; PITCHENIN, L.C.; BRAGA, I.A.; DE MELO, A. L. T.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; De AGUIAR, D. M. Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. v. 46, p.47-50, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.09.002>
- TEIXEIRA, L.; MARQUES, A.; MEIRELES, C. S.; SEABRA, A. R.; RODRIGUES, D.; MADUREIRA, P.; FAUSTINO, A. M.; SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; CORREIA DA COSTA, J. M.; CANADA, N.; VILANOVA, M. Characterization of the Bcell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. **Immunology**, v.116, p.38-52, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02195.x>
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- 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>
- 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)
- TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 9.5, p.641-644, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00296-6)
- UCHIDA, M.; NAGASHIMA, K.; AKATSUKA, Y.; MURAKAMI, T.; ITO, A.; IMAI, S.; IKE, K. Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite antigens, NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic infection. **Parasitology research**, v. 112, n. 2, p. 655-63, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3182-5>
- VIGNALI, D.A.A.; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. **Nat Immunol**, v.13(8), p.722–728, 2012. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>

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>

VILLARINO, A. V.; HUANG, E.; HUNTER, C. A. Understanding the pro-and anti-inflammatory properties of IL-27. **The Journal of Immunology**, 173(2), 715-720, 2004.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.715>

VILLARINO, A.; HIBBERT, L.; LIEBERMAN, L.; WILSON, E.; MAK, T.; YOSHIDA, H.; HUNTER, C. A. (2003). The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. **Immunity**, v.19(5), p. 645-655, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00300-5)

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>

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

<https://doi.org/10.1128/CVI.00225-12>

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive veterinary medicine**, v.103(2-3), p.136-144, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pre-vetmed.2011.08.010>

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

<https://doi.org/10.1128/IAI.00777-06>

WILLIAMS, D. J.; TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. **Parasite Immunology**, 28(3), 61-67, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00809.x>

WIRTZ, S.; BECKER, C.; FANTINI, M. C.; NIEUWENHUIS, E. E.; TUBBE, I.; GALLE, ; NEURATH, M. F. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF- κ B activation. **The Journal of Immunology**, 174(5), 2814-2824, 2005.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2814>

WOODS, S.; SCHROEDER, J.; MCGACHY, H.A.; PLEVIN, R.; ROBERTS, C.W.; ALEXANDER, J. MAP kinase phosphatase-2 plays a key role in the control of infection with *Toxoplasma gondii* by modulating iNOS and arginase-1 activities in mice. **PLoS Pathog** v. 9, p.e1003535, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003535>

YOSHIDA, H.; HAMANO, S.; SANALDI, G.; COVEY, T.; FAGGIONI, R.; UM, S.; SARRIS, C. J. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. **Immunity**, 15(4), 569-578, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00206-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00206-0)

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>



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