



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**Papel das vias de reconhecimento de ácidos nucleicos TLR3-TRIF e  
cGAS-STING e de seu produto IFN-tipo I  
na infecção por *Neospora caninum***

**Vanessa dos Santos Miranda**

**Uberlândia – MG**

**Junho – 2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**Papel das vias de reconhecimento de ácidos nucleicos TLR3-TRIF e  
cGAS-STING e de seu produto IFN-tipo I na infecção por *Neospora  
caninum***

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

**Vanessa dos Santos Miranda**

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

**Uberlândia – MG**

**Junho – 2020**

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

M672 2020	<p>Miranda, Vanessa dos Santos, 1992- Papel das vias de reconhecimento de ácidos nucléicos TLR3- TRIF e cGAS-STING e de seu produto IFN-tipo I na infecção por Neospora caninum [recurso eletrônico] / Vanessa dos Santos Miranda. - 2020.</p> <p>Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.448">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.448</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p>CDU: 612.017</p>
--------------	--

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



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
 Aplicada  
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 132º do PPIPA				
Data:	vinte e nove de junho de dois mil e vinte	Hora de início:	14h00min	Hora de encerramento:	18h30min
Matrícula do Discente:	11613IPA004				
Nome do Discente:	Vanessa dos Santos Miranda				
Título do Trabalho:	Papel das vias de reconhecimento de ácidos nucléicos TLR3-TRIF e cGAS-STING e de seu produto IFN-tipo I 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 pelos protozoários neospora caninum e toxoplasma gondii				

Reuniu-se, por web conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza - UFRJ; Dr. Djalma de Souza Lima Junior -NIH/EUA; Prof. Dr. Robinson Sabino Silva - ICBIM/UFU; Murilo Vieira da Silva - ICBIM/UFU; Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - ICBIM/UFU (presidente), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato(a), agradeceu a presença de todos, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente, 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):

Aprovada.

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

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 30/06/2020, às 12:05, 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 **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/06/2020, às 12:58, 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 **Djalma de Souza Lima Junior, Usuário Externo**, em 30/06/2020, às 13:51, 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 01/07/2020, às 08:59, 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 **Marcelo Torres Bozza, Usuário Externo**, em 08/07/2020, às 21:35, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2109631** e o código CRC **983229CF**.

# *Agradecimentos*

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

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

Ao meu filho Leonardo, que me ensinou a sentir o maior amor do mundo e que foi minha força para seguir em frente. Escrever essa tese sem ele, tão pequeno, se agarrando em mim não teria a mesma graça!

Ao meu esposo Gustavo, que foi a melhor rede de apoio que alguém poderia ter. Pela compreensão, paciência e por sempre acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Mineo, por participar ativamente do meu processo de aprendizado com valiosos conselhos que me fizeram ter mais vontade de prosseguir na pesquisa científica, por confiar no meu trabalho e por me ensinar a ter pensamentos críticos inerentes a um pesquisador;

A Prof<sup>ª</sup> Fernanda Maria Santiago, pelos anos de amizade, confiança e por ter me ensinado as primeiras técnicas laboratoriais;

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, profissional exemplar e admirável, que foi o primeiro a me apresentar a Imunologia na graduação e por me abrir as portas do laboratório. Seu incentivo durante todos esses anos de pesquisa foi essencial para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia, Flávia, Tamires, Mariana, Vanessa R, Cristina, David, Patrício, Eliezer, Carol S, Carol M, Angelis, Heber e Fernando pelos conhecimentos compartilhados, por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e os momentos difíceis mais toleráveis;

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

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

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> .....	16
Figura 2: Via de sinalização de TLR3 dependente de TRIF.....	32
Figura 3: Via de sinalização de cGAS-STING.....	52
Figura 4: O DNA de <i>N. caninum</i> induz a expressão de IFN-tipo I.....	63
Figura 5: Recrutamento de cGAS e STING para o citosol após infecção com <i>N. caninum</i> .....	64
Figura 6: O DNA de <i>N. caninum</i> induz a expressão de cGAS.....	66
Figura 7: O DNA de <i>N. caninum</i> induz a expressão de STING.....	67
Figura 8: STING é essencial para a produção de IFN-tipo I.....	70
Figura 9: STING modula positivamente a produção de IL-12 e IL-10 durante a infecção por <i>N. caninum</i> . .....	71
Figura 10: STING limita a replicação parasitária de <i>N. caninum in vitro</i> .....	72
Figura 11: IFN-tipo I é importante para resistência do hospedeiro frente a infecção por <i>N. caninum</i> .....	86
Figura 12: IFN- tipo I controla a replicação parasitária <i>in vivo</i> .....	87
Figura 13: IFN-tipo I controla a inflamação hepática e cerebral durante a infecção por <i>N. caninum</i> .....	88
Figura 14: IFN-tipo I influencia a produção de IL-12p40 e IFN- $\gamma$ <i>in vivo</i> .....	90
Figura 15: A presença de IFN-tipo I induz a produção de óxido nítrico durante a infecção por <i>N. caninum</i> .....	91
Figura 16: A produção de IL-12p40 e IL-10 é aumentada por IFN-tipo I durante a infecção por <i>N. caninum in vitro</i> .....	91
Figura 17: A ação de IFN-tipo I não interfere na produção de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> .....	92
Figura 18: Diferentes vias de produção de IFN-tipo I após reconhecimento de RNA e DNA de <i>N. caninum</i> .....	98

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>13</b>
1.1 <i>Neospora caninum</i> e seus hospedeiros.....	13
1.2 Morfologia e ciclo biológico.....	13
1.3 Patogênese e sinais clínicos .....	17
1.4 Resposta imune contra <i>N. caninum</i> .....	19
1.5 Controle da neosporose.....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 Objetivo geral .....	28
3.2 Objetivos específicos .....	28
<b>Capítulo I</b> .....	<b>29</b>
4 INTRODUÇÃO .....	30
4.1 Reconhecimento de RNA e via de sinalização dependente de TLR3-TRIF .....	30
4.2 Artigo publicado no periódico <i>Infection and Immunity</i> , volume 87, 4ª Edição – Abril de 2019.....	32
<b>Capítulo II</b> .....	<b>48</b>
5 INTRODUÇÃO .....	49
6 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
6.1 Manutenção de macrófagos imortalizados, células HeLa e taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> .....	53
6.2 Extração do DNA total de taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> .....	54

6.3 Extração de RNA celular para ensaios de expressão gênica.....	54
6.4 Síntese do cDNA por transcrição reversa .....	55
6.5 PCR em tempo real (qPCR) para análise de expressão gênica .....	55
6.6 Superexpressão de cGAS e STING com proteína de fusão GFP em macrófagos murinos imortalizados .....	57
6.7 Depleção gênica de STING por CRISPR/Cas9 em macrófagos murinos imortalizados .	60
6.8 PCR em tempo real para quantificação de carga parasitária.....	61
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
7.1 DNA de <i>Neospora caninum</i> induz a produção de IFN-tipo I .....	62
7.2 A via de sinalização dependente de cGAS-STING é ativada por <i>Neospora caninum</i> .....	63
7.3 A presença de STING induz IFN-tipo I, modula a produção de IL-12 e IL-10, além de promover o controle da replicação parasitária em macrófagos infectados por <i>N. caninum</i> ...	67
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>Capítulo III.....</b>	<b>75</b>
<b>10 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>11 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
11.1 Obtenção de camundongos.....	77
11.2 Cultivo de células HeLa e parasitos <i>N. caninum</i> .....	78
11.3 Delineamento experimental.....	78
11.4 Ensaio de Sobrevida .....	79
11.5 PCR em tempo real para quantificação de carga parasitária.....	79
11.6 Análise histopatológica para determinação de inflamação tecidual <i>in vivo</i> .....	80
11.7 Homogenato de órgãos para dosagem de citocinas.....	80
11.8 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) .....	81

11.9	Quantificação de citocinas por ELISA.....	81
11.10	Quantificação de Óxido Nítrico (NO).....	82
11.11	ELISA indireto para IgG anti- <i>N. caninum</i> .....	82
11.12	Análise estatística.....	83
11.13	Normas de Biossegurança .....	84
12	RESULTADOS .....	84
12.1	IFN-tipo I é importante para a resistência do hospedeiro durante a infecção por <i>N. caninum</i> .....	84
12.2	A produção de IFN-tipo I limita a replicação parasitária e a inflamação tecidual .....	85
12.3	IFN-tipo I modula positivamente a produção de IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-10 e NO, mas não interfere na produção de anticorpos específicos anti- <i>N. caninum</i> .....	88
13	DISCUSSÃO .....	91
14	CONCLUSÃO .....	95
15	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
	ANEXO 1 – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal .....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99

## RESUMO

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa e é o agente causador da neosporose, doença de grande importância médico- veterinária por causar abortos repetidos em bovinos ocasionados pela transmissão transplacentária do parasito, gerando grandes perdas econômicas em setores de corte e de leite. A importância econômica da neosporose tem levado a diversas pesquisas no desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento desta infecção, incluindo pesquisas relacionadas a imunidade inata contra esse parasito. Nesse contexto, nosso trabalho teve como objetivo o estudo da participação das vias inatas de reconhecimento de ácidos nucleicos, TLR3-TRIF e cGAS-STING, bem como de seu produto comum IFN-tipo I na infecção por *N. caninum*. Nós observamos que camundongos TLR3<sup>-/-</sup> e TRIF<sup>-/-</sup> apresentam altas cargas parasitárias, aumento de inflamação tecidual e produção reduzida de IL-12p40, TNF, IFN- $\gamma$  e óxido nítrico. Além disso, demonstramos que o RNA de *N. caninum* recruta TLR3 para o vacúolo parasitóforo e induz a translocação de IRF3 para o núcleo celular, induzindo a produção de IFN-tipo I. Vimos também que a expressão gênica de TRIF é aumentada durante a infecção pelo parasito em macrófagos, induzindo, por sua vez, aumento da expressão de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  e em macrófagos TRIF<sup>-/-</sup> infectados houve redução de produção de IL-12p40, a qual foi completamente reestabelecida com a reposição de IFN- $\alpha$  recombinante. Nosso próximo objetivo foi verificar se, assim como o RNA, o DNA de *N. caninum* teria a mesma capacidade de ativação e indução de IFN-tipo I, sendo nesse caso, reconhecido pela via de cGAS-STING. Nossos resultados demonstraram que o DNA de *N. caninum* é capaz de induzir a produção de altas concentrações de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Além disso, observamos que taquizoítos de *N. caninum* induzem o recrutamento citosólico de cGAS e STING após a invasão celular e esse recrutamento ocorre devido ao reconhecimento de seu DNA por esses sensores de ácidos nucleicos. Nós confirmamos no modelo de estudo de *Neospora*, que a via de cGAS-STING é essencial para a produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , visto que a infecção de células STING<sup>-/-</sup> com taquizoítos do parasito ou estímulo com seu DNA gera níveis drasticamente reduzidos dessas citocinas. Observamos ainda que STING modula positivamente a produção de IL-12 e IL-10, que são citocinas importantes na resposta imune contra *N. caninum*, e que o controle da replicação parasitária em macrófagos infectados é prejudicado na ausência dessa molécula. Por fim, nós avaliamos a importância de IFN-tipo I,

produto comum das vias de TLR3 e cGAS, na resistência de camundongos infectados pelo protozoário *N. caninum*. Para isso, analisamos os índices de morbidade e mortalidade em animais WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* monitorados por 30 dias após a infecção e foi observado que na ausência de IFN-tipo I os camundongos são mais suscetíveis a infecção. Em seguida, realizamos infecções aguda e crônica para análises de parasitismo e inflamação tecidual, produção de citocinas, óxido nítrico e anticorpos específicos. Pudemos observar que os camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> apresentaram maior carga parasitária nas células do lavado peritoneal, pulmões, fígado e cérebro quando comparados aos WT. Além disso, os animais *knockout* demonstraram grau moderado de inflamação tecidual hepática e cerebral, com múltiplos focos inflamatórios e, ocasionalmente, aparecimento de lesões necróticas, enquanto que os animais WT apresentaram leve grau de inflamação. Em relação a produção de citocinas, vimos que na ausência de IFN-tipo I a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  é comprometida no soro, lavado peritoneal e fígado dos animais infectados, além de a produção de óxido nítrico também ser reduzida. Para confirmar esses resultados, realizamos dosagem de citocinas também *in vitro*, em sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup>, e observamos que durante a infecção por *N. caninum* há significativa redução da produção de IL-12 e IL-10 nos macrófagos *knockout* em comparação aos WT. Por fim, avaliamos a influência de IFN-tipo I na produção de anticorpos anti-*N. caninum* e observamos que essas citocinas não possuem influência direta no desenvolvimento da resposta imune humoral durante o curso da infecção. Em conjunto, nossos resultados mostram que o RNA de *N. caninum* é reconhecido pela via de TLR3-TRIF, a qual atua na resistência de camundongos infectados controlando o parasitismo e inflamação tecidual, marcadores importantes da doença. Além disso, o DNA de *N. caninum* é reconhecido pela via de cGAS-STING e induz a produção de IFN-tipo I, que age juntamente com a resposta imune do tipo Th1 para controle da replicação parasitária e aumento da resistência celular frente a infecção.

**Palavras-chave:** *Neospora caninum*, TLR3, TRIF, cGAS, STING, IFN-tipo I.

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is an obligatory intracellular parasite that belongs to the phylum Apicomplexa and is the causative agent of neosporosis, a disease of great importance in veterinary medicine to cause repeated abortions in cattle by the transplacental transmission of the parasite, generating great economic losses in beef and dairy sectors. The economic importance of neosporosis has led to several studies in the development of strategies for the prevention and treatment of this infection, including researchs related to innate immunity against this parasite. In this context, our work aimed to study the participation of innate pathways of nucleic acid recognition, TLR3-TRIF and cGAS-STING, as well as their common product IFN-type I in *N. caninum* infection. We observed that TLR3<sup>-/-</sup> and TRIF<sup>-/-</sup> mice have high parasite loads, increased tissue inflammation and reduced production of IL-12p40, TNF, IFN- $\gamma$  and nitric oxide. In addition, we demonstrated that *N. caninum* RNA recruits TLR3 for the parasitophore vacuole and induces translocation of IRF3 to the cell nucleus, activating the production of Type I IFN. We also saw that TRIF gene expression is increased during *N. caninum* infection in macrophages, inducing, in turn, increased expression of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  and in infected TRIF<sup>-/-</sup> macrophages there was a reduction in IL-12p40 production, which was completely reestablished with the replacement of recombinant IFN- $\alpha$ . Our next objective was to verify whether, like RNA, the DNA of *N. caninum* would have the same ability to activate and induce Type I IFN, in which case it would be recognized by the cGAS-STING pathway. Our results demonstrated that *N. caninum* DNA is capable of inducing the production of high concentrations of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ . In addition, we observed that *N. caninum* tachyzoites induce cytosolic recruitment of cGAS and STING after cell invasion and this recruitment occurs due to the recognition of its DNA by these nucleic acid sensors. We confirmed in the *Neospora* study model, that the cGAS-STING pathway is essential for the production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , since infection of STING<sup>-/-</sup> cells with tachyzoites or stimulus with their DNA generates dramatically reduced levels of these cytokines. We also observed that STING positively modulates the production of IL-12 and IL-10, which are important cytokines in the immune response against *N. caninum*, and that the control of parasite replication in infected macrophages is impaired in the absence of this molecule. Finally, we evaluated the importance of Type I IFN, a common product of the TLR3 and cGAS pathways, in the resistance of mice infected with the

protozoan *N. caninum*. For this, we analyzed the morbidity and mortality rates in WT and IFNAR<sup>-/-</sup> animals infected with *N. caninum* tachyzoites monitored for 30 days after infection and it was observed that in the absence of Type I IFN, mice are more susceptible to infection. Then, we performed acute and chronic infections for analysis of parasitism and tissue inflammation, production of cytokines, nitric oxide and specific antibodies. We observed that the IFNAR<sup>-/-</sup> mice had a higher parasite load on the cells of the peritoneal lavage, lungs, liver and brain when compared to WT. In addition, the knockout animals showed a moderate degree of hepatic and brain tissue inflammation, with multiple inflammatory foci and, occasionally, the appearance of necrotic lesions, while the WT animals showed a mild degree of inflammation. Regarding the production of cytokines, we saw that in the absence of Type I IFN, the production of IL-12 and IFN- $\gamma$  is compromised in the serum, peritoneal lavage and liver of infected animals and the production of nitric oxide also being reduced. To confirm these results, we performed cytokine dosage also in vitro, in culture supernatant of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from WT and IFNAR<sup>-/-</sup> mice, and we observed that during the *N. caninum* infection there is a significant reduction in production of IL-12 and IL-10 in knockout macrophages compared to WT. Finally, we evaluated the influence of Type I IFN on the production of anti-*N. caninum* antibodies and we observed that these cytokines have no direct influence on the humoral immune response development during the course of the infection. Together, our results showed that *N. caninum* RNA is recognized by the TLR3-TRIF pathway, which acts on the resistance of infected mice by controlling parasitism and tissue inflammation, important markers of the disease. In addition, *N. caninum* DNA is recognized by the cGAS-STING pathway and induces the production of IFN-type I, which acts together with the Th1-type immune response to control parasite replication and increase cell resistance to infection.

**Keywords:** *Neospora caninum*, TLR3, TRIF, cGAS, STING, Type I IFN.

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 *Neospora caninum* e seus hospedeiros

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

Canídeos têm sido descritos como seus hospedeiros definitivos - por exemplo, cães, coiotes, lobos e dingos australianos, enquanto bovinos, ovinos, caprinos, veados, cavalos, búfalos asiáticos, porcos, pombos e outras espécies de vertebrados homeotermos agem como seus hospedeiros intermediários naturais (ALMERIA; LOPEZ-GATIUS, 2013; DONAHOE et al., 2015; DUBEY et al., 2011; GUI et al., 2020; KING et al., 2010; MINEO et al., 2009b; REICHEL et al., 2015; SYED-HUSSAIN et al., 2015).

Algumas evidências sugerem que a neosporose possui potencial zoonótico, devido a presença de anticorpos específicos encontrados em humanos infectados com o vírus HIV ou desordens neurológicas (LOBATO et al., 2006; OSHIRO et al., 2015). Entretanto, são achados controversos, por não haver isolamento do parasito em humanos ou associação de sua presença com sintomatologia clínica (CALERO-BERNAL et al., 2019; PETERSEN et al., 1999).

## 1.2 Morfologia e ciclo biológico

*N. caninum* se caracteriza por apresentar um ciclo de vida heteroxeno, com fases assexuada e sexuada, sendo que a reprodução assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários e a fase sexuada ocorre no intestino de seus hospedeiros definitivos. Durante o seu ciclo, o parasito

apresenta três principais estágios: taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos teciduais e esporozoítos presentes dentro de oocistos, sendo que todas as formas podem transmitir a infecção (DUBEY; SCHARES, 2011; EIRAS et al., 2011).

Os taquizoítos representam a forma proliferativa do parasito e são capazes de invadir e replicar em diferentes tipos celulares, *in vivo* e *in vitro*. Caracterizam-se como a forma parasitária responsável por disseminar a infecção, causando dano tecidual e com potencial de transmissão por via transplacentária ao feto (GARCIA-SANCHEZ et al., 2019). São ovoides, redondos ou em forma de meia-lua, com o núcleo na posição central ou terminal, e medem aproximadamente 6 x 2 µm, dependendo do estágio de crescimento e divisão, e do plano de corte nos tecidos (LINDSAY; DUBEY, 2020).

Para sobreviver dentro do hospedeiro, *N. caninum* desenvolveu um conjunto de mecanismos que direcionam diversas respostas adaptativas, desse modo, sob pressão fisiológica e/ou do sistema imune, o parasito consegue realizar conversão de formas taquizoítas em bradizoítos, como forma de adaptação (HEMPHILL; AGUADO-MARTINEZ; MULLER, 2016; LINDSAY; DUBEY, 2020). Em um hospedeiro imunocompetente, acontecem por volta de 20 divisões das formas taquizoítas antes da sua diferenciação em bradizoítos (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013), os quais possuem multiplicação lenta, caracterizam a fase crônica da doença e são encontrados em cistos teciduais no sistema nervoso central, na retina e no músculo esquelético nos diversos hospedeiros (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

Os bradizoítos medem cerca de 8 x 2µm apresentam forma alongada (DUBEY; THULLIEZ, 2005), um núcleo subterminal e de 6 a 12 roptrias (DUBEY et al., 2002). Cerca de 20 a 100 bradizoítos ficam inclusos em cistos teciduais, os quais caracterizam o estágio latente da infecção, geralmente são redondos ou ovais, podendo medir até 100 µm de comprimento com uma parede dupla de até 4 µm. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro, enquanto nos bezerros com neosporose congênita, os cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal (DUBEY et al., 2006). Acredita-se que os bradizoítos sejam a forma evolutiva que mais frequentemente dá origem a infecção oral de canídeos após ação predatória sobre hospedeiros intermediários, resultando em oocistos nas fezes e disseminação da infecção (LINDSAY; DUBEY, 2020).

Os oocistos de *N. caninum* são excretados na forma não esporulada nas fezes dos hospedeiros definitivos e medem de 10 a 12 µm de diâmetro. Atualmente, pouco se sabe em relação

à frequência de liberação e o tempo de sobrevivência dos oocistos no ambiente (LINDSAY; DUBEY, 2020). Os esporozoítos são o produto final da fase sexuada, alongados e possuem dimensão de 6,5 x 2,0. Durante o processo de esporulação eles se desenvolvem dentro dos oocistos, os quais se tornam infectantes após três dias no ambiente e contêm dois esporocistos (medindo cada um 8,4 x 6,1 µm) cada um com quatro esporozoítos cada (DUBEY et al., 2002).

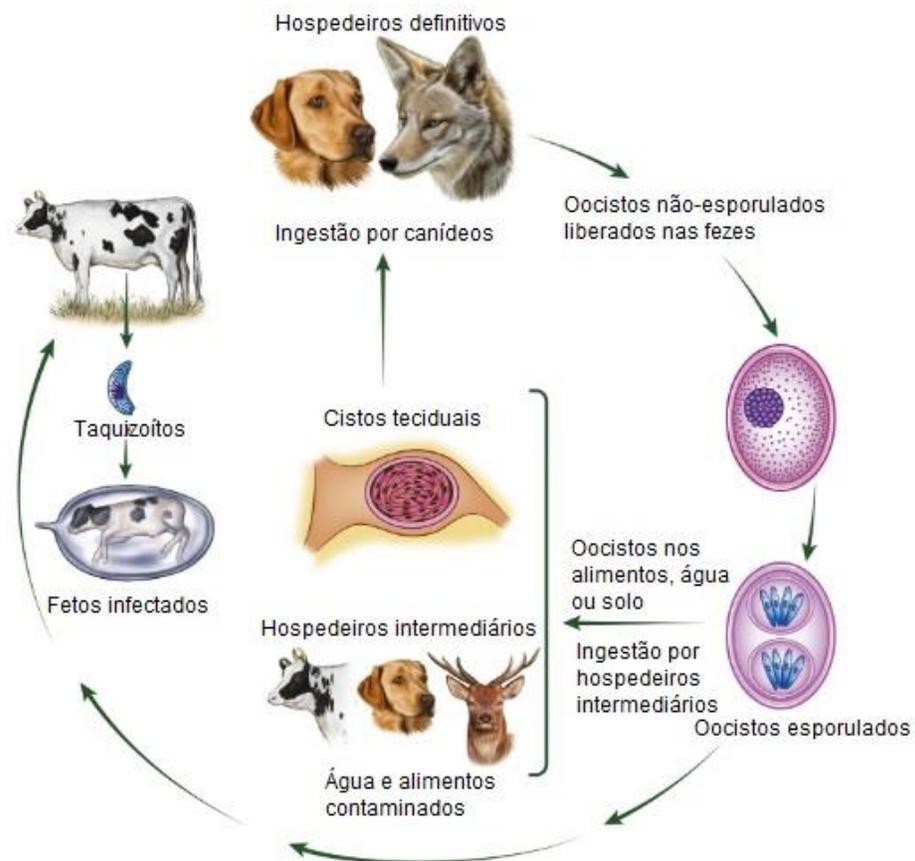
O ciclo da neosporose (**Figura 1**) se inicia pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de presas ou oocistos contidos na água e alimentos. Os cistos e oocistos passam por digestão químico-enzimática no estômago e duodeno, liberando as formas infectantes na luz intestinal. Os esporozoítos são liberados no trato digestivo invadindo as células epiteliais, leucócitos e fibroblastos e se multiplicam por endodiogenia, formando vacúolos que rompem as células hospedeiras quando estão repletos de taquizoítos (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; LINDSAY; DUBEY, 2020). Os parasitos migram para o tecido linfóide associado à mucosa intestinal e são disseminados para todo o organismo por meio da circulação linfática, sanguínea e por via ascendente por tecidos nervosos periféricos (LINDSAY; DUBEY, 2020).

Após alguns ciclos de multiplicação do parasito e pela pressão exercida pelo sistema imune do hospedeiro, taquizoítos dão origem a bradizoítos e formam novos cistos teciduais (GOODSWEN et al., 2013). Quando os cistos são ingeridos por hospedeiros definitivos, bradizoítos são liberados, invadem células epiteliais do intestino delgado e culminam com o desenvolvimento da fase sexuada (gamogonia) com produção final de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos), que são eliminados com as fezes (LINDSAY; DUBEY, 2020).

No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados, que ocasionam a transmissão horizontal de *N. caninum* aos bovinos e demais hospedeiros intermediários ao serem ingeridos através de água ou alimentos contaminados (DONAHOE et al., 2015).

A transmissão transplacentária ou congênita foi demonstrada em bovinos e em cães infectados experimentalmente (DUBEY et al., 1992). No caso dos bovinos, diversos estudos demonstram que esta é considerada a via de transmissão mais importante, podendo ocorrer por diversas gerações (BENAVIDES et al., 2012; GOODSWEN et al., 2013; REGIDOR-CERRILLO et al., 2015). Embora *N. caninum* tenha sido encontrado no leite (MOSKWA et al., 2007) e no sêmen (FERRE et al., 2005) de bovinos naturalmente infectados, essas rotas de transmissão horizontal são consideradas improváveis (LINDSAY; DUBEY, 2020).

*N. caninum* também realiza seu ciclo de vida em animais silvestres, os quais poderiam atuar como reservatórios do parasito, apesar da necessidade de se elucidar a frequência real com que tal processo ocorre na natureza (DONAHOE et al., 2015). Casos clínicos de neosporose foram reportados em rinocerontes, guaxinins, cervos, alpacas, lhamas e antílopes (DUBEY et al., 2017). Além disso, cães, vacas, carneiros, cabras, búfalos, raposas, coiotes, lobos, veados, alpacas, camelos e pombos têm sido identificados como hospedeiros naturais, a partir do isolamento parasitário em tecidos bem como a detecção de anticorpos específicos por ensaios sorológicos (COSTA et al., 2008; DE BARROS et al., 2018; DUBEY, 2003; GONDIM, 2006; MINEO et al., 2011). Sabe-se que os cavalos podem ser infectados por uma outra espécie de *Neospora*, *N. hughesi* (MARSH et al., 1998), para qual não se tem informações a respeito de infecções outros animais (LINDSAY; DUBEY, 2020).



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

ou por comer cistos teciduais. Transmissão vertical: taquizoítos podem ser transmitidos via transplacentária. (Adaptado de Lindsay e Dubey, 2020).

### 1.3 Patogênese e sinais clínicos

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

A invasão celular pelo estágio infectante do parasito é composta por vários processos. Primeiramente, ocorre uma interação entre o parasito e a célula hospedeira, envolvendo várias proteínas de superfície como NcSAG1 e NcSRS2, que são ancoradas na superfície do parasito por moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) Em sequencia, o parasito sofre uma reorientação para que sua proeminência apical entre em contato com a superfície celular, ocasionando uma invaginação de membrana para a formação do vacúolo parasitóforo, secretando diferentes proteínas de micronemas, como as MIC1, 2, 3, 4, 6, 19 e 26, que possuem função de adesinas e formam uma junção do tipo irreversível (*tight junction*). Após a formação desta junção, o taquizoíto é envolto pelo vacúolo parasitóforo, com a participação do seu citoesqueleto, resultando na invasão celular propriamente dita (FEREIG; NISHIKAWA, 2020; KELLER et al., 2002; KELLER et al., 2004; LI et al., 2015; NAGULESWARAN et al., 2001; PEREIRA et al., 2011; REID et al., 2012).

Como a membrana celular é a mesma que forma o vacúolo parasitóforo, o mesmo não se funde com os lisossomos. Posteriormente, ocorre a secreção de proteínas de roptrias como ROP 1 e 2 no interior do vacúolo parasitóforo, a fim de estender a sua membrana para que se possa formar uma associação com as organelas celulares do hospedeiro. Além disso, muitas proteínas de roptrias de *N. caninum* foram identificadas e caracterizadas como fatores de virulência, dentre elas ROP18, 5, 40 e 16 (LEI et al., 2014; MA et al., 2017b; PASTOR-FERNANDEZ et al., 2016). Finalmente, a membrana do vacúolo é modificada pelas proteínas de grânulos densos, que contribuem para a maturação do vacúolo parasitóforo e formação de uma rede de membrana metabolicamente ativa, que promove o crescimento e sobrevivência do parasito no interior do vacúolo. Diversas proteínas de grânulos densos de *N. caninum* já foram identificadas, dentre elas GRA1, 2, 6, 7, 9, 14 (ALVAREZ-GARCIA et al., 2007; ATKINSON et al., 2001; ELLIS et al., 2000; LEINWEBER

et al., 2017; LIDDELL et al., 1998; LIU et al., 2013). Os taquizoítos se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo por endodiogenia, até subsequente lise celular e liberação de novos taquizoítos, que se encontram livres para infectar vários tecidos e células (FEREIG; NISHIKAWA, 2020; NAGULESWARAN; MULLER; HEMPHILL, 2003).

Devido à rápida multiplicação de taquizoítos na fase aguda, o agente pode causar a morte celular, com conseqüentes lesões necróticas em poucos dias, acarretando problemas neuromusculares, como encefalomielite em filhotes caninos e deformidades congênitas em membros de bovinos outros hospedeiros intermediários. Apesar da ampla variedade de espécies acometidas por *N. caninum*, bovinos e cães são os hospedeiros que apresentam sinais clínicos mais expressivos (DUBEY; LINDSAY, 1996; EIRAS et al., 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

A patogênese do aborto causado por *N. caninum* em bovinos não é completamente entendida, mas sabe-se que sua indução ocorre principalmente pela parasitemia materna transmitida pela placenta ao feto durante a gestação que acomete tanto gado de corte como de leite, do 3º mês até o final da gestação, sendo mais comum entre o 5º e o 6º mês. Outras conseqüências clínicas da neosporose bovina incluem reabsorção, autólise fetal dentro do útero, natimortos e recém-nascidos com sinais clínicos. (FEREIG; NISHIKAWA, 2020; LINDSAY; DUBEY, 2020). Além disso, há evidências de que respostas inflamatórias induzidas pelo parasito na interface materno-fetal prejudique a gestação, causando lesões em tecidos fetais ocasionadas pela multiplicação do parasito, além de danos na placenta que interrompem o fornecimento de nutrientes e oxigênio (CANTON et al., 2014; DUBEY et al., 2002; INNES et al., 2005).

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

Dentre os bezerros congenitamente infectados por *N. caninum*, até 95% podem permanecer clinicamente normais. Já o aparecimento dos sinais clínicos ocorre somente até os 2 meses de

idades, incluindo sinais neurológicos, perda de peso, incapacidade de se levantar e flexão ou hiperextensão de membros. Além disso, ocasionalmente podem aparecer defeitos congênitos como hidrocefalia e estreitamento da medula espinhal (DUBEY et al., 2017; LINDSAY; DUBEY, 2020).

A neosporose canina ocorre geralmente como infecção sub-clínica persistente que pode se reativar durante processos de imunossupressão ou gestação, resultando nesse caso em parasitemia materna e transmissão transplacentária para o feto. Assim, ninhadas sucessivas podem estar infectadas (DUBEY et al., 2002), embora em menor grau de transmissão vertical, sugerindo que a exposição pós-natal é necessária para manter o parasito na população canina. Cães de todas as idades são suscetíveis a infecção, no entanto, os casos mais graves ocorrem em filhotes congenitamente infectados (FEREIG; NISHIKAWA, 2020). Sinais clínicos que podem ocorrer incluem dificuldade na deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia dos nervos faciais e falência cardíaca (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 2003; DUBEY; SCHARES, 2011). Além disso, a neosporose canina pode causar poliradiculoneurite, encefalite, polimiosite e paralisias, sendo a paralisia ou paresia dos membros posteriores o sinal mais consistente da infecção neonatal (DONAHOE et al., 2015; DUBEY; SCHARES, 2011). Também há relatos de neosporose cutânea, em que há presença de um grande número de taquizoítos nas lesões, sugerindo um descontrole da resposta imune do hospedeiro (LEGNANI et al., 2016; MANN et al., 2016).

#### **1.4 Resposta imune contra *N. caninum***

Os mecanismos protetores contra o parasito *N. caninum*, envolvem tanto a resposta imune inata quanto adaptativa. Predominantemente, a proteção do hospedeiro é induzida por um tipo Th1 de resposta imune, produzindo IL-12 e IFN- $\gamma$  em colaboração com respostas celulares que atuam para controlar o parasitismo tecidual (FEREIG; NISHIKAWA, 2020; MONNEY; HEMPHILL, 2014). Estudos utilizando modelos experimentais de neosporose em camundongos mostraram que a presença do parasito induz recrutamento intenso de macrófagos para o sítio da infecção (ABE et al., 2014). Além disso, células dendríticas possuem papel primordial no controle parasitário, produzindo grandes concentrações de IL-12 nas fases iniciais da infecção e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são determinantes no controle da neosporose em diversos hospedeiros principalmente via

produção de IFN- $\gamma$  (CORREIA et al., 2013; OROZCO; MORALES; SALMERON, 2013; TANAKA et al., 2000). Nesse contexto, proteínas específicas do parasito como SAG1, SRS2, GRA2, MIC3, GRA7 e MIC11 foram identificadas como imunogênicas para estimulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (ROCCHI et al., 2011).

Nos primeiros momentos da infecção a primeira barreira a ser enfrentada pelo coccídeo consiste na secreção, pelos enterócitos infectados, de moléculas citotóxicas como o óxido nítrico e citocinas como a IL-15, que induzem as células *natural killer* (NK) a produzir IFN- $\gamma$  e quimiocinas. Modelos de estudo de *Neospora* em bovinos sugerem, por fenotipagem celular de sangue periférico, que as células NK decaem nos dias 4-6 da infecção mas voltam a aumentar nos dias 11-15 juntamente com linfócitos T CD8<sup>+</sup>, contribuindo para a produção de IFN- $\gamma$  e recrutando leucócitos polimorfonucleares, células dendríticas e macrófagos para o sítio da infecção (KLEVAR et al., 2007).

Outra barreira a ser enfrentada são as espessas junções intercelulares da mucosa intestinal que tentam deter a invasão do parasito pela via oral (MARCAIS et al., 2013). Análises do tecido intestinal de um cão jovem infectado naturalmente com *N. caninum* detectaram infiltrados de eosinófilos, macrófagos, além de hemorragias multifocais que contribuiriam para a atrofia e necrose desse tecido. Além disso foram encontradas estruturas semelhantes a oocistos e esquizontes no epitélio, indicando a importância de uma resposta imune nas células intestinais dos hospedeiros (KUL et al., 2015).

A resposta imune inata desencadeada pela infecção por *N. caninum* desempenha um papel importante na proteção do hospedeiro. Inicialmente, o parasitismo é controlado pela produção de IFN- $\gamma$  e IL-12p40, derivados da sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T auxiliares (TCD4<sup>+</sup>). IL-12 em conjunto com IFN- $\gamma$ , criam um ambiente pró-inflamatório essencial ao combate ao parasito impedindo sua replicação, destruindo as células infectadas, neutralizando os parasitos extracelulares e induzindo a formação de cistos teciduais (DONAHOE et al., 2015; MINEO et al., 2009a; MONNEY; HEMPHILL, 2014). Além disso, células natural killer (NK) e células T citotóxicas (TCD8<sup>+</sup>) atuam na primeira linha de defesa, realizando a lise das células infectadas com formas taquizoítas e induzindo produção de citocinas (FEREIG; NISHIKAWA, 2020; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Além de destruir células infectadas, linfócitos TCD8<sup>+</sup> contribuem para controlar as infecções agudas devido à produção de IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos. Deste modo, IFN- $\gamma$

representa um dos principais mediadores de resistência através da ativação dos macrófagos, os quais produzem intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio, inibindo as enzimas necessárias para a replicação do parasito (COOMBS et al., 2020; CORREIA et al., 2015).

Outra citocina que possui participação ativa na resposta imune celular contra *N. caninum* é a IL-10, a qual controla as lesões locais e sistêmicas geradas pela infecção por possuir um efeito inibitório sobre a atividade microbicida dos macrófagos, produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 e diferenciação de clones Th1 (JESUS et al., 2013; MINEO et al., 2010).

Para que haja uma resposta imune efetiva do hospedeiro no combate ao parasito sem lesões teciduais exacerbadas, é necessário um balanço entre a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 em busca da homeostasia. Quando é estabelecida a predominância da resposta pró-inflamatória Th1 em bovinos infectados com *N. caninum*, a gestação frequentemente é prejudicada, podendo resultar em aborto ou reabsorção fetal. De modo contrário, a maior produção de citocinas regulatórias e/ou anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 promove a continuidade da gestação, visto que a sobrevivência fetal é estritamente relacionada à sua competência imunológica (ALMERIA; SERRANO-PEREZ; LOPEZ-GATIUS, 2017).

As células que participam da resposta imune inata expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), tais como os receptores Toll-like (TLRs), Nod-like (NLR), RIG-I-like (RLR) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (DA SILVA et al., 2017; YAROVINSKY, 2014) e diversos sensores de reconhecimento de ácidos nucléicos, tais como cGAS, STING, DAI, IFI16 e DDX41 (PANDEY; KAWAI; AKIRA, 2014). Todos os PRRs necessitam de moléculas adaptadoras que são responsáveis pelo recrutamento de proteínas quinases e fatores de transcrição que levarão à transcrição do sinal, seja ele para produção de citocinas inflamatórias ou produção de citocinas relacionadas a Interferon Tipo I (YAROVINSKY, 2014).

São reconhecidos treze diferentes receptores do tipo Toll em vertebrados, os quais utilizam principalmente MyD88 (Fator 88 de diferenciação mielóide) e/ou TRIF (Molécula indutora de interferon- $\beta$  com domínio TIR), para a realização da transcrição do sinal. Em camundongos, os TLRs podem estar associados às membranas celulares (TLR1, 2, 4, 5, 6) ou endossomas (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 e 13) (CHEN; SZODORAY; ZEHER, 2016; VIJAY, 2018). Todos os TLRs, exceto TLR3, compartilham a mesma proteína adaptadora, MyD88. TLR3 transcreve sinais somente via TRIF, e TLR4, sinaliza através de ambas as vias, dependendo do estímulo. Isto torna o processamento de um sinal de TLR4 relativamente complexo, em comparação com outros

receptores da família TLR (CHEN et al., 2018; JIMENEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2016).

A via de sinalização dependente de MyD88 leva a ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e MAPK, que codificam a expressão de mediadores pró-inflamatórios (MINEO et al., 2009a). Já a via dependente da molécula adaptadora TRIF ativa fatores regulatórios de Interferon (IRFs) resultando na produção de Interferon do tipo I (IFN-I) e citocinas pró-inflamatórias (MCALLISTER et al., 2013; MIRANDA et al., 2019).

Diversos estudos mostraram que *N. caninum* é capaz de ativar receptores do tipo Toll. Durante a infecção, o receptor TLR2 induz a ativação de células apresentadoras de antígenos e produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , levando a uma polarização de respostas imunes para um perfil Th1 (MINEO et al., 2010). Além disso, foram identificadas proteínas específicas do parasito que interagem com TLR2, como GPIs, ROP2 e ROP40, sendo por esse motivo consideradas como potenciais antígenos vacinais (AGUADO-MARTINEZ et al., 2019; DEBARE et al., 2019). No caso de TLR3, foi demonstrado que esse receptor atua no reconhecimento do RNA de *N. caninum* com posterior indução de citocinas do grupo IFN- tipo I, sendo essa via de sinalização importante para a resistência de camundongos infectados (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019). A infecção experimental em cães e camundongos com *N. caninum* mostrou que TLR4 é essencial para a proteção desses hospedeiros (BOTELHO et al., 2007; NECESANKOVA et al., 2016). A ativação pelo parasito também ocorre para TLR11, causando *up-regulation* de IL-12 por meio da proteína quinase ERK e transcrição de sinal via MAPK (JIN et al., 2017). No caso de bovinos, sabe-se que os receptores endossomais TLR3, 7, 8 e 9 podem ser ativados tanto por taquizoítos de *N. caninum*, quanto por seu antígeno solúvel ou proteínas específicas, como SAG1, HSP70 e GRA7 (MARIN et al., 2017). A proteína adaptadora MyD88 foi descrita na literatura como importante na resistência do hospedeiro infectado por *N. caninum*, de modo que camundongos MyD88<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos do parasito apresentaram 100% de mortalidade, descontrole da replicação parasitária, baixas produções de IL-12 por células dendríticas e respostas dependentes de IFN- $\gamma$  prejudicadas, demonstrando que MyD88 é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune apropriada (MINEO et al., 2009a).

Em relação aos receptores semelhantes a NOD (NLRs), foi visto que a via de sinalização ativada por NOD-2, que é colocalizado com o vacúolo parasitóforo, atua no controle da replicação parasitária de *N. caninum*, entretanto, intensifica a inflamação gerada pela infecção gerando grave

patogênese e morte do hospedeiro (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). Esse efeito deletério também foi observado para o receptor dectina-1, visto que camundongos geneticamente deficientes para essa molécula apresentaram resistência a infecção por *N. caninum* bem como alta produção de IL-12p40 (DA SILVA et al., 2017).

Resultados *in vitro* demonstraram que em macrófagos peritoneais e derivados de medula óssea de camundongos infectados por taquizoítos de *N. caninum* ocorre a ativação do receptor NLRP3 do inflamassoma, importante complexo multiprotéico que detecta patógenos, associado com liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, clivagem de caspase-1 e morte celular. Já a infecção de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC e caspase-1/11 resultou em baixas produções de IL-18 e IFN- $\gamma$  no soro, infiltrado inflamatório e altas cargas parasitárias nos sítios da infecção, sugerindo um papel desse receptor no controle da replicação parasitária (WANG et al., 2018).

Quanto aos fatores de transcrição das principais vias inatas de sinalização, sabe-se que as proteínas GRA6, GRA7 e GRA14 são ativadoras de NF- $\kappa$ B (NISHIKAWA et al., 2018) e a proteína Nc14-3-3 de *N. caninum* é considerada molécula-chave para a ativação de MAPK e NF- $\kappa$ B, com consequente produção das citocinas IL-6, IL-12p40 e TNF (LI et al., 2019). Ainda em relação a via das MAPK, foi reportado que *N. caninum* manipula a fosforilação de p38 como mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro, visto que a infecção de macrófagos com taquizoítos do parasito ou estímulo com extrato antigênico rapidamente induz fosforilação de p38, e o bloqueio dessa molécula *in vivo* induz aumento da produção de IL-12, redução de carga parasitária e indução de resistência em camundongos infectados por *N. caninum* (MOTA et al., 2016). Além disso, a infecção de macrófagos murinos imortalizados com taquizoítos do parasito induz translocação nuclear de IRF3 e produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (MIRANDA et al., 2019) e a secreção da proteína ROP16 em fibroblastos humanos infectados resulta na ativação e translocação nuclear de STAT3 (MA et al., 2017a).

Sabe-se que a resposta imune humoral também possui importante papel na resistência do hospedeiro. Camundongos deficientes em linfócitos B infectados por *N. caninum* apresentaram alta suscetibilidade a infecção, além de baixa produção de IFN- $\gamma$  quando comparados aos animais WT (EPERON et al., 1999). Em bovinos, alguns autores relatam que os níveis de anticorpos variam durante a gestação e estão relacionados ao alto risco de aborto (BRICKELL; MCGOWAN; WATHES, 2010; YANIZ et al., 2010). Além disso, ocorre a produção de subclasses IgG1 e IgG2 durante a infecção, sendo que IgG2 é encontrada em maior concentração que IgG1 (MOORE et

al., 2011). Estudos em bovinos demonstram que a presença de IFN- $\gamma$  (Th1) favorece a produção de anticorpos IgG2, enquanto que a IL-4 (Th2) regula a síntese de anticorpos IgG1 (ESTES; CLOSSER; ALLEN, 1994; ESTES et al., 1995). Em um estudo realizado na Espanha em 2011, os maiores níveis de IgG2 foram relacionados com proteção contra o aborto em bovinos de corte, mas não em gado leiteiro. Segundo os autores, uma possível explicação para isso seria que a IgG2 por si só não é suficiente para proteger contra o aborto, mas tem de ser associada com alta produção de IFN- $\gamma$ , que é o caso do gado de corte, e não do gado leiteiro (SANTOLARIA et al., 2011).

Após uma infecção primária por *N. caninum*, bovinos apresentam anticorpos específicos das subclasses IgM e IgG. Os níveis de IgM possuem níveis detectáveis a partir da segunda semana e decrescem sua concentração após 4 semanas de infecção. Em contrapartida, os níveis de IgG aumentam na primeira semana de infecção podendo permanecer até 6 meses após o contato com o parasito (TREES; WILLIAMS, 2005; WILLIAMS et al., 2009).

As proteínas de grânulos densos de *N. caninum* são as principais moléculas detectadas por anticorpos específicos em diversos hospedeiros, no entanto, outras proteínas de superfície também apresentaram alta reatividade com anticorpos (FEREIG; NISHIKAWA, 2020). Sabe-se de maneira geral, que os anticorpos específicos possuem a capacidade de neutralizar e opsonizar os parasitos, limitando a replicação de formas taquizoítas de *N. caninum*. Entretanto, a participação específica das imunoglobulinas, bem como das células B que as produzem, precisa ser melhor elucidada.

### **1.5 Controle da neosporose**

O controle da neosporose bovina é baseado principalmente na prevenção da contaminação ambiental com oocistos eliminados nas fezes dos cães, restringindo o acesso desses animais nas proximidades do rebanho e realizando abate de animais infectados (LINDSAY; DUBEY, 2020; MCALLISTER, 2016). Pesquisadores demonstraram que em cães errantes e de áreas rurais a prevalência da neosporose é maior do que em cães da área urbana (MINEO et al., 2004). Tal fato pode estar associado a proximidade destes animais com áreas de criação de gado, onde muitas

vezes tem-se a exposição de restos de anexos placentários, carcaças e fetos abortados que são ingeridos pelos cães e que podem estar contaminados (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).

Até o momento não existem medicamentos eficazes para a eliminação de cistos teciduais, assim as estratégias de manejo nas fazendas se tornam essenciais para impedir a permanência do parasito nos rebanhos bovinos. O abate de vacas soropositivas e a transferência de embriões para vacas soronegativas são formas de diminuir a transmissão vertical de *N. caninum*, no entanto, essas estratégias não são financeiramente viáveis para os pecuaristas e acabam não sendo frequentemente adotadas (LINDSAY; DUBEY, 2020).

Tratamentos profiláticos baseados em vacinas que limitem a transmissão vertical e a ocorrência de abortos apresentam o melhor custo-benefício se tratando de ferramentas de controle da neosporose bovina (HORCAJO et al., 2016; LIU; REICHEL; LO, 2020). Uma vacina comercial inativada chamada NeoGuard™ foi moderadamente bem sucedida em testes de campo (WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012), mas posteriormente foi retirada do mercado por falta de dados consistentes associados a prevenção de abortos em bovinos. Muitos estudos envolvendo mecanismos da relação parasito-hospedeiro da neosporose possuem como referência pesquisas relacionados a infecção por *T. gondii*, mas sabe-se que apesar da proximidade filogenética dos dois parasitos, há diferenças imunológicas e moleculares importantes que devem ser exploradas pelas comunidade científica para possibilitar a identificação de potenciais vacinais (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). Nesse contexto podemos citar uma vacina atenuada comercializada contra a toxoplasmose, a Toxovax™, que é licenciada na Europa e Nova Zelândia para o uso em ovelhas, mas não protege contra a neosporose e não pode ser utilizada em outras espécies (HORCAJO et al., 2016).

Atualmente não há nenhuma vacina eficaz contra os abortos em bovinos provocados pela neosporose (LINDSAY; DUBEY, 2020) e desenvolver uma vacina que ganhe aceitação e possa ser comercializada ainda apresenta vários desafios. Com o objetivo de se evitar reversão da virulência durante a gestação, isolados de baixa virulência e com capacidade reduzida de se manter no hospedeiro tem sido testados como possíveis candidatos vacinais. Nesses casos, as cepas podem ser isoladas de animais assintomáticos ou podem sofrer atenuação induzida por alterações de temperatura, múltiplas passagens em cultura celular, irradiação ou manipulação genética (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). A primeira cepa descrita de *N. caninum* com atenuação induzida, Nc-Nowra, apresentou eficácia promissora na prevenção da transmissão exógena da

neosporose e na proteção contra a morte fetal em bovinos. A taxa de proteção variou de 55 a 85% dependendo da via de vacinação (intravenosa x subcutânea) e da condição do parasito (fresco ou criopreservado) (WEBER et al., 2013).

Outra alternativa para o desenvolvimento de uma vacina contra a neosporose é a utilização de tecnologias de nova geração, como proteínas recombinantes, vacinas de DNA/RNA ou vetores vacinais, que representam a maioria das pesquisas relacionadas a prevenção da neosporose atualmente (MANSILLA et al., 2016; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017; XU et al., 2019). Além disso, outras ferramentas estão sendo empregadas como a combinação de diferentes antígenos, uso de adjuvantes aprimorados e indutores de resposta imunológica, como por exemplo a fusão com ligantes de receptores *Toll-like* (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).

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

## **2 JUSTIFICATIVA**

Dentre os patógenos que causam distúrbios reprodutivos em bovinos, o protozoário *N. caninum* tem requerido atenção especial de produtores e médicos veterinários, devido a sua eficiência em transferir-se para o embrião, bem como por sua capacidade de induzir perdas reprodutivas. A nível global, a perda média devido ao aborto bovino causado pela neosporose, foi estimada em mais de 1.298,3 milhões de dólares anualmente, sendo que aproximadamente dois terços desse prejuízo é devido à queda na produção de leite. Na América do Sul estima-se uma perda econômica de US\$ 239,7 milhões por ano decorrente da infecção pelo parasito. Já no Brasil, a perda foi estimada em 51,3 milhões de dólares ao ano, fato que indica o grande impacto econômico da neosporose em países de essência pecuarista (REICHEL et al., 2013; REICHEL et al., 2015).

A importância econômica da neosporose tem levado a diversas pesquisas no desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento desta infecção, no entanto, até o

momento não há no mercado vacinas que sejam eficazes contra a doença. A recente identificação e caracterização do protozoário ainda não permitiu que diversos mecanismos da resposta imunológica fossem descritos. Assim, elucidar tais características torna-se importante para o entendimento e controle da infecção pelo parasito.

O presente trabalho busca melhor entender a relação entre *N. caninum* e seus hospedeiros, levando-se em consideração o reconhecimento de ácidos nucleicos por receptores da imunidade inata. O trabalho será dividido em 3 capítulos. No capítulo I será apresentado um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual foi observado que, diferentemente de *T. gondii*, o RNA de *N. caninum* é um importante gatilho para a indução de respostas que geram IFN- tipo I por meio de TLR3 e TRIF (MIRANDA et al., 2019).

No Capítulo II, buscando expandir o conhecimento sobre os mecanismos imunológicos a partir do reconhecimento de ácidos nucleicos do parasito, avaliamos também a importância da via de sinalização dependente de cGAS-STING na infecção por *N. caninum*, nos interessando saber se o DNA deste parasito teria também a capacidade de indução de IFN-I observada para o RNA na ativação da via de TLR3-TRIF.

Por outro lado, sabe-se que a infecção por protozoários do filo Apicomplexa é tipicamente associada com a indução de Interferon do tipo II (IFN- $\gamma$ ), enquanto que IFN- tipo I, especialmente IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , são proeminentes em infecção viral (VILLANUEVA et al., 2015). Desse modo, após estudarmos os mecanismos de ativação das vias de TLR3-TRIF e cGAS-STING durante a infecção por *N. caninum*, nosso próximo passo foi avaliar como se dá a influência do grupo de citocinas IFN-tipo I na resistência de camundongos infectados, sendo o objeto de estudo apresentado no Capítulo III.

Acreditamos que essa abordagem sobre o reconhecimento inato de ácidos nucleicos e o desencadeamento de proteção contra a infecção pelo protozoário *N. caninum* nos possibilitará contribuir com informações científicas importantes para o desenvolvimento futuro de uma vacina de nova geração que seja eficaz contra a neosporose, visando aumentar os escores reprodutivos na criação de ruminantes e induzindo, por consequência, melhorias de rendimento e competitividade externa neste importante setor da economia nacional.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das vias de sinalização inata TLR3-TRIF e cGAS-STING, bem como das citocinas IFN-tipo I, na resistência a infecção por *Neospora caninum* *in vivo* e *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- **Capítulo I:** Avaliar a importância da via de TLR3-TRIF na infecção por *N. caninum* *in vivo* e *in vitro*, utilizando camundongos C57BL/6 WT, TLR3<sup>-/-</sup> e TRIF<sup>-/-</sup> infectados e ferramentas de superexpressão gênica em macrófagos murinos imortalizados para observar fenótipos e elucidar os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro.
- **Capítulo II:** Avaliar se o DNA de *N. caninum* é capaz de induzir a ativação da via de sinalização cGAS-STING, bem como a importância dessa via na resistência celular, por meio de técnicas de edição gênica como CRISPR/Cas9 e superexpressão de moléculas.
- **Capítulo III:** Verificar a influência do grupo de citocinas IFN-tipo I *in vivo*, com análises de morbidade, mortalidade, carga parasitária, inflamação tecidual e produção de anticorpos e citocinas em camundongos 129Sv (WT- *wild type*) e 129Sv IFN-ABR<sup>-/-</sup> (geneticamente deficientes para o receptor de IFN-tipo I) infectados com *N. caninum*.

# Capítulo I

A ativação da via de TLR3-TRIF pelo RNA de *Neospora caninum* aumenta o controle da infecção em camundongos

## 4 INTRODUÇÃO

### 4.1 Reconhecimento de RNA e via de sinalização dependente de TLR3-TRIF

TLR3 é um receptor do tipo Toll que é estruturado no retículo endoplasmático e posteriormente é recrutado para os endossomas pela proteína transmembrana UNC93B1 (KIM et al., 2008). Esse receptor possui em sua estrutura um domínio de repetições ricas em leucina (LRRs), que é responsável pelo reconhecimento dos ligantes, um domínio transmembrana e um domínio TIR, que ativa as vias de sinalização intracelular mediadas por TRIF (GOLSHIRI-ISFAHANI; AMIZADEH; ARABABADI, 2018). TLR3 foi inicialmente caracterizado como um sensor de RNA dupla-fita, intermediário comum de replicação viral que pode interagir tanto com o sítio N-terminal quanto C-terminal do receptor. Entretanto, estudos posteriores mostraram que TLR3 também reconhece RNA de dupla fita de origem não-viral, mRNA endógeno e RNA liberado pela necrose celular tanto de processos inflamatórios infecciosos quanto em processos não-patológicos (LIU et al., 2008; PERALES-LINARES; NAVAS-MARTIN, 2013).

O receptor TLR3 é o único que recruta diretamente a molécula adaptadora TRIF para seu domínio TIR para iniciar a via de sinalização após reconhecimento do RNA de dupla fita. Essa individualidade está relacionada ao fato de a molécula TLR3 possuir um resíduo de alanina no seu domínio TIR ao invés de prolina, que é o aminoácido presente nos demais receptores do tipo Toll (RAMNATH et al., 2017). Comprovando essa informação, experimentos demonstraram que uma mutação na Alanina795 de TLR3 para prolina resulta em via de sinalização dependente de MyD88 (VERSTAK; ARNOT; GAY, 2013).

A molécula adaptadora TRIF, também conhecida como TICAM-1, foi inicialmente identificada por Yamamoto e colaboradores em 2002 e possui um domínio TIR que está presente na sua região C-terminal, além de apresentar resíduos de prolina, comum aos TLRs e essencial para ativação das vias de sinalização. A descoberta se deu pelo interesse na identificação das moléculas envolvidas em respostas imunes específicas desencadeadas pelo receptor TLR3 e fator de transcrição IRF3 (Fator Regulador de Interferon 3), ambos independentes de MyD88 (YAMAMOTO et al., 2002).

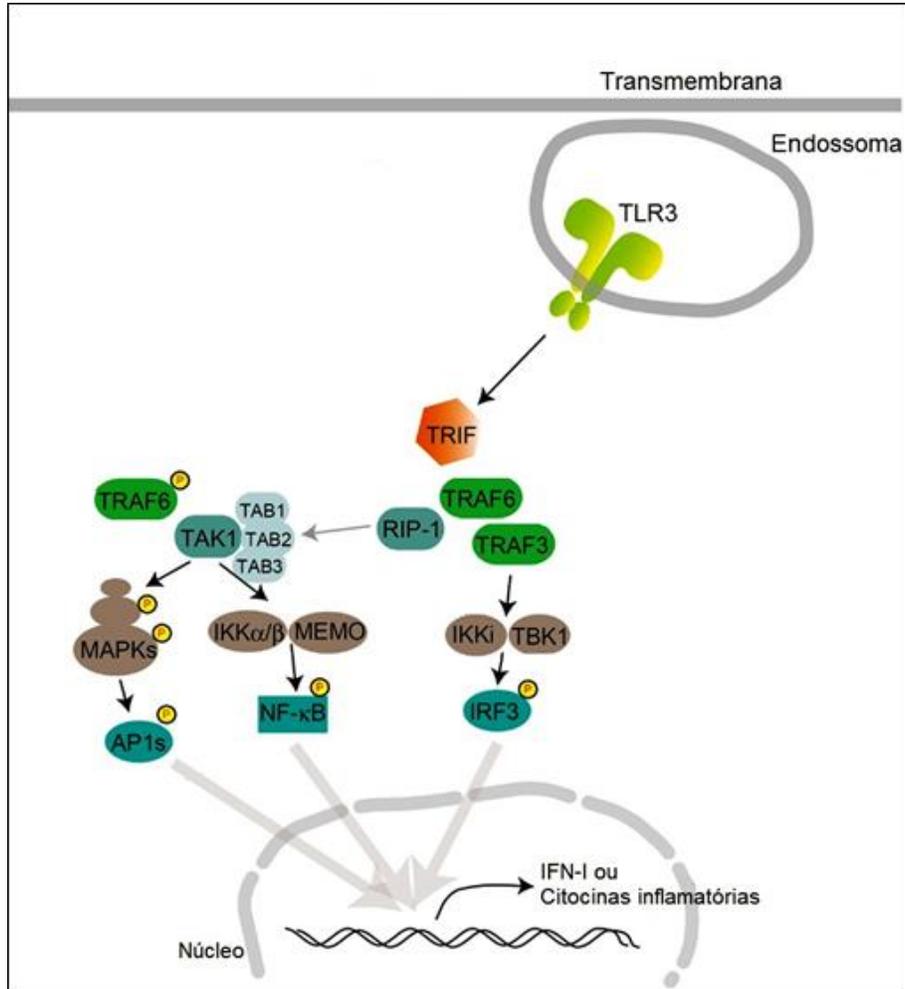
Na região N-terminal de TRIF há proteínas da família TRAF (Fator Associado ao receptor de TNF), sendo elas TRAF6 e TRAF3, as quais ativarão diferentes fatores de transcrição para o estabelecimento de uma resposta imune apropriada contra o antígeno. TRAF6 é responsável por recrutar a proteína quinase RIP-1, que por sua vez fosforila o complexo TAK1 e resulta na ativação de NF- $\kappa$ B e MAPKs para a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias. Quando a interação de TRIF acontece com TRAF3, há o recrutamento de TBK1 e IKKi, que são proteínas quinases relacionadas a IKK e que fosforilam IRF3, induzindo a expressão de genes de IFN-tipo I (KAWASAKI; KAWAI, 2014) (**Figura 2**).

De modo geral, a sinalização derivada do reconhecimento de RNA por TLR3 nos endossomos é realizada exclusivamente via TRIF, que se associa com TBK1 e induz fosforilação em múltiplos resíduos na região C-terminal de IRF3, permitindo a dimerização, translocação nuclear e transcrição de IFN- $\beta$  (LIN et al., 1998). A produção de IFN- $\beta$  é um sinal autócrino de ativação de outros fatores de transcrição como STAT 1 e 2, resultando na ativação de genes indutores de IFN-tipo I (PLATANIAS, 2005), que incluem citocinas classicamente descritas como atuantes na imunidade anti-viral (HU et al., 2015). Embora IRF3 seja o fator de transcrição predominante na indução de IFN-tipo I, outros IRFs de atuação específica também podem sofrer translocação nuclear. Por exemplo, IRF6 é um fator de transcrição específico de células epiteliais e relacionado a via de sinalização de TLR3 em queratinócitos (RAMNATH et al., 2015).

Vários modelos de estudos já demonstraram o papel da via de sinalização dependente de TLR3 na defesa do hospedeiro. Em macrófagos de camundongos geneticamente deficientes para TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>), a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12 e TNF foi reduzida em resposta a poly (I:C), um RNA dupla-fita sintético utilizado como agonista de TLR3. Além disso, camundongos TLR3<sup>-/-</sup> são altamente suscetíveis a infecções por rinovírus, influenza A e vírus sincicial respiratório (PERALES-LINARES; NAVAS-MARTIN, 2013).

A descoberta da via de TLR3 como um sensor de RNA dupla-fita indutor de Interferon foi por muitos anos rotulada como a maior sentinela contra infecções virais. No entanto, pouco se sabia a respeito da sua atuação em infecções causadas por outros microrganismos. Um estudo recente demonstrou que a infecção por *N. caninum* ativa a sinalização via TLR3–TRIF, induz a translocação nuclear de IRF3 e gera respostas por IFN-tipo I, e essa indução é primariamente causada pela ligação do RNA do parasito ao receptor (MIRANDA et al., 2019). De modo contrário, foi observado que *Toxoplasma gondii* suprime a produção de IFN-tipo I (BEITING et al., 2014).

IFN- tipo I ( $\alpha/\beta$ ) por sua vez, pode estimular a produção de IFN- $\gamma$ , sendo por isso, considerado um possível alvo para indução de uma resposta imune do tipo Th1 protetora ao hospedeiro (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019).



**Figura 2: Via de sinalização de TLR3 dependente de TRIF.** TLR3 se localiza no endossoma e recruta a molécula adaptadora TRIF, que em seguida induz o recrutamento de TRAF6 e TRAF3. TRAF6 recruta RIP-1, que ativa o complexo TAK1 e consequentemente os fatores de transcrição MAPK e NF- $\kappa$ B para produção de citocinas inflamatórias. TRAF3 recruta TBK1 e IKKi para fosforilação de IRF3 e produção de IFN-I. (Adaptado de Kawasaki; Kawai, 2014).

**4.2 Artigo publicado no periódico *Infection and Immunity*, volume 87, 4ª Edição – Abril de 2019**



# Capítulo II

DNA de *Neospora caninum* induz ativação da via de sinalização  
cGAS-STING e a produção de IFN-tipo I

## 5 INTRODUÇÃO

O sensor de DNA GMP-AMP cíclico sintase (cGAS) foi descrito em 2013 (SUN et al., 2013) e desde então tem sido amplamente estudado em diversos modelos experimentais. Quando ocorre a ligação do DNA, é induzida uma alteração conformacional na estrutura de cGAS, catalisando a síntese de GMP-AMP cíclico (cGAMP). Essa molécula funciona como um segundo mensageiro para o recrutamento e posterior ligação de um adaptador de membrana do retículo endoplasmático chamado de *Stimulator of interferon genes* (STING) (CHEN; SUN; CHEN, 2016; HEIJINK et al., 2019; LIU et al., 2019). Na ausência de DNA, cGAS permanece em estado auto-inibido e não induz a ativação de STING (ZHANG et al., 2015).

Apesar de ser encontrado em posição *downstream* em relação a cGAS na via de sinalização, STING foi descoberto alguns anos antes, em 2008, por Ishikawa e Barber e foi descrito como uma proteína de retículo endoplasmático que possui regiões transmembrana e ricas em leucina com habilidades em induzir a transcrição de genes relacionados a produção de interferon do tipo I (IFN-I) (ISHIKAWA; BARBER, 2008). Seus principais ativadores são DNAs virais, bacterianos, de protozoários, plasmidiais e DNA de dupla fita sintéticos (GALLEGO-MARIN et al., 2018; KONNO; BARBER, 2014).

No contexto celular, o DNA é situado no núcleo ou mitocôndria, entretanto quando ocorre sua liberação para outros compartimentos como endossomos ou citoplasma, rapidamente DNAs celulares atuam em sua degradação (OKABE et al., 2005). Em casos de infecções intracelulares, estresse celular ou dano mitocondrial, o DNA pode se acumular em altas concentrações no citoplasma e ativar o sistema imunológico por meio da ação de sensores de DNA, os quais induzem uma via de sinalização complexa e fortemente regulada.

A via de sinalização (**Figura 3**) se inicia quando STING é ativado por dinucleotídeos cíclicos (CDNs), produzidos por algumas bactérias, ou por cGAMP, um CDN produzido por cGAS na presença de ATP e GTP após reconhecer algum DNA citosólico exógeno ou próprio, advindo da mitocôndria ou núcleo celular. Após a ligação dos CDNs, STING forma um complexo com a proteína quinase TBK1 associado ao retículo endoplasmático. Esse complexo é transportado por estruturas semelhantes a um autofagossomo até o complexo de Golgi perinuclear, em um processo

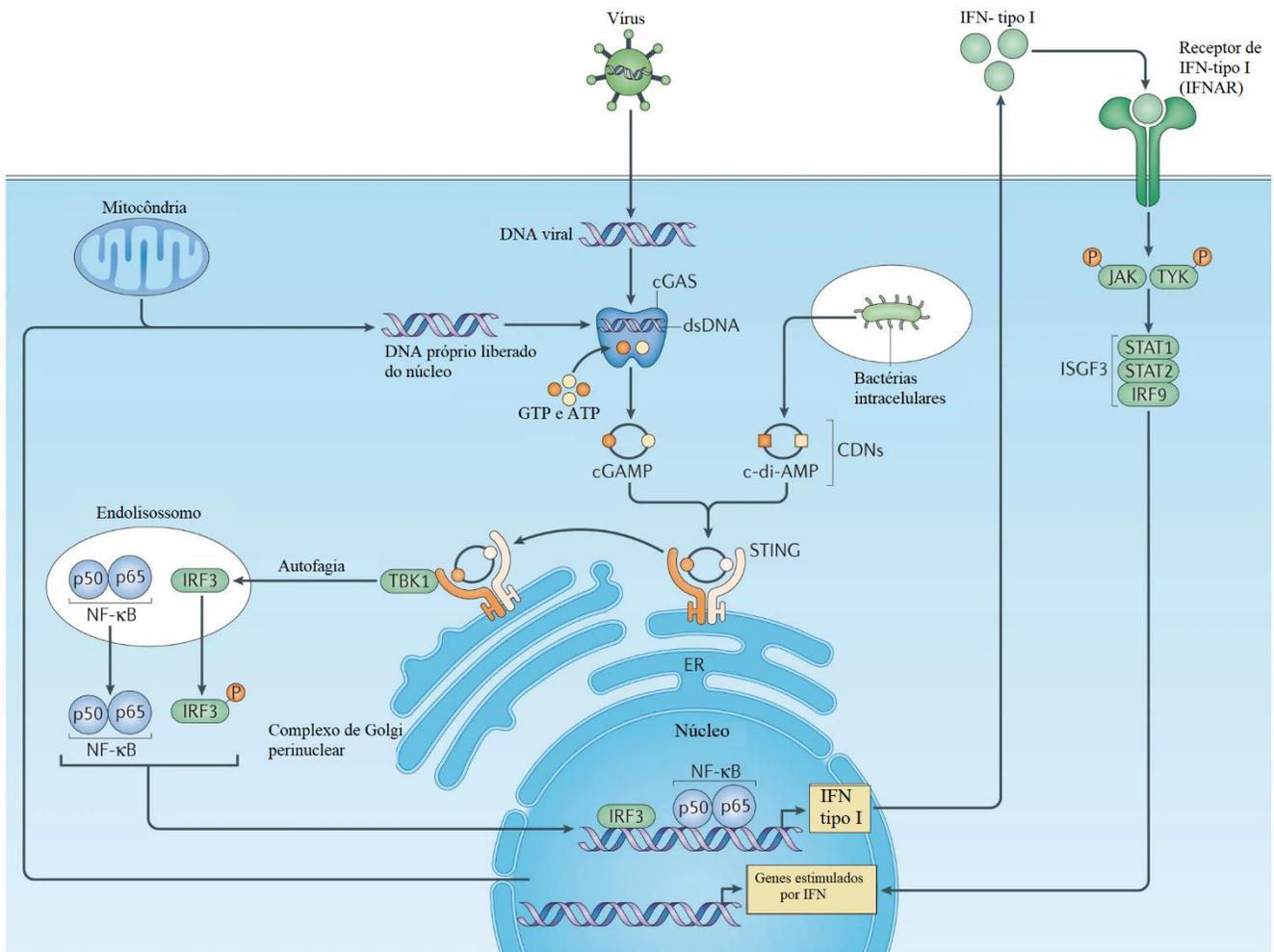
semelhante ao que ocorre na autofagia, para a distribuição de TBK1 para os endolisossomos, onde ocorre a fosforilação do fatores de IRF3 e NF- $\kappa$ B e consequente indução da produção de IFN-tipo I (BARBER, 2015) e outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 (CHEN; SUN; CHEN, 2016; KONNO; BARBER, 2014).

A sinalização de cGAS-STING parece ser independente de outros sensores de ácidos nucleicos como TLR3 e TLR9, embora todas essas vias estejam envolvidas na ativação de fatores de transcrição como IRF3 e NF- $\kappa$ B (BARBER, 2015). Além disso, algumas informações contraditórias estão disponíveis na literatura em relação a dependência de TRIF na via cGAS-STING. Um estudo demonstrou que as moléculas adaptadoras TRIF e STING interagem de maneira direta, por meio dos seus domínios carboxi-terminal, para promover a dimerização de STING, a translocação intermembrana e a transcrição do sinal em fibroblastos embrionários murinos no modelo de infecção por Herpes simplex (WANG et al., 2016). De modo contrário, Seya e colaboradores demonstraram que TRIF não interfere nas respostas imunes mediadas por STING, visto que os ligantes de STING aumentaram a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86 e CD40 e da citocina IFN- $\beta$  em macrófagos e células dendríticas, mesmo na ausência de TRIF (TAKASHIMA et al., 2018).

A importância da sinalização iniciada por cGAS na defesa do hospedeiro já foi demonstrada em diversos modelos de estudo, como em infecções por vírus de DNA, retrovírus e vários tipos de bactérias (BARBER, 2015). Além disso, há relatos da estimulação dessa via em respostas imunes anti-tumorais e nos efeitos da radioterapia, por meio da indução de células TCD8+ (WOO et al., 2014) e da vigilância imunológica realizada por células *natural killer* (NK). (TAKASHIMA et al., 2016).

Poucas informações estão disponíveis sobre a relação da via inata de sinalização dependente de cGAS-STING e protozoários causadores de doenças humanas e animais, visto que a infecção por esses parasitos é tipicamente associada com a indução de Interferon do tipo II (IFN- $\gamma$ ), enquanto que IFN-tipo I, especialmente IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , são proeminentes em infecções virais (VILLANUEVA et al., 2015). Sabe-se entretanto, que ácidos nucleicos de alguns protozoários como *N. caninum* (RNA) e *Plasmodium falciparum* (DNA) são capazes de induzir sinalização intracelular de IFN-I que é benéfica ao hospedeiro (BEITING et al., 2014; GALLEGO-MARIN et al., 2018; MIRANDA et al., 2019). De modo contrário, no caso de *T. gondii*, análises genéticas e bioquímicas demonstraram que a sinalização dependente de IRF3 induzida pelo parasita é ativada

por cGAS-STING, favorecendo a replicação parasitária e a morte do hospedeiro (MAJUMDAR et al., 2015). Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se o DNA de *N. caninum* é capaz de ativar a via de sinalização dependente de cGAS-STING, induzindo a produção de IFN-tipo I, que, de acordo com nossos resultados anteriores, exerce funções protetoras ao hospedeiro durante a infecção por esse parasito.



Nature Reviews | Immunology

**Figura 3:** Via de sinalização de cGAS-STING. Para que haja a transcrição do sinal adequada, os DNAs reconhecidos por cGAS induzem a ativação dependente de STING culminando na translocação nuclear de fatores de transcrição como IRF3 e NF-κB e posterior produção de IFN-I e outras citocinas pró-inflamatórias. (Adaptado de (BARBER, 2015).

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Manutenção de macrófagos imortalizados, células HeLa e taquizoítos de *Neospora caninum*

Macrófagos murinos imortalizados (iBMDMs) foram gerados a partir do método de infecção com J2 virus em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (BMDMs) conforme previamente descrito (BLASI et al., 1989) e posteriormente foram cultivados em garrafas de cultura com meio RPMI 1640 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), glutamina (2mM) e antibiótico/antimicótico (100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0,25 µg/ml anfotericina B) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência (DUBEY et al., 1988). As células hospedeiras derivadas de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas da mesma maneira para manutenção de taquizoítos de *N. caninum* e, após confluência, foram desaderidas com EDTA 0,1mM. O sobrenadante foi centrifugado a 400 x g por 10 minutos e o sedimento resultante foi ressuspenso em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e utilizado para o inóculo de novas garrafas de células HeLa, que foram infectadas com suspensões parasitárias de taquizoítos de *N. caninum* da cepa Nc-Liv (BARBER et al., 1995).

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

## 6.2 Extração do DNA total de taquizoítos de *Neospora caninum*

Após obtenção de taquizoítos como descrito anteriormente, o pellet parasitário foi submetido a extração de DNA. Inicialmente, foi adicionado ao pellet 500 µL de Tampão NLB (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.2), 16 µL de SDS 10% e 8 µL de Solução proteinase K (20mg/ml). Após a incubação a 50°C *overnight*, foi acrescentado 150 µL de Tampão NaCl 6M em banho de gelo por 10 minutos com posterior centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescentou-se 800 µL de etanol absoluto. Em seguida, o DNA foi coletado e ressuspenso com 150-200 µL de água livre de nucleases. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) para utilização nos experimentos de estímulo celular ou ajustada para 40 ng/µL com água estéril e livre de DNase (água DEPC) para o ensaio de parasitismo por PCR em tempo real.

## 6.3 Extração de RNA celular para ensaios de expressão gênica

Os macrófagos murinos imortalizados foram adicionados a placas de 24 poços (10<sup>6</sup> células/poço) e deixados a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 18 horas. Após o período de incubação, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* com MOI 0,5 (Multiplicidade de Infecção = 1 parasito/2 células) ou estimuladas com DNA do parasito ou ISD e deixadas por 2, 6 ou 24 horas para extração do RNA celular, síntese do cDNA e posterior análise da expressão de IFN-α, IFN-β, cGAS ou STING por qPCR em diferentes tempos *in vitro*.

A extração do RNA total dos iBMDMs foi realizada retirando-se as células aderidas com o reagente Trizol (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) na proporção 10<sup>6</sup> células/ 500µl de Trizol. Em seguida, foram adicionados 150 µl de clorofórmio, os tubos foram agitados por inversão, incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante para adição de 600 µl de isopropanol gelado e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1ml de etanol 75%. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado para posterior secagem e diluição do pellet em água livre de DNase e RNase. A leitura foi feita a 260nm em espectrofotômetro.

As amostras foram ajustadas para 3 µg em 50 µl e foi adicionado 5 µl de MgCl<sub>2</sub> e 1 µl de DNase para remoção do DNA contaminante. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 15 minutos e após este período foi acrescentado 25 µl de Trizol e 25 µl de clorofórmio, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante e adicionado ao mesmo 20 µl de Acetato de Sódio (3M, pH 5,2), 1 µl de glicogênio para precipitação do RNA e 150 µl de etanol. As amostras foram centrifugadas novamente por 13.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante para secagem e diluição do pellet em água livre de nucleases.

#### **6.4 Síntese do cDNA por transcrição reversa**

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada por meio do kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, EUA). 1µg de RNA tratado com DNase foi diluído em 4 µl de água livre de DNase e RNase e foi adicionado 1 µl de primer Oligo (dT) para incubação a 70°C por 5 minutos. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo por 10 minutos e procedeu-se o preparo do mix, constituído por 4 µl do Tampão de Reação (5x) da transcriptase reversa, 3,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de mix de dNTPs, 0,5 µl de inibidor de ribonuclease, 1 µl de transcriptase reversa e 5 µl de água livre de nucleases. O mix foi adicionado ao RNA para realização dos ciclos da reação de RT-PCR (25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos) e posterior obtenção do cDNA.

#### **6.5 PCR em tempo real (qPCR) para análise de expressão gênica**

O experimento de expressão gênica foi realizado através do sistema de detecção SYBR green (Promega, Madison, EUA) conforme instruções do fabricante, utilizando como controle endógeno a quantificação do transcrito do gene constitutivo gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH) no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems - Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Após obtenção do cDNA por transcrição reversa, foi adicionado ao mesmo o master mix do kit contendo tampão *GoScript*, MgCl<sub>2</sub>, mix de nucleotídeos, enzima transcriptase reversa, inibidor de RNase e água, bem como os *primers* específicos para IFN-α, IFN-β, cGAS, STING, IL-12, IL-10 e GAPDH, listados na **Tabela 1**.

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

Após o fim da reação, os dados obtidos foram analisados pelos valores do *Cycle Threshold* (*Ct*), pelo método de expressão relativa já descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) normalizado com GAPDH e tendo como parâmetro de comparação os valores de expressão gênica de macrófagos não infectados de cada respectivo grupo experimental.

**Tabela 1:** Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'–3')</b>	<b>Aplicação</b>
<i>IFN-α Forward</i>	TGTCTGATGCAGCAGGTGG	Expressão gênica
<i>IFN-α Reverse</i>	AAGACAGGGCTCTCCAGAC	Expressão gênica
<i>IFN-β Forward</i>	AAGAGTTACACTGCCTTTGCCATC	Expressão gênica
<i>IFN-β Reverse</i>	CACTGTCTGCTGGTGGAGTTCATC	Expressão gênica
<i>IL-12p40 Forward</i>	TGCTGGTGTCTCCACTCATG	Expressão gênica
<i>IL-12p40 Reverse</i>	CATCTTCTTCAGGCGTGTCACA	Expressão gênica
<i>cGAS Forward</i>	ATGGAAGATCCGCGTAGAAG	Expressão gênica
<i>cGAS Reverse</i>	CTTTGCGGGCCGCAGCTT	Expressão gênica
<i>STING Forward</i>	ATGATAGTAGAGAGCTTTGGG	Expressão gênica
<i>STING Reverse</i>	TAAAGGTCCCGAGATGTAACA	Expressão gênica
<i>GAPDH Forward</i>	CTCGTCCCGTAGACAAAATGG	qPCR - Parasitismo
<i>GAPDH Reverse</i>	AATCTCCACTTTGCCACTGCA	qPCR - Parasitismo
<i>Nc5 Forward</i>	GCTGAACACCGTATGTCGTAAA	qPCR - Parasitismo
<i>Nc 5 Reverse</i>	AGAGGAATGCCACATAGAAGC	qPCR - Parasitismo
<i>cGAS Forward</i>	ATGGAAGATCCGCGTAGAAG	Superexpressão
<i>cGAS Reverse</i>	AAGCTTGTCAAAATTTGGAAACC	Superexpressão
<i>STING Forward</i>	ATGCCATACTCCAACCTGC	Superexpressão

<i>STING Reverse</i>	GATGAGGTCAGTGCGGAG	Superexpressão
<i>STING Forward</i>	CACCGGTCCTTGTATGGAGTCCTGCTC	gRNA (CRISPR)
<i>STING Reverse</i>	AAACAAGCAGGACTCCATACAAGGACC	gRNA (CRISPR)
<i>ISD Forward</i>	TACAGATCTACTAGTGATCTATG ACTGATCTGTACATGATCTACA	Controle positivo de indução de IFN-I
<i>ISD Reverse</i>	TACAGATCTACTAGTGATCTATGA CTGATCTGTACATGATCTACA	Controle positivo de indução de IFN-I

## 6.6 Superexpressão de cGAS e STING com proteína de fusão GFP em macrófagos murinos imortalizados

### 6.6.1 PCR convencional a partir de cDNA

Para amplificação específica das moléculas de cGAS e STING, utilizamos tecidos de camundongos para extração do RNA total, com posterior síntese do cDNA e amplificação das moléculas por PCR convencional para clonagem e inserção no vetor de expressão. A extração do RNA total de pulmões, fígado ou cérebro de camundongos C57/BL6 e a síntese do cDNA foram realizadas conforme descrito anteriormente pelo método de extração por Trizol (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, EUA), respectivamente.

A fim de se amplificar o cDNA específico de cGAS ou STING, foi realizada a reação em cadeia da polimerase utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA polimerase por meio de kit comercial (*New England Biolabs*, Ipswich, EUA) e *primers* específicos para clonagem dessas moléculas, conforme listados na **Tabela 1**. Para isso, foi preparado um mix constituído de 0,4 µL de dNTPs 10mM, 1,0 µL de *primers Forward e Reverse*, 2 µL de cDNA, 0,2 µL da enzima DNA polimerase, 10,8 µL de água livre de nucleases e 4 µL de tampão *Phusion HF 5x*, sendo posteriormente submetidos a ciclos de amplificação em termociclador convencional. Por fim, a amostra amplificada foi aplicada em um gel de agarose 1,5% para visualização da banda de DNA correspondente à amplificação de cGAS e STING.

### **6.6.2 Clonagem em vetor de expressão com proteína de fusão GFP**

Após a amplificação do cDNA de cGAS e STING ser confirmada pelo gel de Agarose 1,5%, os amplicons foram inseridos ao vetor bacteriano conjugado com proteína de fusão GFP com Topoisomerase (reação de ligação), disponível no kit de expressão plasmidial *CT-GFP Fusion TOPO®* (Invitrogen, Wilmington, EUA). Para isso, 3  $\mu$ L de produto amplificado foram adicionados a 1  $\mu$ L de solução concentrada de sal e 1  $\mu$ L do vetor bacteriano (pcDNA3.1) e deixados em incubação por 15 minutos a temperatura ambiente.

### **6.6.3 Preparo das células competentes de *Escherichia coli* usando Cloreto de Cálcio**

A cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* foi inoculada em 50 mL de meio LB (Luria-Bertani; 5 g NaCl; 5 g triptona; 2,5 g extrato de levedura; pH 5,7) com adição de 50  $\mu$ L do antibiótico cloranfenicol na concentração de 34 mg/mL e deixada sob agitação a 37°C até atingir a absorbância (600nm) entre 0,3 e 0,5. As células foram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos a 4°C para obtenção do pellet, que foi ressuscitado em 40mL de cloreto de cálcio 50mM gelado pH 6,5-7,0. A ressuspensão foi novamente centrifugada a 3000 x g por 15 minutos a 4°C e ao pellet foi adicionado 1ml de cloreto de cálcio 50mM para incubação em gelo por 4 horas. As células foram centrifugadas por 5 minutos, ressuscitadas em 100  $\mu$ L de meio LB com 100  $\mu$ L de glicerol e estocadas a -80°C até o momento do uso.

### **6.6.4 Transformação de células competentes de *E. coli***

À reação de ligação (100-200ng de plasmídeo) foram adicionados 100-200  $\mu$ L de células competentes para incubação por 1 hora em gelo. Em seguida, a amostra foi submetida ao choque térmico de 42°C por 3 minutos em banho seco e novamente deixada em banho de gelo por 1 hora. Após o período de incubação, foi adicionado 1 ml de meio LB às células, que foram mantidas sob agitação por 1 hora a 37°C. As células transformadas foram por fim plaqueadas em placas contendo meio LB-Ágar com adição dos antibióticos de seleção ampicilina 100mg/ml e cloranfenicol 34 mg/mL, sendo então incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

### 6.6.5 Extração do DNA plasmidial

Após o crescimento das colônias de bactérias transformadas nas placas de LB-Ágar, foram selecionadas 5 colônias isoladas aleatoriamente para verificar se o plasmídeo foi inserido na orientação correta. Com o auxílio de uma ponteira, essas colônias foram inoculadas em 50mL de meio LB com ampicilina e deixadas sob agitação por 12 horas a 37°C. Posteriormente, as bactérias foram centrifugadas a 5.000g por 10 minutos e o pellet foi utilizado para a extração do DNA plasmidial por meio do kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, Madison, EUA), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram testadas por PCR convencional utilizando os *primers* para T7 universal e cGAS ou STING *reverse*, seguido de análise em gel de agarose 1,5%. Em seguida, o DNA plasmidial foi linearizado com a enzima de restrição Scal-HF para realização de transfecção estável em macrófagos murinos imortalizados, utilizando lipofectamina TM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### 6.6.6 Transfecção de macrófagos imortalizados para superexpressão de cGAS e STING e seleção de células positivas

Para a transfecção, macrófagos murinos imortalizados foram plaqueados em placas de 6 poços na quantidade de  $10^6$  células por poço com meio RPMI adicionado de 10% de soro fetal bovino e mantidos a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência. Após este período foi preparado o mix de transfecção, que consiste em 2µg de DNA de cGAS-GFP ou STING-GFP diluído em meio OptiMem-I para um volume final de 200µL e 10µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) diluído em 190 µL de meio OptiMem-I, que foram combinados e deixados em incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1,6 ml de meio RPMI e 400 µL de mix de transfecção em cada poço, para posterior incubação da placa *overnight* a 37°C. No dia seguinte, o meio de cada poço foi removido e substituído por 2ml de meio RPMI fresco com 10% de soro fetal bovino. Com a utilização de microscopia de fluorescência, a eficiência da transfecção foi monitorada após 72 horas e as células foram selecionadas a partir do uso do antibiótico Geneticina (G418; Hyclone Laboratories) por 20 dias consecutivos na concentração de 400µg/mL em meio RPMI e em seguida clonadas para obtenção de linhagens celulares puras cGAS-GFP<sup>+</sup> ou STING-GFP<sup>+</sup>. Os clones positivos foram então plaqueados na concentração de  $10^6$  células/poço e submetidos a infecção com taquizoítos de

*N. caninum* (NcLiv\_mCherry – MOI 1: Multiplicidade de infecção = 1 parasito/célula) ou estímulo com 1 µg de DNA de *N. caninum* ou ISD, uma sequência de DNA dupla-fita sintético (listado na **Tabela 1**) utilizado como controle positivo de indução nas reações, por 24 horas para observação da atividade de cGAS e STING através de microscópio de fluorescência (EVOS, Thermo Scientific).

### **6.7 Depleção gênica de STING por CRISPR/Cas9 em macrófagos murinos imortalizados**

A fim de avaliarmos a importância da molécula STING durante a infecção por *N. caninum* em macrófagos murinos imortalizados, realizamos a deleção gênica dessa molécula pela técnica de CRISPR/Cas9, utilizando os protocolos descritos anteriormente para superexpressão de células, com algumas modificações. Inicialmente, foram desenhados RNA guia (gRNA) específico para o gene de interesse, listados na **Tabela 1**, a partir da ferramenta online *E-CRISPR* (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>) para seleção das melhores sequências gênicas a serem utilizadas. Posteriormente esses RNAs foram anelados e inseridos ao plasmídeo pSpCas9n(BB)-2<sup>a</sup>-Puro (PX462) V2.0 (Addgene 62987), previamente linearizados com a enzima de restrição BbsI, conforme já descrito anteriormente. Em seguida os plasmídeos foram expressos e selecionados por transformação bacteriana com adição do antibiótico ampicilina (100µg/mL) e as colônias isoladas foram selecionadas, checadas e inoculadas em tubos com 5 ou 50 mL de meio LB líquido e ampicilina (100µg/mL), por aproximadamente 18 horas. Os plasmídeos foram extraídos das células competentes mediante a utilização do Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). conforme instruções do fabricante e o DNA plasmidial foi posteriormente utilizado para transfecção em macrófagos murinos imortalizados previamente plaqueados utilizando Lipofectamine 2000. Após um 24h da transfecção, as células foram selecionadas com o uso de 400 µg/mL de Geneticina G148 por 5 dias e, após o tratamento, as células foram clonadas por diluição limitante e os clones checados por PCR convencional com adição de *primers* específicos para diagnóstico das células geneticamente deficientes para STING (STING<sup>-/-</sup>). Por fim, após obtenção das células STING<sup>-/-</sup>, as mesmas foram plaqueadas, infectadas com taquizoítos de *N. caninum* ou estimuladas com DNA do parasito ou ISD por 24 horas, para análise da expressão

gênica de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-12 e IL-10 conforme protocolo já descrito e parasitismo celular por PCR em tempo real.

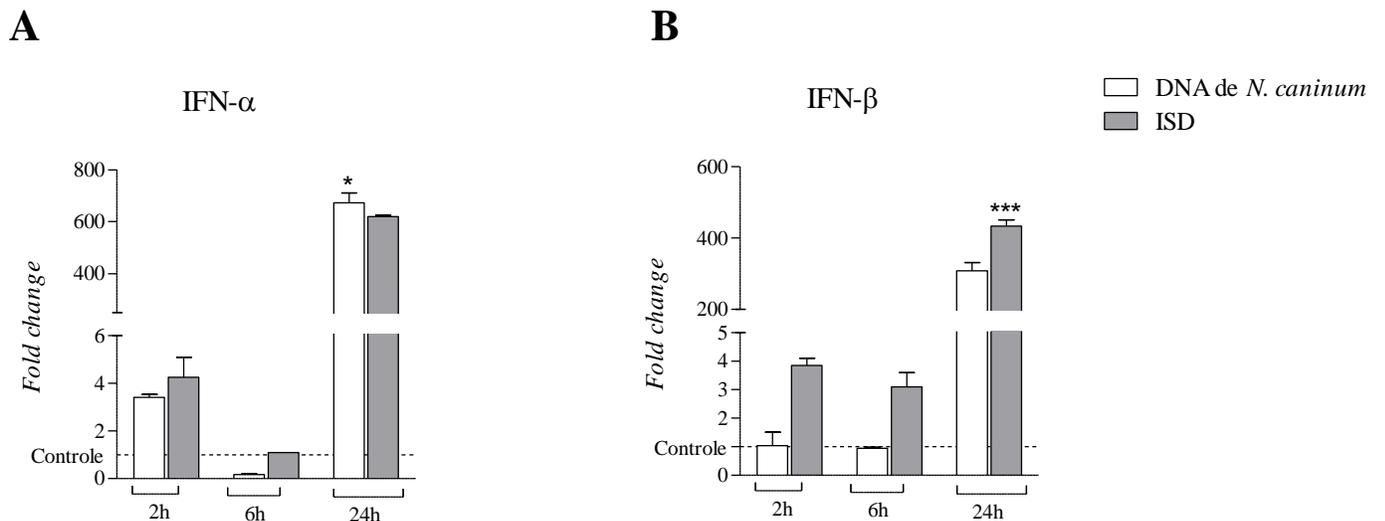
### 6.8 PCR em tempo real para quantificação de carga parasitária

O parasitismo celular de macrófagos murinos imortalizados WT e STING<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0.5) foi quantificado pela amplificação específica de cópias de DNA parasitário por meio de *Real-time* PCR e normalização com GAPDH como previamente descrito (JOHNSON; WIDLANSKI, 2004). Inicialmente, o DNA das amostras foi extraído a partir do pellet celular e foi adicionado 500  $\mu$ L de Tampão NLB (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.2), 16  $\mu$ L de SDS 10% e 8  $\mu$ L de solução proteinase K (20mg/ml). Após a incubação a 50°C *overnight*, foi acrescentado às amostras 150  $\mu$ L de Tampão NaCl 6 M em banho de gelo por 10 minutos com posterior centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescentou-se 800  $\mu$ L de etanol absoluto. Em seguida, o DNA foi coletado e ressuspendido com 150-200  $\mu$ L de água livre de nuclease. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e ajustada para 40 ng/ $\mu$ L com água estéril e livre de DNase (água DEPC). A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real *StepOne Plus* (Applied Biosystems - Thermo Scientific, Wilmington, EUA) com *primers* específicos para o gene Nc-5 de *N. caninum* e GAPDH, listados na **Tabela 1**, e um master mix contendo *SYBR green* (Promega, Madison, EUA). A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de Nc-5 nas amostras comparado com curva padrão com quantidades de DNA conhecidas de *N. caninum* usando o *software Step One Plus* (Applied Biosystems - Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito /  $\mu$ g de DNA total.

## 7 RESULTADOS

## 7.1 DNA de *Neospora caninum* induz a produção de IFN-tipo I

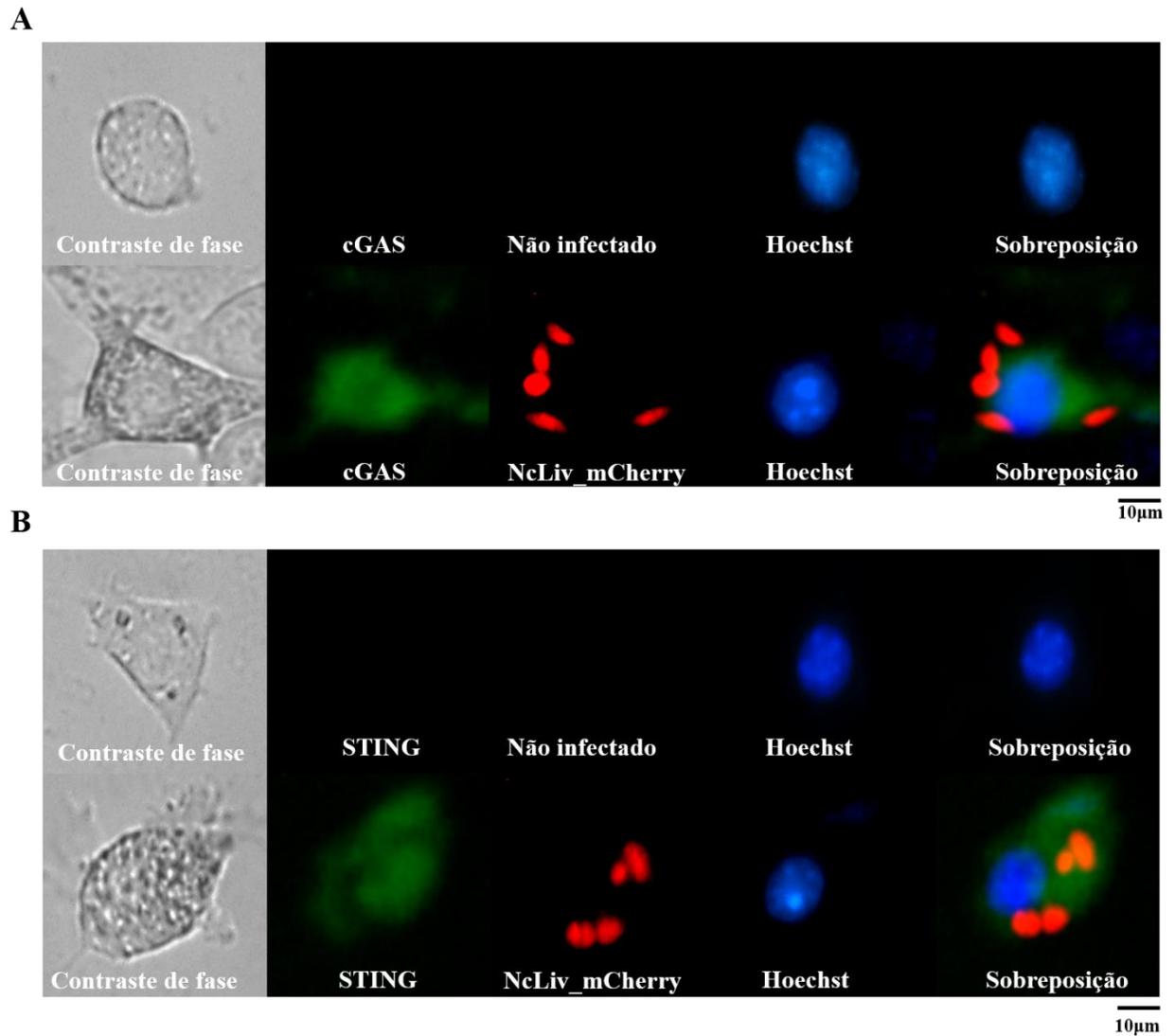
Em nossos resultados anteriores, demonstramos que o RNA de *N. caninum* é um importante gatilho para a produção de IFN-tipo I via TLR3-TRIF. Assim, nosso próximo passo foi avaliar se o DNA desse parasito teria a mesma capacidade de indução dessas citocinas. Para isso, macrófagos imortalizados foram estimulados com 1 $\mu$ g de DNA total extraído de *N. caninum* ou 1 $\mu$ g de ISD, um DNA dupla-fita sintético utilizado como controle positivo de indução de IFN-tipo I, por 2, 6 e 24 horas, para análise de expressão gênica de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  por PCR em tempo real (**Figura 4**) Nós observamos que o estímulo com DNA de *N. caninum* não induziu aumento significativo de expressão dessas citocinas com 2 e 6 horas, entretanto aumentou em torno de 600 vezes a expressão de IFN- $\alpha$  e 400 vezes a expressão de IFN- $\beta$  em 24 horas de estímulo, quando comparado ao controle negativo (macrófagos sem estímulo). Resultados similares foram encontrados para ISD, deste modo, concluímos que, assim como o RNA, o DNA do parasito também é um forte indutor de IFN-tipo I.



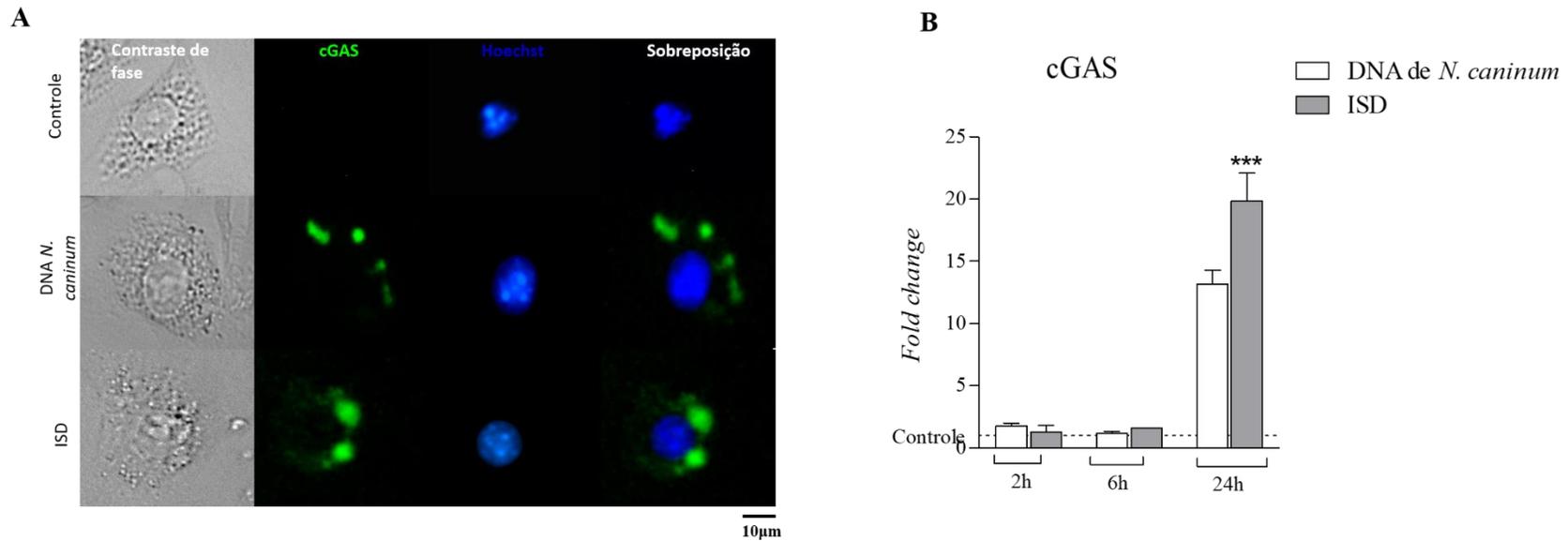
**Figura 4: O DNA de *N. caninum* induz a expressão de IFN-tipo I.** Expressão gênica de IFN- $\alpha$  (A) e IFN- $\beta$  (B) em macrófagos murinos imortalizados estimulados com 1 $\mu$ g de DNA de *N. caninum* ou 1 $\mu$ g de ISD por 2, 6 e 18 horas. A análise dos dados foi realizada considerando os resultados de expressão obtidos por macrófagos WT não infectados como valores de referência e são demonstrados como *fold change* (Aumento relativo do valor final em relação ao valor de referência). Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*P<0.05, \*\*\*P<0,001).

## 7.2 A via de sinalização dependente de cGAS-STING é ativada por *Neospora caninum*

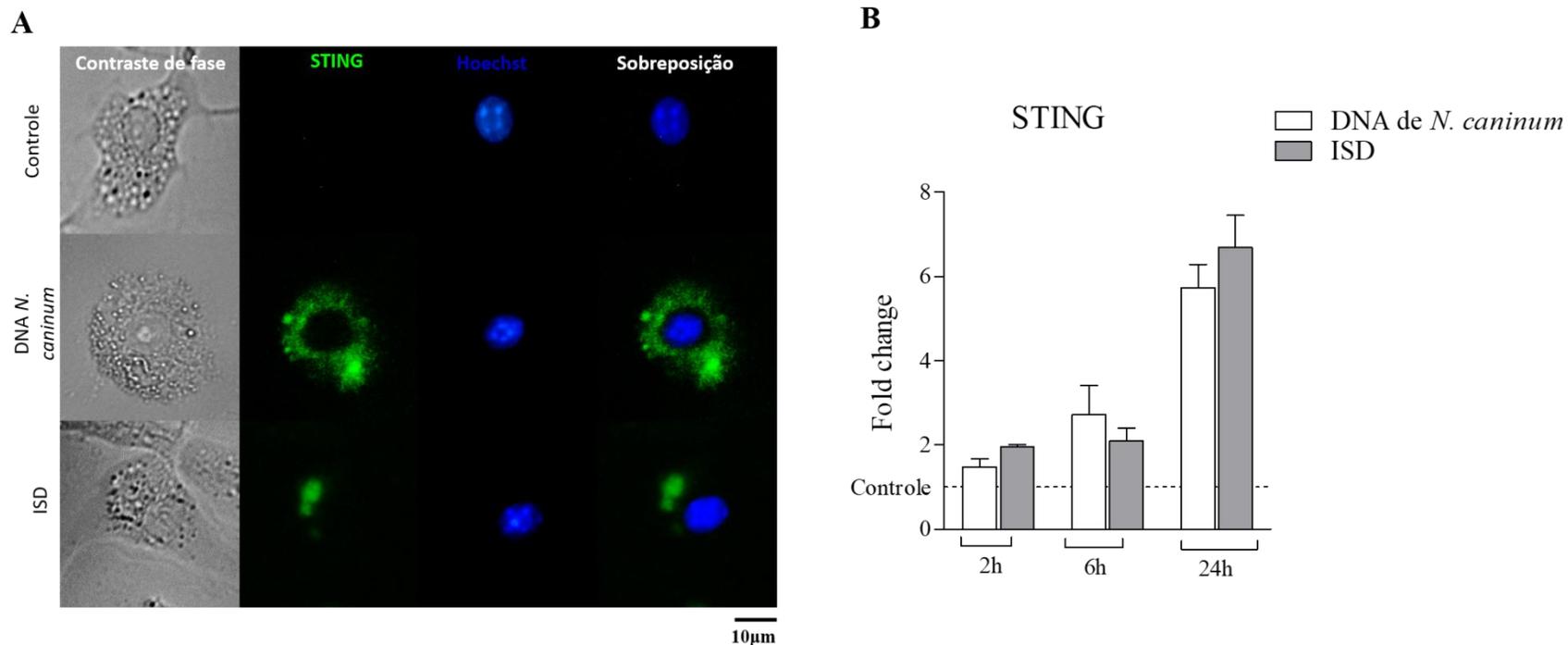
Como o DNA de *N. caninum* foi capaz de estimular a produção de IFN-tipo I, nosso próximo objetivo foi determinar se esse parasito possui a habilidade de induzir a ativação da via de sinalização dependente de cGAS-STING, a qual produz IFN-tipo I após reconhecimento de DNA. Desse modo, macrófagos murinos imortalizados modificados geneticamente para superexpressão de cGAS ou STING codificando a proteína fluorescente GFP (cGAS-GFP<sup>+</sup> ou STING-GFP<sup>+</sup>) foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 1) (**Figura 5**) ou estimulados com 1µg de DNA total do parasito ou ISD por 24 horas (**Figuras 6A e 6B**). Foi observado que tanto o parasito vivo quanto seu DNA total foi capaz de induzir a ativação de cGAS e STING, demonstrado pelo recrutamento de GFP para o citosol em ambas as células modificadas. Como essa via de sinalização é responsável por reconhecimento de DNA, nós quantificamos a expressão do RNA mensageiro que codifica cGAS e STING com 2, 6 e 24 horas de estímulo com o DNA de *N. caninum* ou ISD. Nós observamos que o DNA do parasito induziu, de modo tempo-dependente, a expressão gênica das moléculas analisadas, aumentando em quase 15 vezes a expressão de cGAS (**Figura 6B**) e 6 vezes a expressão de STING (**Figura 7B**) quando comparado ao grupo de células sem estímulo.



**Figura 5: Recrutamento de cGAS e STING para o citosol após infecção com *N. caninum*.** (A) Macrófagos murinos imortalizados transfectados com constructo codificando cGAS-GFP após 24 horas de infecção com taquizoítos de *N. caninum* (NcLiv\_mCherry- MOI 1). (B) Macrófagos murinos imortalizados transfectados com constructo codificando STING-GFP após 24 horas de infecção com taquizoítos de *N. caninum* (NcLiv\_mCherry- MOI 1). As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.



**Figura 6: O DNA de *N. caninum* induz a expressão de cGAS.** (A) Macrófagos murinos imortalizados transfectados com constructo codificando cGAS-GFP foram plaqueados e estimulados com 1µg de DNA de *N. caninum* ou 1µg de ISD por 24 horas. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (B) Quantificação da expressão de cGAS após estímulo de macrófagos murinos imortalizados com 1µg de DNA de *N. caninum* ou 1µg de ISD por 2, 6 e 24 horas. A análise dos dados foi realizada considerando os resultados de expressão gênica obtidos por macrófagos não infectados como valores de referência e são demonstrados como *fold change* (Aumento relativo do valor final em relação ao valor de referência). Resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*\*\*) $P < 0,001$ .



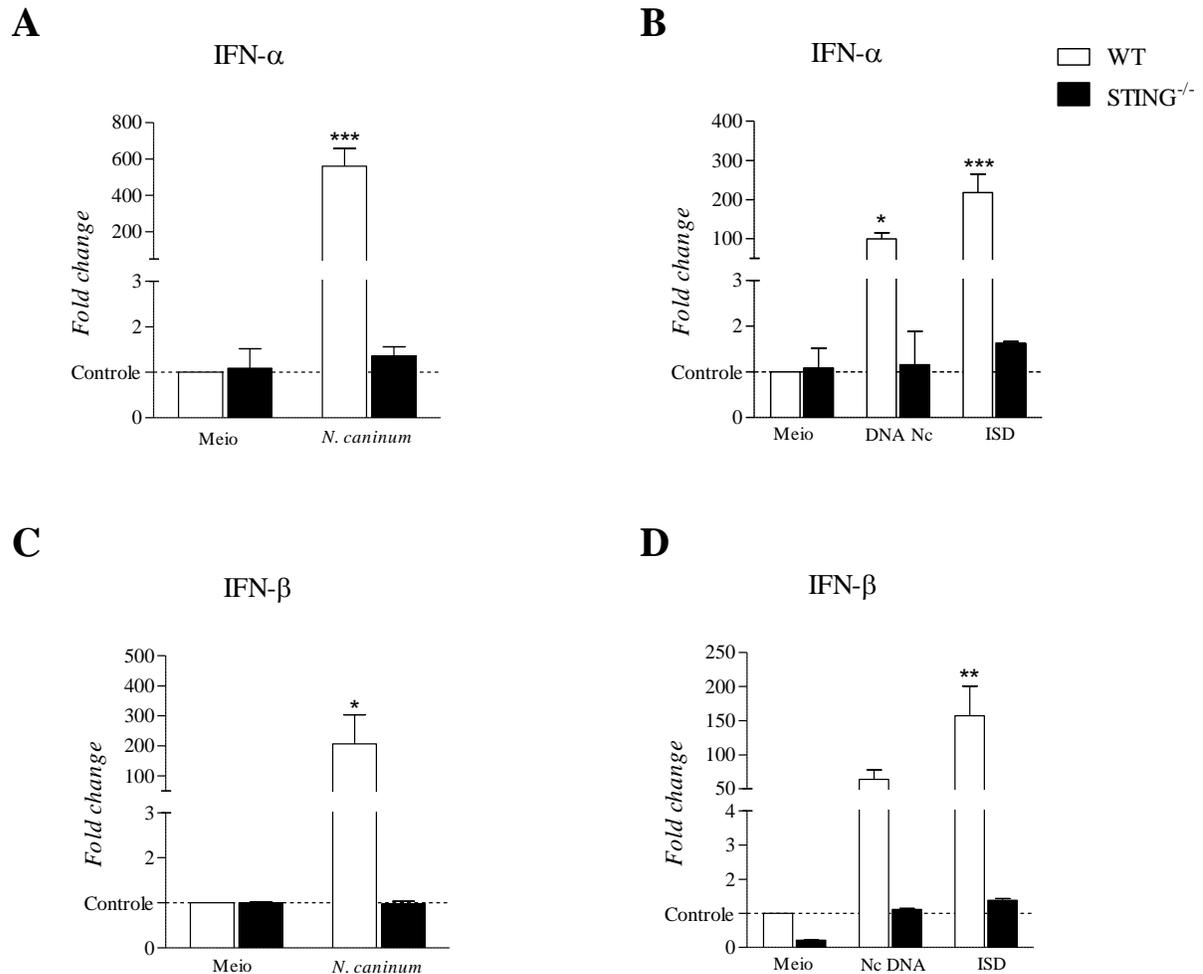
**Figura 7: O DNA de *N. caninum* induz a expressão de STING.** (A) Macrófagos murinos imortalizados transfectados com constructo codificando STING-GFP foram plaqueados e estimulados com 1µg de DNA de *N. caninum* ou 1µg de ISD por 24 horas. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (B) Quantificação da expressão de STING após estímulo de macrófagos murinos imortalizados com 1µg de DNA de *N. caninum* ou 1µg de ISD por 2, 6 e 24 horas. A análise dos dados foi realizada considerando os resultados de expressão gênica obtidos por macrófagos não infectados como valores de referência e são demonstrados como *fold change* (Aumento relativo do valor final em relação ao valor de referência). Resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.

### **7.3 A presença de STING induz IFN-tipo I, modula a produção de IL-12 e IL-10, além de promover o controle da replicação parasitária em macrófagos infectados por *N. caninum***

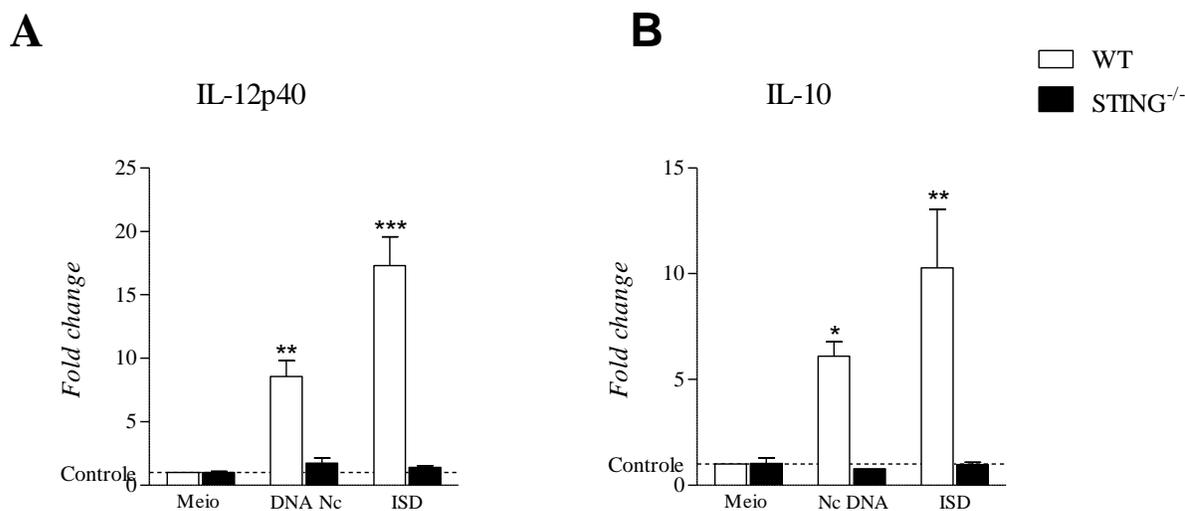
Nós demonstramos que o protozoário *N. caninum* é capaz de ativar a via de sinalização iniciada por cGAS-STING, induzindo o recrutamento desses receptores após a invasão celular pelo parasito. Sabemos também que essa sinalização resulta na produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que são citocinas importantes na resistência do hospedeiro frente a neosporose. Assim, decidimos investigar o quanto a ativação de STING pode estimular a produção dessas citocinas em macrófagos infectados por *N. caninum*. Para isso, geramos uma linhagem de macrófagos murinos imortalizados geneticamente deficientes para STING pela técnica de CRISPR/Cas9 e infectamos essas células com taquizoítos de *N. caninum* ou estimulamos com DNA do parasito, ou ISD como controle, para quantificação da expressão de IFN- $\alpha$  (**Figuras 8A e 8B**) e IFN- $\beta$  (**Figuras 8C e 8D**) por qPCR após 24 horas. Pudemos observar que, na ausência de STING, a expressão de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  é severamente comprometida e reduzida a níveis basais mesmo na presença do parasito ou dos estímulos com DNA ou ISD.

Em um estudo anteriormente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que IFN- $\alpha$  modula positivamente a produção de IL-12p40 durante a infecção por *N. caninum* (MIRANDA et al., 2019). Nesse contexto, avaliamos o quanto a via de sinalização dependente de cGAS-STING e seu produto IFN-tipo I pode afetar esse mecanismo de proteção do hospedeiro durante o estímulo com o DNA do parasito. Para isso, analisamos a produção de IL-12p40 por macrófagos WT e STING<sup>-/-</sup> estimulados com 1 $\mu$ g de DNA parasitário ou ISD por 24 horas (**Figura 9A**). Os nossos resultados demonstraram que as células STING<sup>-/-</sup> produzem somente concentrações basais de IL-12, que são comparadas as produzidas pelo controle negativo da reação (células sem estímulo). Além disso, avaliamos também se a ausência de STING afeta a produção de IL-10 (**Figura 9B**), importante citocina regulatória, e vimos que as macrófagos STING<sup>-/-</sup> também apresentaram produção reduzida para essa citocina. Com o objetivo de se verificar o quanto STING é requerido para o controle da replicação parasitária, nós infectamos macrófagos WT e STING<sup>-/-</sup> com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0.5) por 24 horas e avaliamos o parasitismo celular. Como esperado, nós observamos que, na ausência de STING, o controle da replicação parasitária é

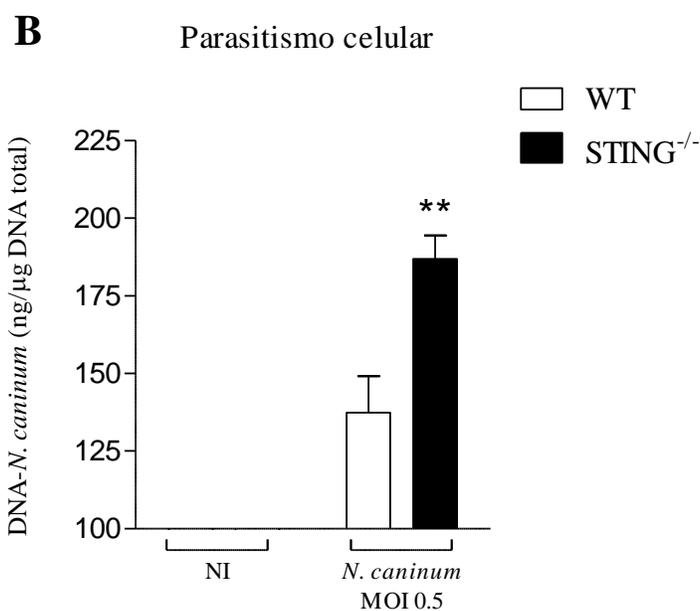
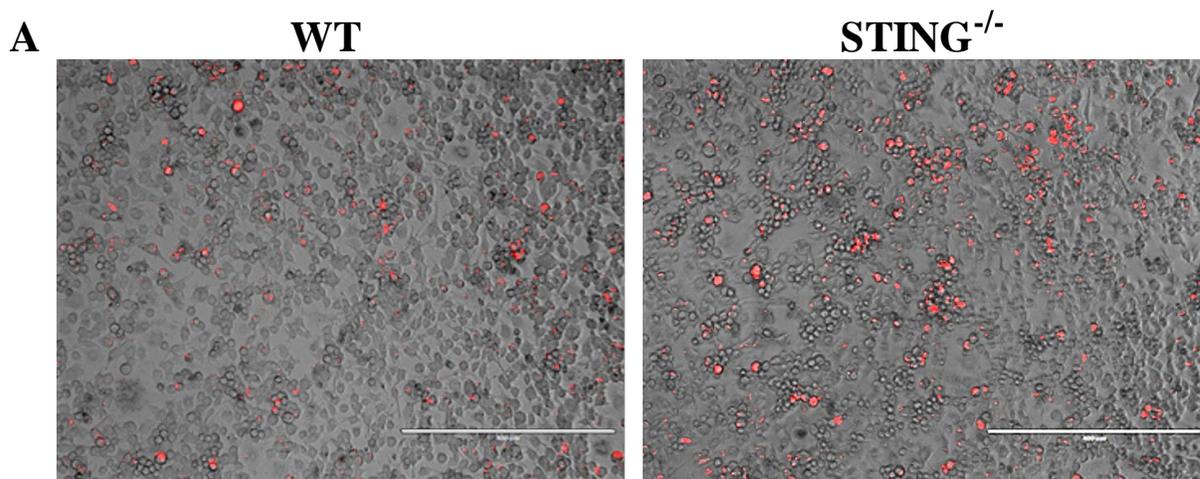
prejudicado, demonstrado pela microscopia de fluorescência (**Figura 10A**) e pela análise quantitativa de PCR em tempo real (**Figura 10B**).



**Figura 8: STING é essencial para a produção de IFN-tipo I.** (A e B) Quantificação da expressão gênica de IFN- $\alpha$  por PCR em tempo real em macrófagos murinos imortalizados WT e STING<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0.5) (A) ou estimulados com 1  $\mu$ g de DNA do parasito ou 1  $\mu$ g de ISD por 24 horas (B). (C e D) Quantificação da expressão gênica de IFN- $\beta$  por PCR em tempo real em macrófagos murinos imortalizados WT e STING<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* (MOI 0.5) (C) ou estimulados com 1  $\mu$ g de DNA do parasito ou 1  $\mu$ g de ISD por 24 horas (D). A análise dos dados foi realizada considerando os resultados de expressão gênica obtidos por macrófagos não infectados para cada grupo como valores de referência e são demonstrados como *fold change* (Aumento relativo do valor final em relação ao valor de referência). Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*P<0.05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).



**Figura 9: STING modula positivamente a produção de IL-12 e IL-10 durante a infecção por *N. caninum*.** (A e B) Análise de expressão gênica de IL-12p40 (A) e IL-10 (B) por PCR em tempo real em macrófagos murinos imortalizados WT e STING<sup>-/-</sup> estimulados com 1µg de DNA de *N. caninum* ou 1 µg de ISD por 24 horas. A análise dos dados foi realizada considerando os resultados de expressão gênica obtidos por macrófagos não infectados para cada grupo como valores de referência e são demonstrados como *fold change* (Aumento relativo do valor final em relação ao valor de referência). Resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*P<0.05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).



**Figura 10: STING limita a replicação parasitária de *N. caninum in vitro*.** (A) Microscopia de fluorescência de macrófagos murinos imortalizados WT e STING<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* (NcLiv\_mCherry – MOI 0.5) por 24 horas. (B) Quantificação da carga parasitária de macrófagos murinos imortalizados WT e STING<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* (NcLiv\_mCherry – MOI 0.5) por 24 horas. Os dados foram obtidos por qPCR a partir da amplificação do gene Nc5 de *N. caninum* normalizada com GAPDH. Resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*\*P<0,01).

## 8 DISCUSSÃO

*Neospora caninum* é o agente etiológico da neosporose, uma doença parasitária de distribuição mundial e de grande importância médico-veterinária. Para evitar a propagação da infecção, suas consequências clínicas e permitir o desenvolvimento de métodos profiláticos e terapêuticos eficazes, é crucial o entendimento das vias imunológicas inatas desencadeadas contra esse parasita, bem como os mecanismos moleculares envolvidos na relação patógeno-hospedeiro. Em um estudo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa, demonstramos que o RNA de *N. caninum* é um importante gatilho para ativação da via de sinalização dependente de TLR3-TRIF, e que essa via possui importância na resistência do hospedeiro contra a infecção, levando a produção de IFN-tipo I (MIRANDA et al., 2019). Desse modo, foi de nosso interesse investigar se o DNA de *N. caninum* também teria a capacidade de induzir a produção de IFN-tipo I, sendo, nesse contexto, reconhecido pela via de sinalização dependente de cGAS-STING.

Para isso, estimulamos macrófagos com DNA total do parasito e avaliamos a expressão gênica de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que se apresentaram aumentadas após o estímulo, indicando que assim como o RNA, o DNA de *N. caninum* também é um forte indutor de IFN-tipo I, citocinas classicamente descritas como atuantes na imunidade anti-viral (KONNO; BARBER, 2014). Resultados similares foram encontrados utilizando o modelo de infecção por *Leishmania donovani*, em que o DNA do parasito foi um potente indutor de IFN-tipo I, especificamente induzindo aumento da expressão gênica de IFN- $\beta$  por vias dependentes de cGAS-STING, aumentando assim a resistência do hospedeiro frente a infecção (DAS et al., 2019).

Além disso, nós avaliamos a habilidade de *N. caninum* em ativar a via de sinalização de cGAS-STING por meio da infecção ou estímulo com DNA parasitário em células modificadas geneticamente que superexpressam essas moléculas e observamos também seu recrutamento citosólico tanto após a invasão celular pelo parasita quanto pós-estímulo com seu DNA. Embora as características estruturais exatas do DNA que é reconhecido por sensores citoplasmáticos ainda não sejam bem definidas, sabe-se que DNAs não-metilados de patógenos procariotos constituem um PAMP importante. Nesse contexto, o genoma de alguns parasitos *Apicomplexa*, como *Plasmodium falciparum*, *T. gondii* e *Cryptosporidium parvum* apresentou baixos níveis de metilação (GISSOT et al., 2008; PONTS et al., 2013). De fato, o DNA desses parasitos induzem a

ativação da via de cGAS-STING. No caso de *P. falciparum*, a via de cGAS-STING foi descrita de grande importância para indução de resposta imune anti-parasitária (AHN; BARBER, 2019). Já para *T. gondii*, os estudos são divergentes em relação a função dessa sinalização durante a infecção pelo parasito (MAJUMDAR et al., 2015; WANG et al., 2019).

A indução de IFN-tipo I pela via de cGAS-STING foi também demonstrada em nosso estudo no modelo de infecção por *N. caninum*. Utilizando macrófagos STING<sup>-/-</sup>, foi observado que a expressão gênica para IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  foi drasticamente reduzida a níveis basais, mesmo na presença de ISD, considerado controle positivo de indução dessas citocinas. Em infecções virais, como pelo citomegalovírus, que são potentes geradoras de resposta imunológica dependente de IFN-tipo I, foi demonstrado que a depleção gênica de STING em células endoteliais leva ao descontrole da replicação viral por redução da produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (LIO et al., 2016). Na infecção por *P. falciparum*, a indução de IFN- $\beta$  é bloqueada na ausência de cGAS e STING (GALLEGO-MARIN et al., 2018).

Por outro lado, sabe-se que o desenvolvimento de uma ação imunológica eficaz contra parasitos intracelulares, como *N. caninum*, depende de uma polarização adequada para um perfil de resposta do tipo Th1 (LINDSAY; DUBEY, 2020). Em nosso estudo, nós observamos uma ligação entre a via de cGAS-STING e o estabelecimento da resposta imunológica de perfil Th1 dependente da produção de IL-12. Na ausência de STING não houve produção de IL-12 após o estímulo com o DNA de *N. caninum*. Essa modulação da produção de IL-12 ocorre provavelmente devido ao bloqueio de IFN-tipo I e não pela ausência de STING, visto que já foi descrito que durante a infecção por *N. caninum* a reposição de IFN- $\alpha$  recombinante em macrófagos TLR3<sup>-/-</sup>, que também apresentam expressão drasticamente reduzida de IFN-tipo I, reestabelece a produção adequada de IL-12 (MIRANDA et al., 2019). Além disso, a ação de IFN- $\alpha$  e IL-12 em conjunto pode recrutar macrófagos, células NK e elevar os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias, gerando uma alça de *feedback* positivo (HU et al., 2013; SAADOUN et al., 2015).

Em relação ao parasitismo celular, mostramos em nosso trabalho que a via de cGAS-STING possui importância no controle da replicação parasitária em células geneticamente deficientes infectadas com taquizoítos de *N. caninum*, ao contrário do que acontece no caso de *T. gondii*, em que a indução de genes estimulados por Interferon (ISGs) pela via de cGAS-STING-IRF3 promove a replicação do parasito (MAJUMDAR et al., 2015). Utilizando camundongos geneticamente

deficientes para o eixo cGAS-IFN tipo I, foi demonstrado uma falha no controle da parasitemia no estágio sanguíneo da infecção por *P. yoelli* (HAHN et al., 2018).

Poucas informações relacionando a via de sinalização dependente de cGAS-STING e infecções por protozoários estão disponíveis na literatura. Além disso, nota-se que essas moléculas atuam de formas diferentes até mesmo em infecções por parasitos próximos filogeneticamente, como é o caso de *T. gondii* e *N. caninum*.

## 9 CONCLUSÃO

Nossos resultados em conjunto demonstram que o DNA de *N. caninum* é capaz de ativar cGAS, STING e induzir a produção de IFN-tipo I. Desvendamos ainda algumas funções importantes dessa via de sinalização na resistência celular frente a infecção, como a modulação da produção de IL-12, IL-10 e controle da replicação parasitária *in vitro*. Nesse contexto, surge a necessidade de novos estudos que abordem a identificação dos agonistas de cGAS/STING presentes no DNA do parasito. Em adição, são necessários experimentos *in vivo* que demonstrem qual seria a influência direta dessa via de reconhecimento citosólico de DNA, bem como do papel do grupo de citocinas IFN-tipo I, resultante da transcrição dessa sinalização, durante a infecção por *N. caninum*. Devido a influência da via de cGAS-STING na modulação de respostas imunes clássicas, como no caso do perfil Th1 contra parasitos intracelulares, essas descobertas poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de protocolos profiláticos e/ou terapêuticos contra a neosporose, visando aumentar os escores reprodutivos na criação de ruminantes e induzindo, por consequência, melhorias de rendimento e competitividade externa neste importante setor da economia nacional.

# Capítulo III

IFN-tipo I é importante para indução da resposta imune específica e controle de replicação parasitária e na infecção por *Neospora caninum*

## 10 INTRODUÇÃO

Os mecanismos protetores contra o parasito *N. caninum*, envolvem tanto a resposta imune inata quanto adaptativa. Predominantemente, a proteção do hospedeiro é induzida por um padrão Th1 de resposta imune, mediada pela produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , em colaboração com respostas celulares efetoras que atuam para controlar o parasitismo tecidual (MONNEY; HEMPHILL, 2014). Em um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa foi observado que, diferentemente de *T. gondii*, o RNA de *N. caninum* é um importante gatilho para a indução de respostas protetoras ao hospedeiro que geram IFN-I, atuantes na imunidade anti-viral, por meio de TLR3 e TRIF (MIRANDA et al., 2019).

Interferons do Tipo I (IFN-tipo I) incluem 2 principais classes de citocinas: IFN- $\alpha$ , que compreende 13 isoformas codificadas por 14 genes; e IFN- $\beta$ , codificado por um único gene. Essas citocinas possuem diferentes atividades, sinalizam através de receptor comum (IFNAR) e possuem 3 principais funções: induzem um estado antimicrobiano nas células, limitando a ação de agentes infecciosos; modulam a resposta imune inata de forma balanceada, promovendo a apresentação de antígenos e ação das células NK enquanto limita vias pró-inflamatórias; ativam a resposta imune adaptativa, promovendo respostas de células B e o desenvolvimento de células T antígeno-específicas de alta afinidade (IVASHKIV; DONLIN, 2014).

A sinalização dependente de IFN-tipo I se inicia pela ligação das citocinas ao complexo dimérico de receptor IFNAR, que consiste nas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. Foi demonstrado que IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  se ligam a cadeia de IFNAR1, enquanto a sinalização por IFNAR2 ainda não é bem definida (FEINTUCH et al., 2018; PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004). Em seguida, IFNAR fosforila e ativa as proteínas quinase JAK1 e TYK2, que por sua vez induzem a fosforilação e ativação dos fatores de transcrição STAT1 e STAT2, os quais sofrem dimerização e recrutam IRF9, formando o complexo STAT1-STAT2-IRF9 (ISGF3). Esse complexo trimérico é translocado para o núcleo e se liga a uma sequência específica, denominada Elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE) para ativar a transcrição dos genes estimulados por IFN (ISGs) (CHEN; LIU; CAO, 2017; STARK; DARNELL, 2012).

Sabe-se que respostas dependentes de IFN desreguladas são associadas a várias desordens imunológicas, como infecções crônicas, doenças autoimunes e doenças inflamatórias. Para que

IFN-tipo I seja capaz de gerar proteção ao hospedeiro é necessário um equilíbrio entre a resposta imunológica que é induzida e a toxicidade tecidual gerada por inflamação exacerbada (CHEN; LIU; CAO, 2017). Esse grupo de citocinas é classicamente descrito como indutor de respostas imunes protetoras no caso de infecções virais, no entanto, sua produção pode ser deletéria ao hospedeiro no caso de algumas infecções bacterianas e doenças autoimunes (TRINCHIERI, 2010).

Em relação a infecção por protozoários, foi demonstrado que *Trypanosoma cruzi* é capaz de induzir uma resposta imune dependente de IFN-tipo I nos primeiros momentos da infecção, estimulando a produção de óxido nítrico e a resistência do hospedeiro (COSTA et al., 2006). Além disso, células infectadas por *Plasmodium spp.* ou *T. gondii* também são capazes de produzir IFN-tipo I pelas vias dependentes de TLR9 e TLR11, respectivamente, mas essa produção não é suficiente para o controle da infecção (KIM et al., 2012; PEPPER et al., 2008). Estudos demonstraram que *T. gondii* secreta uma molécula efetora denominada TgIST, que é translocada para o núcleo da célula hospedeira e bloqueia a indução de IFN-tipo I (MATTA et al., 2019). Em contrapartida, no caso da infecção por *N. caninum*, sabe-se que o RNA do parasito é capaz de estimular altas concentrações de IFN-tipo I dependente de TLR3-TRIF na célula hospedeira (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi determinar qual seria a participação direta da produção de IFN-tipo I na proteção de camundongos infectados com *N. caninum*.

## 11 MATERIAL E MÉTODOS

### 11.1 Obtenção de camundongos

Camundongos 129Sv do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes para a subunidade 1 do receptor de IFN $\alpha/\beta$  (IFN-ABR<sup>-/-</sup> ou IFNAR<sup>-/-</sup>), com 6-8 semanas de idade, foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C) e alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob o protocolo de número 109/16 (**Anexo 1**).

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

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

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

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

## 11.3 Delineamento experimental

Inicialmente, a fim de se verificar qual seria a importância direta de IFN-tipo I na resistência do hospedeiro, foi realizada uma análise de sobrevivência em camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> (n=5), infectados pela via i.p. com a dose de 1x10<sup>7</sup> taquizoítos de *N. caninum*. Após a inoculação, esses animais foram acompanhados quanto à sua morbidade e mortalidade por 30 dias. Além disso, foram realizadas análises das fases aguda (7 dias) e crônica (30 dias) da infecção. Para isso, camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> (n=5) foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com a dose de 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* obtidos como descrito anteriormente e, em diferentes tempos, foram coletadas amostras de soro, lavado e células peritoneais, pulmões, fígado e cérebro de acordo com o padrão de migração temporal do parasito como previamente determinado (COLLANTES-FERNANDEZ

et al., 2006). O lavado peritoneal foi utilizado para a dosagem de citocinas e óxido nítrico. Foi realizado homogenato das amostras de tecidos, que foram avaliados quanto ao perfil de produção de citocinas por ELISA, carga parasitária por qPCR e análise histológica por hematoxilina e eosina, enquanto que as amostras de soro foram avaliadas quanto à cinética de produção de anticorpos por ELISA.

#### **11.4 Ensaio de Sobrevida**

Os animais WT e geneticamente deficientes para o receptor de IFN-tipo I foram inoculados com a dose de  $1 \times 10^7$  taquizoítos do isolado Nc-Liv de *N. caninum*, em um volume de 200  $\mu$ L, por via intraperitoneal. Os camundongos foram observados diariamente quanto à morbidade, avaliada pela perda de peso corporal após a infecção, e a mortalidade, durante 30 dias após o desafio. Após este período, os animais sobreviventes foram eutanasiados.

#### **11.5 PCR em tempo real para quantificação de carga parasitária**

O parasitismo em amostras de células do lavado peritoneal, pulmão, fígado e cérebro de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com dose sub-letal de  $5 \times 10^6$  taquizoítas de *N. caninum* foi quantificado pela amplificação específica de cópias de DNA parasitário por meio de *Real-time* PCR e normalização com GAPDH como previamente descrito (JOHNSON; WIDLANSKI, 2004). Inicialmente, o DNA das amostras foi extraído a partir de 50mg de tecido ou pellet celular e foi adicionado 500  $\mu$ L de Tampão NLB (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.2), 16  $\mu$ L de SDS 10% e 8  $\mu$ L de Solução proteinase K (20mg/ml). Após a incubação a 50°C *overnight*, foi acrescentado às amostras 150  $\mu$ L de Tampão NaCl 6 M em banho de gelo por 10 minutos com posterior centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescentou-se 800  $\mu$ L de etanol absoluto. Em seguida, o DNA foi coletado e ressuspendido com 150-200  $\mu$ L de água livre de nuclease. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e ajustada para 40 ng/ $\mu$ L com água estéril e livre de DNase (água DEPC).

A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real *StepOne Plus* (Applied Biosystems - Thermo Scientific, Wilmington, EUA) com *primers* específicos para o gene Nc-5 de

*Neospora caninum* (Forward: 5'-GCTGAACACCGTATGTCGTAAA-3'; Reverse: 5'-AGAGGAATGCCACATAGAAGC- 3'), GAPDH (Forward: 5'- CTCGTCCCGTAGACAAAATGG-3'; Reverse: 5'-AATCTCCACTTTGCCACTGCA) e um master mix com o sistema de detecção *SYBR green* (Promega, Madison, EUA). A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de Nc-5 nas amostras comparado com curva padrão com quantidades de DNA conhecidas de *N. caninum* usando o *software Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito / µg de DNA total.

### **11.6 Análise histopatológica para determinação de inflamação tecidual *in vivo***

Amostras teciduais de pulmão, fígado e cérebro de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* por 7 ou 30 dias foram coletadas e fixadas em formol 10% em tampão PBS por 24 horas. No dia seguinte, os órgãos foram inclusos em parafina e cortados (5µm de espessura) com o auxílio de um micrótomo para fixação em lâminas, as quais foram posteriormente coradas com Hematoxilina e Eosina como previamente descrito (MINEO et al., 2009b). As seções foram fotografadas usando microscópio automatizado (FSX100, Olympus, Japão). Os *scores* inflamatórios foram baseados em escalas de 0 a 3 conforme previamente descrito (GIBSON-CORLEY; OLIVIER; MEYERHOLZ, 2013).

### **11.7 Homogenato de órgãos para dosagem de citocinas**

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

### **11.8 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)**

Camundongos 129Sv WT e e IFNAR<sup>-/-</sup> foram eutanasiados e pulverizados com álcool 70%. Seus fêmures e tíbias foram extraídos, dissecados e, em fluxo laminar, imersos em álcool 70% por 1 minuto, sendo cortadas suas epífises. As medulas ósseas foram lavadas como auxílio de uma seringa com RPMI 1640 e uma agulha de insulina (26G de diâmetro). A suspensão celular resultante foi centrifugada e ressuspensa em meio condicionado (R20/30) composto por RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM) para a diferenciação em macrófagos (MARIM et al., 2010).

As células foram igualmente distribuídas em placas de Petri (9 ml de meio R20/30 por placa) e incubadas por 6 dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que no 4º dia de diferenciação foi acrescentado o mesmo volume de meio. Após a incubação, o sobrenadante das placas foi descartado e acrescido às mesmas 9 mL de PBS estéril gelado para a retirada das células aderidas após incubação por 10 minutos a 4°C. Por fim, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e o pellet obtido ressuspensa em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e a quantidade de células ajustadas para contagem com Azul de Tripán 0,4% em câmara hemocitométrica, sendo posteriormente dispostas em placas de 96 poços. Após adesão, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (*Multiplicity of infection*: MOI 0.5 – 1 parasito a cada 2 células) ou estimuladas com LPS (1µg/ml) por 18h para posterior coleta do sobrenadante e dosagem de citocinas.

### **11.9 Quantificação de citocinas por ELISA**

A produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12p40 e IL-10 foi quantificada sobrenadante de cultura celular ou em lavado peritoneal, soro e homogenato de pulmão e fígado de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup>, infectados ou não com 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum*. Os ensaios foram realizados usando kits de ELISA comerciais de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA).

Para ELISA, placas de poliestireno de alta afinidade contendo 96 poços (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura, *overnight* a 4°C. Após lavagem das placas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 10% de SFB em PBS 0.01M (pH7,2) durante 1 hora. Seguido o bloqueio, foram adicionadas as amostras e curvas padrões com concentrações conhecidas foram adicionadas ao ensaio em diluições dupla-seriadas. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção biotinilados e conjugados com estreptoavidina-peroxidase na diluição de 1:250 por 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm. A concentração final das citocinas foi determinada a partir de curvas padrão com concentrações conhecidas de proteínas recombinantes e os resultados foram expressos em pg/ml, observando os respectivos limites de detecção para cada ensaio: IFN- $\gamma$  (4.1 pg/ml), IL-12p40 (15.6 pg/ml) e IL-10 (31.3 pg/ml).

### **11.10 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)**

A dosagem indireta de NO foi realizada no lavado peritoneal de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* por 7 dias. Para o ensaio foi utilizado o kit comercial *Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Assay* (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A concentração de óxido nítrico é baseada na conversão enzimática de nitrato em nitrito, seguido por sua detecção colorimétrica a 540 nm e estimativa de concentração obtida em relação à curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 0.78 umol/L.

### **11.11 ELISA indireto para IgG anti-*N. caninum***

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado para detectar a cinética de anticorpos IgG específicos anti-*N. caninum* em amostras de soros dos camundongos selvagens e geneticamente deficientes em IFNAR, infectados com a dose sub-letal de 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* após

0, 7 e 30 dias de infecção, seguindo o protocolo já descrito com algumas modificações (SILVA et al., 2007).

Placas de microtitulação de 96 poços de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, New York, EUA) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA, em concentração de 10 µg/ml em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó desnatado em PBS-T (PBS-TM) a 5% por 1 hora em temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soros dos camundongos infectados foram adicionadas, em duplicata, na diluição de 1:25 (*N. caninum*) em PBS-TM 1% por 1 hora. Após incubação a 37°C, as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) na diluição 1:1000 marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), diluído em PBS-T+BSA1% e as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C. Após um ciclo final de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03%) em tampão cromógeno consistindo de 2,2'-azino-bis-3-ethylbenziazolino ácido sulfônico 0.01 M (ABTS; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2). Após incubação por 20-30 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 405 nm. O *cut-off* da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos em densidade óptica (D.O.)

### **11.12 Análise estatística**

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

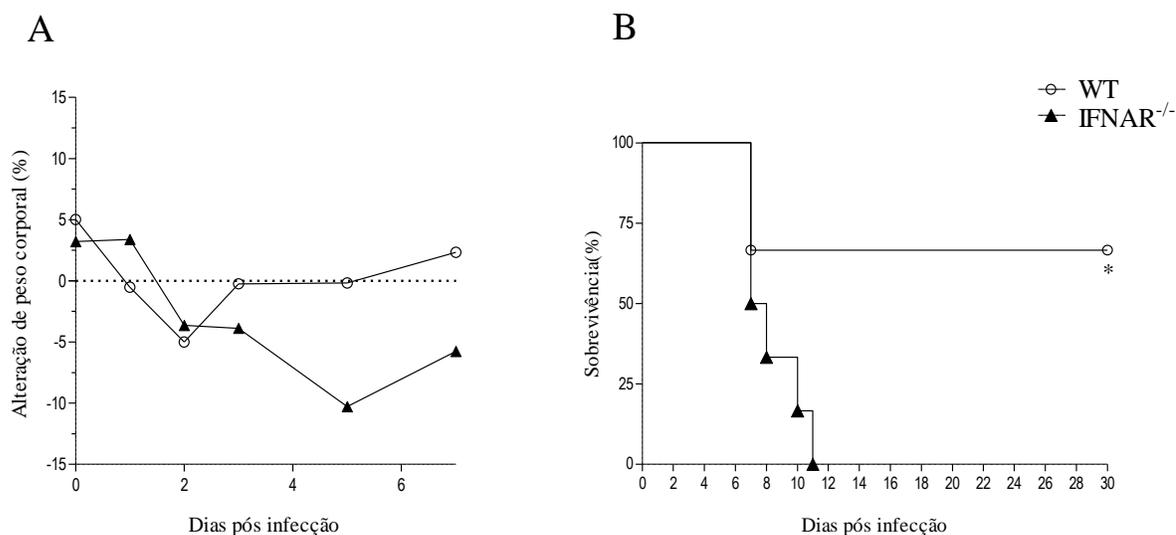
### 11.13 Normas de Biossegurança

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

## 12 RESULTADOS

### 12.1 IFN-tipo I é importante para a resistência do hospedeiro durante a infecção por *N. caninum*

Com o objetivo de se verificar a importância de IFN-tipo I na sobrevivência do hospedeiro, camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> foram infectados com a dose letal de  $1 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* e monitorados durante 30 dias quanto à sua morbidade (**Figura 11A**) e mortalidade (**Figura 11B**). Foi observado que todos os animais geneticamente deficientes para o receptor sucumbiram a infecção até o 11º dia, enquanto que 67% dos animais WT resistiram ao protocolo de infecção severa. Além disso, na ausência do receptor para as citocinas IFN-tipo I, a perda de peso corporal foi maior quando comparada a dos animais WT.



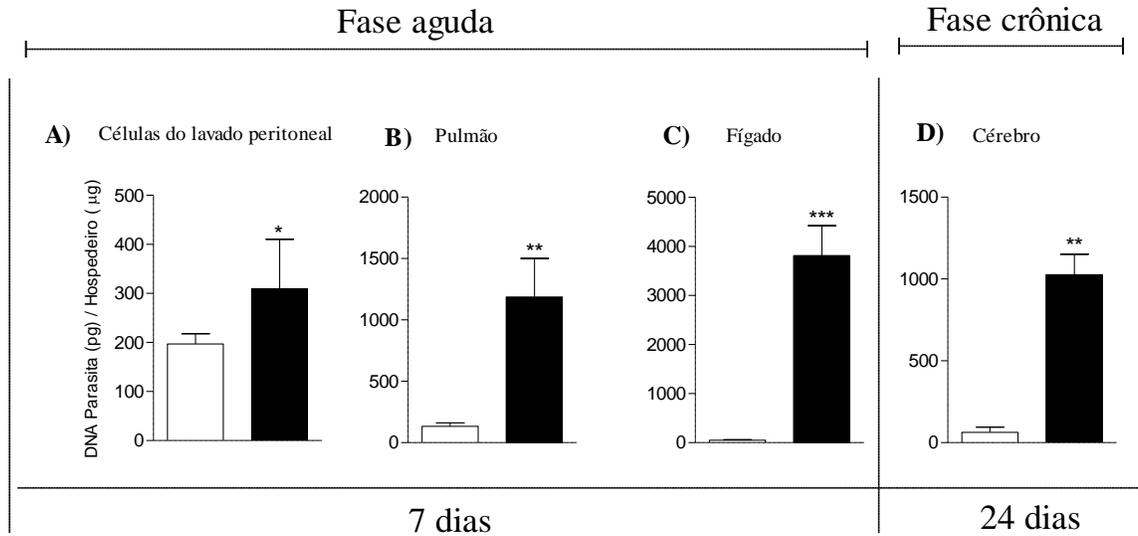
**Figura 11: IFN-tipo I é importante para resistência do hospedeiro frente a infecção por *N. caninum*.** (A) Análise de morbidade, representada pela porcentagem de perda de peso corporal, e (B) mortalidade de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com 1x10<sup>7</sup> taquizoítos de *N. caninum* e monitorados por 30 dias após a infecção. As curvas de sobrevivência foram comparadas usando análise de sobrevivência de Kaplan-Meier através do teste log-rank Mantel-Cox (\*P<0.05).

## 12.2 A produção de IFN-tipo I limita a replicação parasitária e a inflamação tecidual

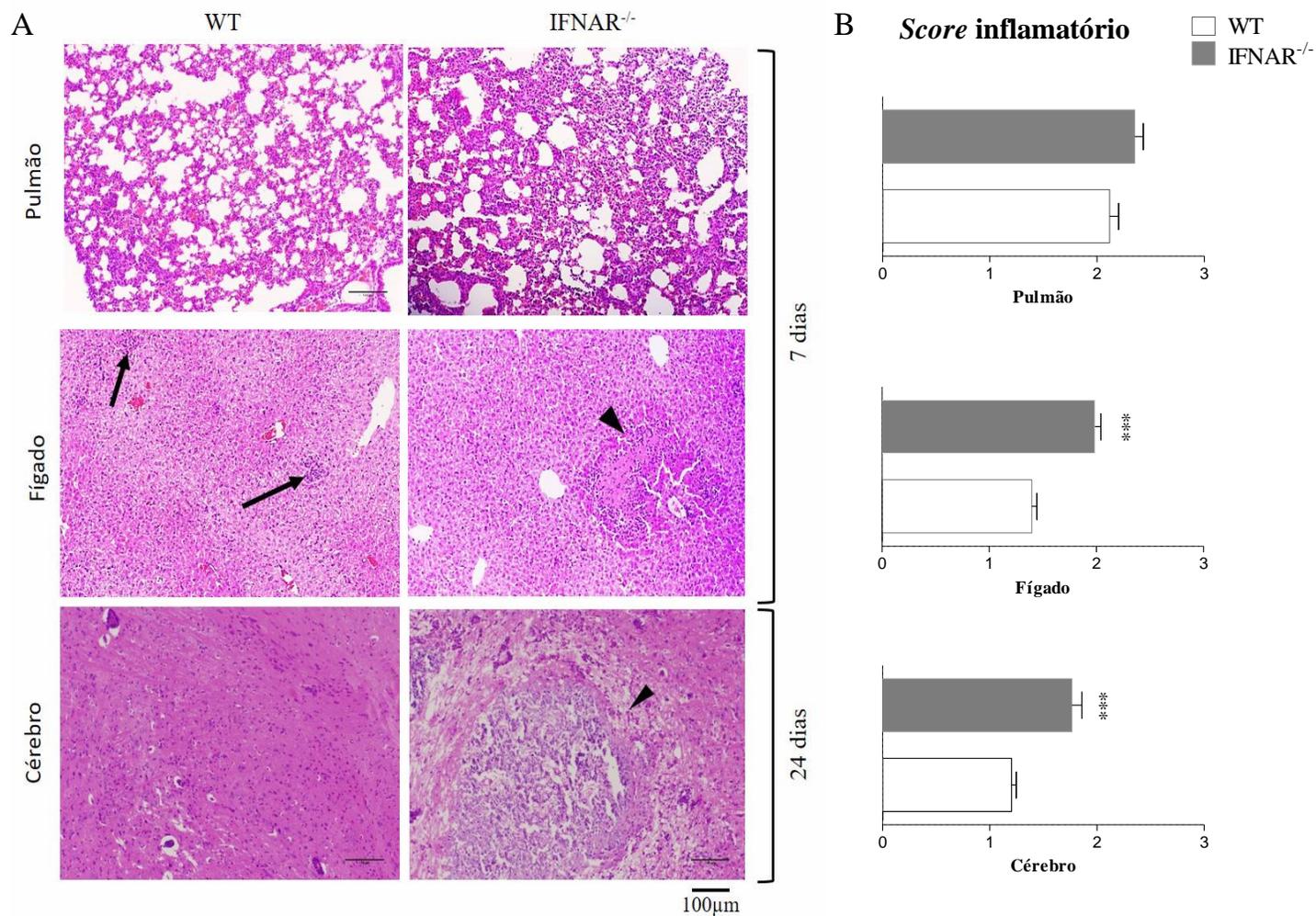
Com o objetivo de se verificar se a sinalização induzida por IFN-tipo I atua no controle do crescimento parasitário *in vivo*, camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> foram infectados com a dose subletal de 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* por 7 e 24 dias. Posteriormente, os camundongos foram eutanasiados para quantificação de cópias do DNA genômico presentes em diferentes tecidos em ambas as fases da infecção (**Figura 12**) e análise histológica (**Figura 13**). Nós observamos que os camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> apresentaram alta carga parasitária nas células do lavado peritoneal, pulmões e fígado na fase aguda (7 dias de infecção) e no cérebro na fase crônica (24 dias de infecção), quando comparados ao grupo WT.

As fotomicrografias representativas dos cortes histológicos (**Figura 13A**) e as análises de *score* inflamatório (**Figura 13B**) revelaram que os pulmões de ambos os grupos experimentais estavam consideravelmente alterados, com a presença de infiltrado inflamatório misto (mono e polimorfonuclear) difuso, ocasionando de maneira similar a oclusão parcial dos alvéolos. Através da análise histopatológica do fígado, observamos a presença de infiltrado inflamatório misto, difuso, com edemaciação do parênquima, além de focos inflamatórios moderados e, ocasionalmente, necrose, principalmente nos animais geneticamente deficientes para IFNAR. Em relação ao cérebro, observou-se um processo inflamatório leve nos camundongos WT e moderado nos IFNAR<sup>-/-</sup>, com presença de infiltrados inflamatórios mononucleares, manguito perivascular evidente e, ocasionalmente, meningite.

□ WT  
■ IFNAR<sup>-/-</sup>



**Figura 12: IFN- tipo I controla a replicação parasitária *in vivo*.** Quantificação da carga parasitária em animais WT e IFNAR<sup>-/-</sup>. Camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> (n=5) foram infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* e sacrificados para coleta de lavado peritoneal, pulmão e fígado e tecido cerebral nas fases aguda e crônica da infecção. Os dados foram obtidos a partir da reação de qPCR pela amplificação do gene Nc5. Os valores são expressos como média e  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados através do teste de Mann Whitney (\*P<0.05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).

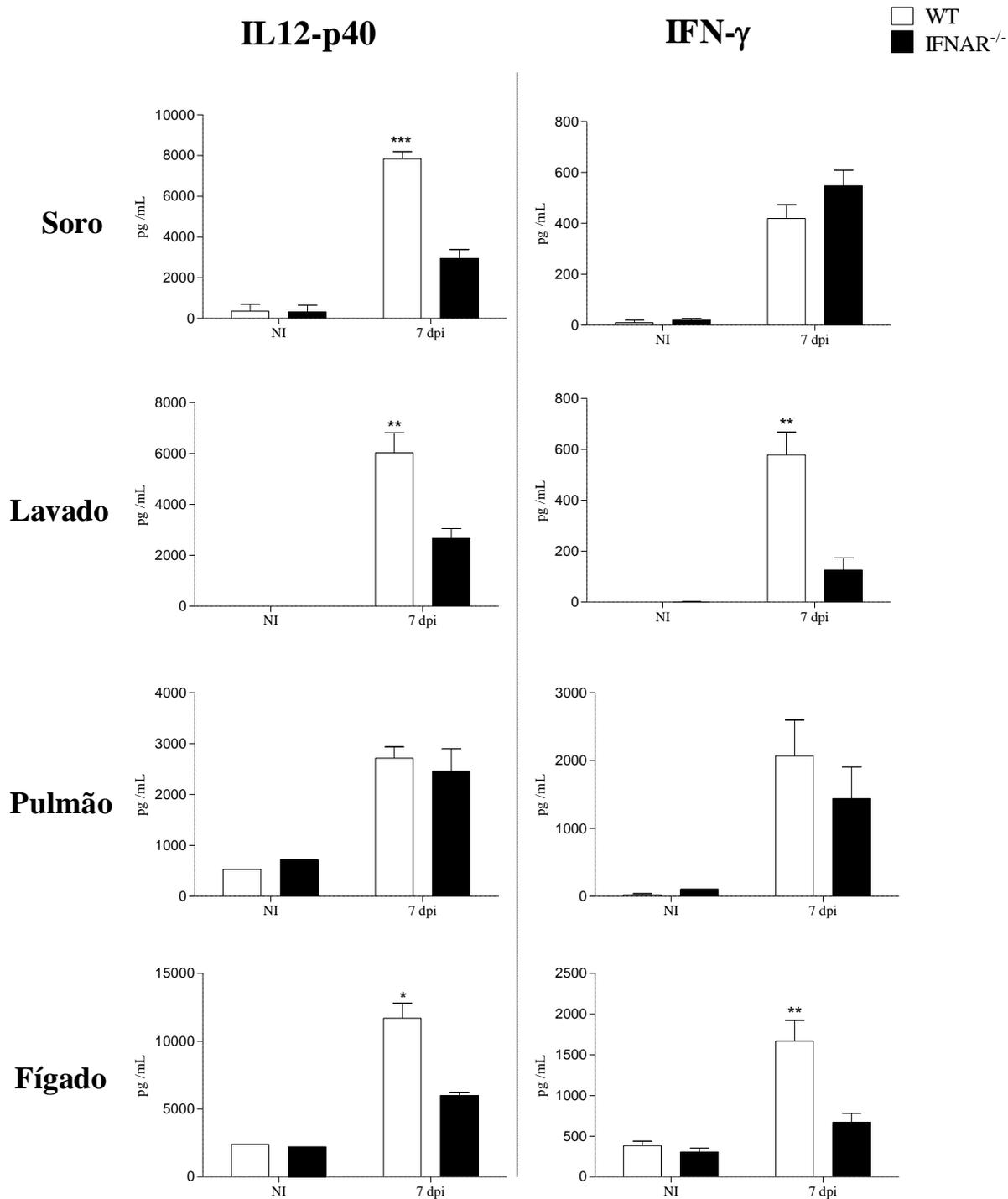


**Figura 13: IFN-tipo I controla a inflamação hepática e cerebral durante a infecção por *N. caninum*.** (A) Fotomicrografias representativas e (B) scores inflamatórios de pulmão, fígado e cérebro de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> (n=5) infectados com 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum*. Os tecidos pulmonar e hepático foram coletados durante a fase aguda da infecção (7 dias) e o cérebro durante a fase crônica (24 dias). As setas indicam áreas de infiltrado celular inflamatório e as pontas de setas indicam regiões de necrose tecidual. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina e analisadas no microscópio óptico (aumento de 10x). Resultados foram expressos como média ± SEM. Diferenças estatísticas (\*\*\*)P<0,001; ns: não significativo) entre grupos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> foram realizadas usando o teste de Mann Whitney.

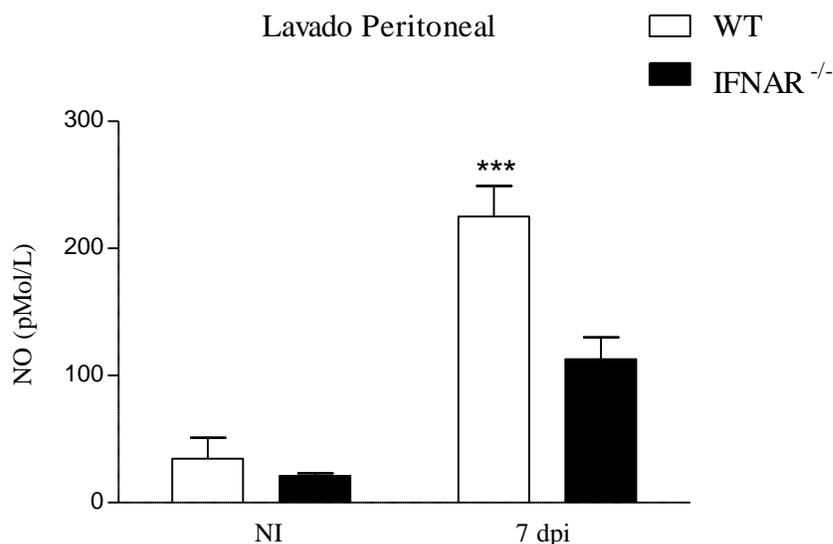
### **12.3 IFN-tipo I modula positivamente a produção de IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-10 e NO, mas não interfere na produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum***

Como os camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> demonstraram maior suscetibilidade a infecção, aumento de carga parasitária e maior grau de inflamação tecidual, nosso próximo passo foi investigar como estaria a produção das citocinas chave para o desenvolvimento do perfil protetor de resposta imune Th1, IL-12p40 e IFN- $\gamma$  (**Figura 14**), e da molécula efetora Óxido nítrico (**Figura 15**) na fase aguda da infecção. Como esperado, os camundongos geneticamente deficientes para o receptor de IFN-tipo I apresentaram produção reduzida de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  no lavado peritoneal, soro e fígado 7 dias após a infecção por *N. caninum*, entretanto, não houve diferenças significativas na produção dessas citocinas no pulmão. Além disso, os níveis de nitrato/nitrito no lavado peritoneal apresentaram redução na ausência de IFN-tipo I, indicando que esta via de sinalização, de modo direto ou indireto, é relevante no controle da replicação parasitária. A fim de se confirmar esses resultados, realizamos também a dosagem de IL-12p40 e IL-10 em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítos de *N. caninum* ou estimulados com LPS (controle positivo) por 18h (**Figura 16**). Observamos que os macrófagos IFNAR<sup>-/-</sup> apresentaram uma produção significativamente menor dessas citocinas quando comparados aos macrófagos WT.

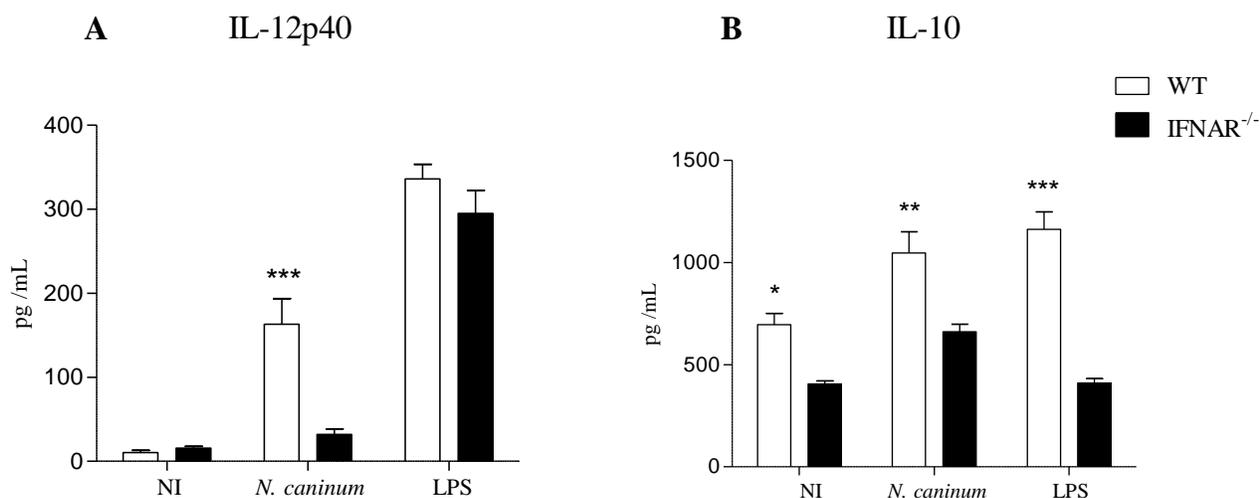
Com o objetivo de se avaliar o envolvimento de IFN-tipo I na resposta imune humoral contra *N. caninum*, a produção sérica de anticorpos IgG antígeno-específicos foi analisada em cinética em camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*. (**Figura 17**). Foi observado que os níveis de IgG anti-*N. caninum* foram similares nos grupos experimentais durante as fases aguda e crônica da infecção.



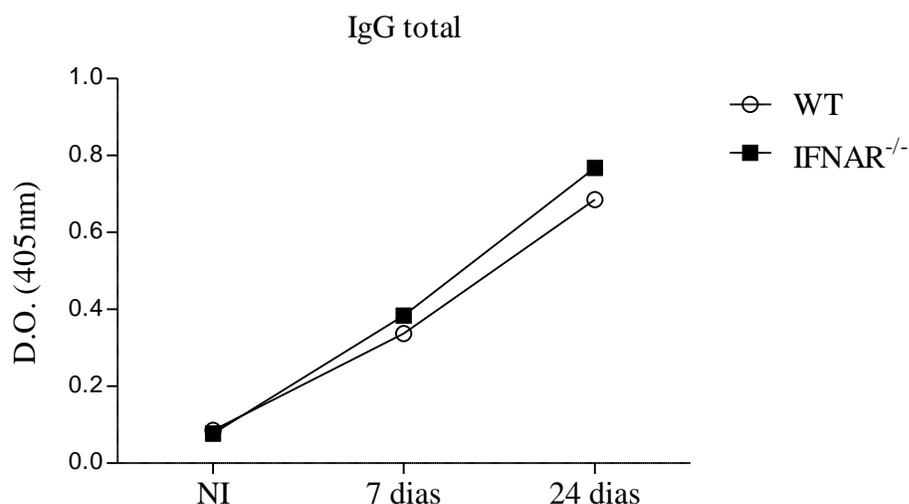
**Figura 14: IFN-tipo I influencia a produção de IL-12p40 e IFN-γ *in vivo*.** Quantificação de IL-12p40 e IFN-γ por ELISA no soro, lavado peritoneal, fígado e pulmão de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> (n=5) infectados com 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* por 7 dias. Resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*P<0,5, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001). NI: não infectado; 7 dpi: 7 dias pós-infecção.



**Figura 15: A presença de IFN-tipo I induz a produção de óxido nítrico durante a infecção por *N. caninum*.** Quantificação de óxido nítrico por kit comercial em lavado peritoneal de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> (n=5) infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* por 7 dias. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas entre grupos foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001). NI: não infectado; 7 dpi: 7 dias pós-infecção.



**Figura 16: A produção de IL-12p40 e IL-10 é aumentada por IFN-tipo I durante a infecção por *N. caninum in vitro*.** Quantificação de (A) IL-12p40 e (B) IL-10 por ELISA em sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com taquizoítas de *N. caninum* (MOI 0.5) ou estimulados com LPS por 18 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas foi realizada entre os grupos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. (\*P,0,5, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001). NI: não infectado.



**Figura 17: A ação de IFN-tipo I não interfere na produção de anticorpos anti-*N. caninum*.** Quantificação da cinética de produção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* por ELISA no soro de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* por 7 e 24 dias. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas foi realizada entre os grupos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> usando Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. NI: não infectado.

## 13 DISCUSSÃO

A infecção por protozoários é classicamente associada com indução de IFN-tipo II (IFN- $\gamma$ ), enquanto que IFN-tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) é descrito como atuante em infecções virais. Em contrapartida, estudos demonstraram que o RNA de *N. caninum* é um forte indutor de IFN-tipo I pela via de TLR3-TRIF (MIRANDA et al., 2019). Desse modo, o objetivo deste estudo foi elucidar como seria a participação desse grupo de citocinas na resistência de camundongos infectados pelo parasito protozoário *N. caninum*.

Para isso, utilizamos camundongos do tipo selvagem (WT) e deletados geneticamente para a subunidade 1 do receptor de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (IFNAR<sup>-/-</sup>), que não sofrem a ação de IFN-tipo I por terem a transcrição do sinal interrompida pela ausência da ligação das citocinas ao seu respectivo receptor (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004). Os grupos experimentais foram infectados com

taquizoítos de *N. caninum* e submetidos a análises de sobrevivência, de infecções agudas (7 dias de infecção) e crônicas (24 dias de infecção).

Inicialmente, demonstramos que camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> são suscetíveis a infecção por *N. caninum* quando comparados aos animais WT, com perda significativa de peso corporal e 100% de mortalidade até o 11º dia. Nossos resultados anteriores mostraram que camundongos TLR3<sup>-/-</sup> e TRIF<sup>-/-</sup> também são menos resistentes a infecção quando comparados aos WT, no entanto, obtiveram uma taxa de sobrevivência de 50% e 33%, respectivamente (MIRANDA et al., 2019). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de existirem outras vias, além da via de TLR3-TRIF, responsáveis pela produção de IFN-tipo I, como as vias dependentes de RIG-I, TLR-7, TLR-8, TLR-9, cGAS-STING (LEE; ASHKAR, 2018), dentre outras, que estariam atuando de forma compensatória na produção de IFN-tipo I durante a infecção. De modo contrário, IFN-tipo I teve sua participação descrita como deletéria na sobrevivência do hospedeiro em infecções por *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Plasmodium berghei* (BALL et al., 2013; CHESSLER et al., 2011; LOPEZ et al., 2008) e não teve influência direta na sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii* (BEITING et al., 2014; SHIRAHATA et al., 1986).

Durante a infecção aguda e crônica por *N. caninum*, observamos que camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> apresentaram alta carga parasitária em células do lavado peritoneal, pulmão, fígado e cérebro, que são os principais órgãos acometidos pelo parasito de acordo com a sua distribuição temporal já descrita (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006), em comparação aos animais WT. Esses resultados demonstram que IFN-tipo I é importante no controle da replicação parasitária durante a infecção. Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos TRIF<sup>-/-</sup>, os quais possuem expressão gênica reduzida de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , quando infectados por *N. caninum* (MIRANDA et al., 2019). Dados contraditórios são encontrados na literatura em relação à importância de IFN-tipo I no controle da replicação de *T. gondii*. Alguns autores defendem que IFN-tipo I não possui influência direta na sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii* (BEITING et al., 2014; SHIRAHATA et al., 1986), enquanto outros trabalhos demonstram que camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* perdem mais peso corporal e apresentam alta carga parasitária no cérebro quando comparados aos WT (MATTA et al., 2019).

Em nosso trabalho avaliamos também a presença de lesão tecidual inflamatória por análise histológica de tecidos de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> e observamos que na ausência da ação de IFN-tipo I houve perda da estrutura tecidual, maior número de focos inflamatórios e lesões

necróticas no pulmão, fígado e cérebro desses animais em comparação ao grupo controle. Resultados similares foram encontrados por Matta e colaboradores utilizando o modelo de infecção por *T. gondii*, em que a coloração por hematoxilina e eosina mostrou a presença de vários cistos teciduais do parasito no tecido cerebral de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup>, além de um aumento de infiltrados celulares inflamatórios e presença de necrose nos animais *knockout* (MATTA et al., 2019).

No caso de camundongos TRIF<sup>-/-</sup> infectados por *N. caninum*, os quais apresentam uma redução importante na produção de IFN-tipo I, foi observado um aumento de *score* inflamatório nos pulmões e no fígado quando comparado ao grupo controle (MIRANDA et al., 2019). Estudos já demonstraram que IFN-tipo I possui diferentes funções dependendo do tipo de infecção em que atua (BOGDAN; MATTNER; SCHLEICHER, 2004) e no caso de *N. caninum*, todos os estudos publicados são concordantes em relação a importância dessas citocinas na resistência do hospedeiro (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019). No caso de algumas infecções bacterianas, como por *Orientia tsutsugamushi*, agente etiológico do tifo rural (*scrub*) em humanos e que atinge principalmente os pulmões e o baço, foi visto que a ausência de IFN-tipo I não agrava as lesões histopatológicas e a carga parasitária nesses órgãos (MIN et al., 2018).

O desenvolvimento de uma resposta imune Th1 adequada é considerado de primordial importância para a proteção contra parasitos intracelulares como *N. caninum*. Deste modo, nós avaliamos a capacidade de camundongos WT e IFNAR<sup>-/-</sup> em produzir citocinas e moléculas efetoras sabidamente envolvidas na resposta protetora do hospedeiro contra este parasito. Nossos resultados demonstraram que os animais *knockout* produzem concentrações reduzidas das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , além da baixa produção de NO em comparação aos animais do tipo selvagem durante a fase aguda da infecção. Esses achados sugerem que IFN-tipo I possui efeito de modulação positiva de citocinas indutoras de uma resposta imune Th1, bem como de NO, molécula efetora de grande importância na eliminação do parasito.

De maneira geral, diversos estudos na literatura comprovam que IFN-tipo I exerce importante efeito imunomodulatório na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  em infecções de origem não-viral (CHEN; LIU; CAO, 2017; IVASHKIV; DONLIN, 2014; MIRANDA et al., 2019). Isso pode ser explicado pelo fato de IFN-tipo I e IFN- $\gamma$  possuírem efeitos redundantes em vários tipos celulares, com a possibilidade de *crosstalk* durante infecções por protozoários. Sabe-se que em condições homeostáticas, essa “ligação cruzada” é benéfica ao hospedeiro por causar uma

produção basal de IFN- tipo I, a qual pode estimular as células a desenvolver respostas apropriadas para todos os tipos de interferons (GOUGH et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que IFN-tipo I, juntamente com IL-12, possuem a capacidade de “primar” linfócitos T antígeno-específicos para induzir a produção de IFN-  $\gamma$  *in vitro* (WAY et al., 2007).

Em relação a produção de óxido nítrico por parasitas protozoários, nossos resultados corroboram com dados já descritos na literatura, como no modelo murino de infecção por *Leishmania major*, no qual a produção de IFN-tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) induzida pelo parasito ativa a síntese por macrófagos da molécula óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e catalisa a síntese de óxido nítrico, estimulando a resistência do hospedeiro (DIEFENBACH et al., 1998). Além disso, o tratamento com IFN- $\beta$  de camundongos BALB/c infectados pelo mesmo parasito induz *up-regulation* da expressão de iNOS, protegendo contra a infecção progressiva (MATTNER et al., 2004). Outro estudo sugere que, no caso da infecção por *T. cruzi*, a produção de IFN-tipo I coestimula a síntese de NO precocemente, contribuindo para um melhor controle da parasitemia e consequentemente da resistência do hospedeiro (COSTA et al., 2006).

Alguns estudos abordando infecções virais agudas já demonstraram a influência de IFN-tipo I na resposta imune humoral promovendo a produção de anticorpos antígeno-específicos (FINK et al., 2006; LUND et al., 2004). No entanto, durante a fase crônica da infecção essas citocinas podem exercer um papel imunossupressor, causando um bloqueio das funções de linfócitos B (FALLET et al., 2016; MOSEMAN et al., 2016). Em casos de leishmaniose visceral, que possui como marcador uma hipergamaglobulinemia, IFN-tipo I também parece ser um regulador dessa condição, visto que o bloqueio da sinalização produtora dessas citocinas reduz significativamente os títulos de IgG antígeno-específicos (SILVA-BARRIOS et al., 2016). Nesse contexto, nossos resultados mostraram que IFN-tipo I age com neutralidade na produção de anticorpos IgG tanto na fase aguda, quanto crônica, não interferindo nos títulos de anticorpos tendo por referência os títulos de animais WT. Apesar deste resultado não ter sido considerado relevante estatisticamente, biologicamente é notável que IFN-tipo I é capaz de conferir resistência ao hospedeiro, já que este grupo de citocinas regula a produção de outras citocinas e moléculas efetoras importantes para o estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório que possa eliminar o parasito e também regulatório, a fim de evitar danos teciduais exagerados.

## 14 CONCLUSÃO

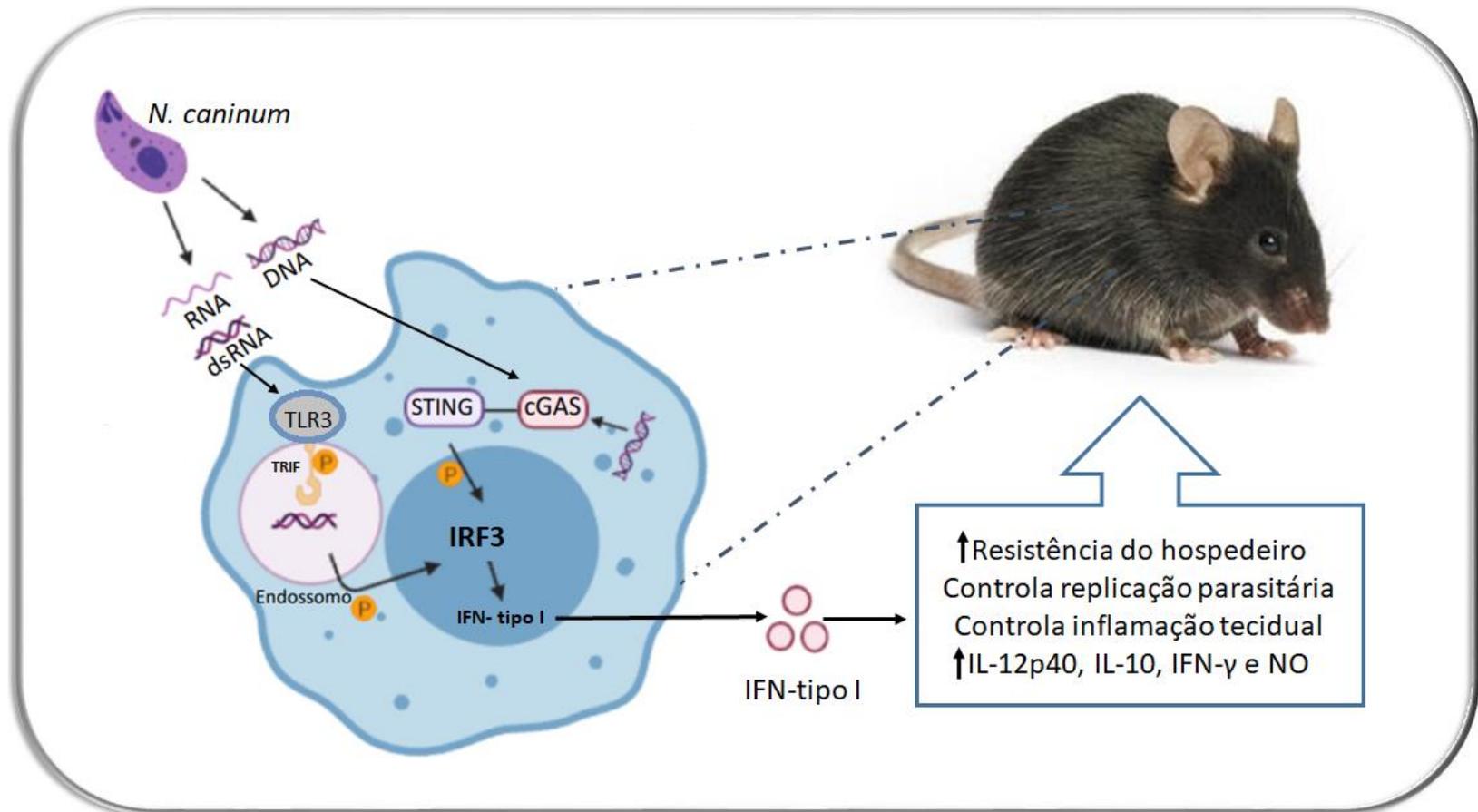
Em conjunto, nossos resultados demonstram que o grupo de citocinas IFN-tipo I induz resistência ao hospedeiro contra *N. caninum*, por controlar a replicação parasitária aguda e crônica, bem como os danos teciduais demasiados oriundos do processo inflamatório gerado pela infecção. Além disso, nosso trabalho mostra a influência de IFN-tipo I na indução de moléculas pró-inflamatórias do perfil Th1, como IL-12, IFN- $\gamma$  e NO, reforçando a imunidade anti-parasitária. Assim, concluímos que IFN-tipo I, que é classicamente descrito como atuante na imunidade anti-viral, participa na resistência contra o parasito protozoário *N. caninum*.

## 15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese de doutorado apresentada em três capítulos teve como objetivo estudar parte de como se dá o reconhecimento de RNA e de DNA do parasito *N. caninum* pelas vias de sinalização TLR3-TRIF e cGAS-STING. No capítulo I vimos que o RNA do parasito ativa a via de TLR3-TRIF, que é importante para a resistência do hospedeiro frente a infecção em camundongos, modulando a resposta imune do tipo Th1 para auxiliar no controle do parasitismo e inflamação tecidual. No capítulo II demonstramos que o DNA de *N. caninum* induz a produção de IFN-tipo I e o aumento de expressão das moléculas da via de sinalização de cGAS-STING. Além disso, mostramos que STING influencia na produção de IL-12, IL-10 e atua no controle da replicação parasitária. Ambas as vias de sinalização estudadas culminam na produção de IFN-tipo I, assim, no capítulo III apresentamos resultados de experimentos *in vivo* demonstrando a importância desse grupo de citocinas, que são classicamente descritas como atuantes na imunidade anti-viral, na resistência do hospedeiro contra *N. caninum*, controlando a replicação parasitária e modulando a produção de citocinas e outras moléculas chave para a eliminação do parasito (**figura 18**).

Acreditamos que nossos resultados fornecerão importantes informações científicas que auxiliem no desenvolvimento de protocolos profiláticos e terapêuticos contra a neosporose. Desse modo, estudos futuros são necessários para identificar os possíveis ligantes presentes nos ácidos

nucléicos de *N. caninum* que são diretamente reconhecidos pelos receptores TLR3 e cGAS, e que podem ser utilizados para o desenvolvimento de uma vacina de nova geração eficaz contra a neosporose, visando aumentar os escores reprodutivos na criação de ruminantes e induzindo, por consequência, melhorias de rendimento e competitividade externa neste importante setor da economia nacional.



**Figura 18: Diferentes vias de produção de IFN-tipo I após reconhecimento de RNA e DNA de *N. caninum*.** O RNA do parasito é reconhecido pelo receptor TLR3, que induz recrutamento de TRIF e fosforilação e translocação nuclear do fator de transcrição IRF3 para posterior produção de IFN-tipo I. No caso do DNA, ocorre reconhecimento através da via de sinalização dependente de cGAS-STING culminando na produção de IFN-tipo I, aumentando a resistência do hospedeiro, controlando a replicação parasitária e a inflamação tecidual favorecendo a produção de citocinas e moléculas efetoras como IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$  e óxido nítrico (NO).

## ANEXO 1 – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal



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 Knockout
Número de animais	4572
Peso / Idade	20 g / 6-8
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Centro de Biotério e Experimentação Animal CBEA - UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Aktividade(s)	-

Uberlândia, 24 de novembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUAUFU

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C.; TANAKA, S.; IHARA, F.; NISHIKAWA, Y. Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice. **Clin Vaccine Immunol**, 21, 1185-1188,2014. <https://doi.org/10.1128/CVI.00082-14>

AGUADO-MARTINEZ, A.; BASTO, A. P.; TANAKA, S.; RYSER, L. T.; NUNES, T. P.; ORTEGA-MORA, L. M.; ARRANZ-SOLIS, D.; LEITAO, A.; HEMPHILL, A. Immunization with a cocktail of antigens fused with OprI reduces *Neospora caninum* vertical transmission and postnatal mortality in mice. **Vaccine**, 37, 473-483,2019. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.060>

AHN, J.; BARBER, G. N. STING signaling and host defense against microbial infection. **Exp Mol Med**, 51, 1-10,2019. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0333-0>

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. **Res Vet Sci**, 95, 303-309,2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.008>

ALMERIA, S.; SERRANO-PEREZ, B.; LOPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microb Pathog**, 109, 177-182,2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.042>

ALVAREZ-GARCIA, G.; PITARCH, A.; ZABALLOS, A.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; GIL, C.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; AGUADO-MARTINEZ, A.; ORTEGA-MORA, L. M. The NcGRA7 gene encodes the immunodominant 17 kDa antigen of *Neospora caninum*. **Parasitology**, 134, 41-50,2007. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001284>

ATKINSON, R. A.; RYCE, C.; MILLER, C. M.; BALU, S.; HARPER, P. A.; ELLIS, J. T. Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection. **Int J Parasitol**, 31, 67-71,2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00153-3)

BALL, E. A.; SAMBO, M. R.; MARTINS, M.; TROVOADA, M. J.; BENCHIMOL, C.; COSTA, J.; ANTUNES GONCALVES, L.; COUTINHO, A.; PENHA-GONCALVES, C. IFNAR1 controls progression to cerebral malaria in children and CD8+ T cell brain pathology in Plasmodium berghei-infected mice. **J Immunol**, 190, 5118-5127,2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300114>

BARBER, G. N. STING: infection, inflammation and cancer. **Nat Rev Immunol**, 15, 760-770,2015. <https://doi.org/10.1038/nri3921>

BARBER, J. S.; HOLMDAHL, O. J.; OWEN, M. R.; GUY, F.; UGGLA, A.; TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). **Parasitology**, 111 ( Pt 5), 563-568,1995. <https://doi.org/10.1017/S0031182000077039>

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

BLASI, E.; RADZIOCH, D.; MERLETTI, L.; VARESIO, L. Generation of macrophage cell line from fresh bone marrow cells with a myc/raf recombinant retrovirus. **Cancer Biochem Biophys**, 10, 303-317,1989.

BOGDAN, C.; MATTNER, J.; SCHLEICHER, U. The role of type I interferons in non-viral infections. **Immunol Rev**, 202, 33-48,2004 <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00207.x>

BOTELHO, A. S.; TEIXEIRA, L.; CORREIA-DA-COSTA, J. M.; FAUSTINO, A. M.; CASTRO, A. G.; VILANOVA, M. *Neospora caninum*: high susceptibility to the parasite in C57BL/10ScCr mice. **Exp Parasitol**, 115, 68-75,2007. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.06.004>

BRICKELL, J. S.; MCGOWAN, M. M.; WATHES, D. C. Association between *Neospora caninum* seropositivity and perinatal mortality in dairy heifers at first calving. **Vet Rec**, 167, 82-85,2010. <https://doi.org/10.1136/vr.c3583>

CALERO-BERNAL, R.; HORCAJO, P.; HERNANDEZ, M.; ORTEGA-MORA, L. M.; FUENTES, I. Absence of *Neospora caninum* DNA in Human Clinical Samples, Spain. **Emerg Infect Dis**, 25, 1226-1227,2019. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181431>

CANTON, G. J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; BENAVIDES-SILVAN, J.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PANG, Y.; SMITH, S. H.; ROCCHI, M. S.; BUXTON, D.; INNES, E. A.; CHIANINI, F. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. **Vet Res**, 45, 11,2014. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-11>

CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, 26, 253-279,2017. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017045>

CHEN, J. Q.; SZODORAY, P.; ZEHER, M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. **Clin Rev Allergy Immunol**, 50, 1-17,2016. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8473-z>

CHEN, K.; LIU, J.; CAO, X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. **J Autoimmun**, 83, 1-11,2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.008>

CHEN, Q.; SUN, L.; CHEN, Z. J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. **Nat Immunol**, 17, 1142-1149,2016. <https://doi.org/10.1038/ni.3558>

CHEN, S.; LYU, C.; ZHOU, J.; HUANG, S.; ZHANG, Y.; LIU, G.; LIU, K.; CHEN, D.; HU, Y.; ZHOU, L.; GU, Y. TLR4 signaling pathway mediates the LPS/ischemia-induced expression of monocyte chemoattractant protein 1 in microglia. **Neurosci Lett**, 686, 33-40,2018. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.052>

CHESSLER, A. D.; CARADONNA, K. L.; DA'DARA, A.; BURLEIGH, B. A. Type I interferons increase host susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, 79, 2112-2119,2011. <https://doi.org/10.1128/IAI.01176-10>

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; LOPEZ-PEREZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infect Immun**, 74, 2491-2494,2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2491-2494.2006>

COOMBS, R. S.; BLANK, M. L.; ENGLISH, E. D.; ADOMAKO-ANKOMAH, Y.; URAMA, I. S.; MARTIN, A. T.; YAROVINSKY, F.; BOYLE, J. P. Immediate Interferon Gamma Induction Determines Murine Host Compatibility Differences between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **Infect Immun**, 88, 2020. <https://doi.org/10.1128/IAI.00027-20>

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

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

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

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONCA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, 177, 3193-3200,2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3193>

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

DAS, S.; KUMAR, A.; MANDAL, A.; ABHISHEK, K.; VERMA, S.; KUMAR, A.; DAS, P. Nucleic acid sensing activates the innate cytosolic surveillance pathway and promotes parasite survival in visceral leishmaniasis. **Sci Rep**, 9, 9825,2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45800-0>

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. **Sci Rep**, 6, 29289,2016. <https://doi.org/10.1038/srep29289>

DE BARROS, L. D.; MIURA, A. C.; MINUTTI, A. F.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitol Int**, 67, 397-402,2018. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.03.009>

DEBARE, H.; SCHMIDT, J.; MOIRE, N.; DUCOURNAU, C.; ACOSTA PAGUAY, Y. D.; SCHWARZ, R. T.; DIMIER-POISSON, I.; DEBIERRE-GROCKIEGO, F. In vitro cellular responses to *Neospora caninum* glycosylphosphatidylinositols depend on the host origin of antigen presenting cells. **Cytokine**, 119, 119-128,2019. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.014>

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type 1 interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, 8, 77-87,1998. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80460-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80460-4)

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. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, 4, 216-238,2015. <https://doi.org/10.1016/j.iippaw.2015.04.002>

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol**, 41, 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. **Int J Parasitol**, 32, 929-946,2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **J Comp Pathol**, 134, 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. **J Am Vet Med Assoc**, 192, 1269-1285,1988.

DUBEY, J. P.; HEMPHILL, A.; CALERO-BERNAL, R.; SCHARES, G. **Neosporosis in animals**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. xviii, 529 pages ISBN 9781498752541 (hardback alk. paper). <https://doi.org/10.1201/9781315152561>

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Vet Parasitol**, 181, 382-387,2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018>

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol**, 67, 1-59,1996. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7)

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

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. **J Parasitol**, 91, 1217-1218,2005. <https://doi.org/10.1645/GE-576R.1>

EIRAS, C.; ARNAIZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L. M.; SANJUANL, M. L.; YUS, E.; DIEGUEZ, F. J. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Prev Vet Med**, 98, 128-132,2011. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.10.014>

ELLIS, J. T.; RYCE, C.; ATKINSON, R.; BALU, S.; JONES, P.; HARPER, P. A. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. **Parasitology**, 120 ( Pt 4), 383-390,2000. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005673>

EPERON, S.; BRONNIMANN, K.; HEMPHILL, A.; GOTTSSTEIN, B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunol**, 21, 225-236,1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00223.x>

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

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

FALLET, B.; NARR, K.; ERTUNA, Y. I.; REMY, M.; SOMMERSTEIN, R.; CORNILLE, K.; KREUTZFELDT, M.; PAGE, N.; ZIMMER, G.; GEIER, F.; STRAUB, T.; PIRCHER, H.; LARIMORE, K.; GREENBERG, P. D.; MERKLER, D.; PINSCHOWER, D. D. Interferon-driven deletion of antiviral B cells at the onset of chronic infection. **Sci Immunol**, 1, 2016.

FEINTUCH, C. M.; TARE, A.; CUSUMANO, L. R.; BENAYOUN, J.; RYU, S.; SIXPENCE, A.; SEYDEL, K.; LAUFER, M.; TAYLOR, T.; SUH, Y.; DAILY, J. P. Type I Interferon Receptor Variants in Gene Regulatory Regions are Associated with Susceptibility to Cerebral Malaria in Malawi. **Am J Trop Med Hyg**, 98, 1692-1698,2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0887>

FEREIG, R. M.; NISHIKAWA, Y. From Signaling Pathways to Distinct Immune Responses: Key Factors for Establishing or Combating *Neospora caninum* Infection in Different Susceptible Hosts. **Pathogens**, 9, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050384>

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

FINK, K.; LANG, K. S.; MANJARREZ-ORDUNO, N.; JUNTA, T.; SENN, B. M.; HOLDENER, M.; AKIRA, S.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses. **Eur J Immunol**, 36, 2094-2105,2006. <https://doi.org/10.1002/eji.200635993>

GALLEGO-MARIN, C.; SCHRUM, J. E.; ANDRADE, W. A.; SHAFFER, S. A.; GIRALDO, L. F.; LASSO, A. M.; KURT-JONES, E. A.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T. Cyclic GMP-AMP Synthase Is the Cytosolic Sensor of Plasmodium falciparum Genomic DNA and Activates Type I IFN in Malaria. **J Immunol**, 200, 768-774,2018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701048>

GARCIA-SANCHEZ, M.; JIMENEZ-PELAYO, L.; HORCAJO, P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; OLAFSSON, E. B.; BHANDAGE, A. K.; BARRAGAN, A.; WERLING, D.; ORTEGA-MORA, L. M.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. Differential Responses of Bovine Monocyte-Derived Macrophages to Infection by *Neospora caninum* Isolates of High and Low Virulence. **Front Immunol**, 10, 915,2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00915>

GIBSON-CORLEY, K. N.; OLIVIER, A. K.; MEYERHOLZ, D. K. Principles for valid histopathologic scoring in research. **Vet Pathol**, 50, 1007-1015,2013. <https://doi.org/10.1177/0300985813485099>

GISSOT, M.; CHOI, S. W.; THOMPSON, R. F.; GREALLY, J. M.; KIM, K. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* lack detectable DNA cytosine methylation. **Eukaryot Cell**, 7, 537-540,2008. <https://doi.org/10.1128/EC.00448-07>

GOLSHIRI-ISFAHANI, A.; AMIZADEH, M.; ARABABADI, M. K. The roles of toll like receptor 3, 7 and 8 in allergic rhinitis pathogenesis. **Allergol Immunopathol (Madr)**, 46, 503-507,2018. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2017.09.026>

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

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, 13, 133-150,2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>

GOUGH, D. J.; MESSINA, N. L.; HUI, L.; GOULD, J. A.; SABAPATHY, K.; ROBERTSON, A. P.; TRAPANI, J. A.; LEVY, D. E.; HERTZOG, P. J.; CLARKE, C. J.; JOHNSTONE, R. W. Functional crosstalk between type I and II interferon through the regulated expression of STAT1. **PLoS Biol**, 8, e1000361,2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000361>

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. **Transbound Emerg Dis**, 67, 29-32,2020. <https://doi.org/10.1111/tbed.13358>

HAHN, W. O.; BUTLER, N. S.; LINDNER, S. E.; AKILESH, H. M.; SATHER, D. N.; KAPPE, S. H.; HAMERMAN, J. A.; GALE, M., JR.; LILES, W. C.; PEPPER, M. cGAS-mediated control of blood-stage malaria promotes Plasmodium-specific germinal center responses. **JCI Insight**, 3, 2018. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94142>

HEIJINK, A. M.; TALENS, F.; JAE, L. T.; VAN GIJN, S. E.; FEHRMANN, R. S. N.; BRUMMELKAMP, T. R.; VAN VUGT, M. BRCA2 deficiency instigates cGAS-mediated inflammatory signaling and confers sensitivity to tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity. **Nat Commun**, 10, 100,2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07927-y>

HEMPHILL, A.; AGUADO-MARTINEZ, A.; MULLER, J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**, 143, 245-259,2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001596>

HORCAJO, P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; AGUADO-MARTINEZ, A.; HEMPHILL, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite Immunol**, 38, 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. **Clin Exp Immunol**, 172, 490-499,2013. <https://doi.org/10.1111/cei.12060>

HU, W.; JAIN, A.; GAO, Y.; DOZMOROV, I. M.; MANDRAJU, R.; WAKELAND, E. K.; PASARE, C. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 112, 13994-13999,2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510760112>

INNES, E. A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Vet Immunol Immunopathol**, 108, 29-36,2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>

ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, 455, 674-678,2008. <https://doi.org/10.1038/nature07317>

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nat Rev Immunol**, 14, 36-49,2014. <https://doi.org/10.1038/nri3581>

JESUS, E. E.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, A. B.; FREIRE, S. M.; TARDY, M. B.; EL-BACHA, R. S.; COSTA, S. L.; COSTA, M. F. Effects of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. **Exp Parasitol**, 133, 269-274,2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.016>

JIMENEZ-DALMARONI, M. J.; GERSWHIN, M. E.; ADAMOPOULOS, I. E. The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. **Autoimmun Rev**, 15, 1-8,2016. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.009>

JIN, X.; GONG, P.; ZHANG, X.; LI, G.; ZHU, T.; ZHANG, M.; LI, J. Activation of ERK Signaling via TLR11 Induces IL-12p40 Production in Peritoneal Macrophages Challenged by *Neospora caninum*. **Front Microbiol**, 8, 1393,2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01393>

JOHNSON, D. C., 2ND; WIDLANSKI, T. S. Overview of the synthesis of nucleoside phosphates and polyphosphates. **Curr Protoc Nucleic Acid Chem**, Chapter 13, Unit 13 11,2004.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, 5, 461,2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>

KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ, M.; BJORKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPHILL, A. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. **Infect Immun**, 70, 3187-3198,2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3187-3198.2002>

KELLER, N.; RIESEN, M.; NAGULESWARAN, A.; VONLAUFEN, N.; STETTLER, R.; LEEPIN, A.; WASTLING, J. M.; HEMPHILL, A. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. **Infect Immun**, 72, 4791-4800,2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4791-4800.2004>

KIM, C. C.; NELSON, C. S.; WILSON, E. B.; HOU, B.; DEFRANCO, A. L.; DERISI, J. L. Splenic red pulp macrophages produce type I interferons as early sentinels of malaria infection but are dispensable for control. **PLoS One**, 7, e48126,2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048126>

KIM, Y. M.; BRINKMANN, M. M.; PAQUET, M. E.; PLOEGH, H. L. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. **Nature**, 452, 234-238,2008. <https://doi.org/10.1038/nature06726>

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*. **Int J Parasitol**, 40, 945-950,2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>

KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A. K.; MOLDAL, T.; BJORKMAN, C.; OLSEN, I. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. **Int J Parasitol**, 37, 329-339,2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.002>

KONNO, H.; BARBER, G. N. The STING controlled cytosolic-DNA activated innate immune pathway and microbial disease. **Microbes Infect**, 16, 998-1001,2014. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.002>

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. **J Comp Pathol**, 153, 9-13,2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.03.005>

LEE, A. J.; ASHKAR, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. **Front Immunol**, 9, 2061,2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061>

LEGNANI, S.; PANTCHEV, N.; FORLANI, A.; ZINI, E.; SCHARES, G.; BALZER, J.; ROCCABIANCA, P.; FERRI, F.; ZANNA, G. Emergence of cutaneous neosporosis in a dog receiving immunosuppressive therapy: molecular identification and management. **Vet Dermatol**, 27, 49-e14,2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12273>

LEI, T.; WANG, H.; LIU, J.; NAN, H.; LIU, Q. ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **PLoS One**, 9, e99744,2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099744>

LEINEWEBER, M.; SPEKKER-BOSKER, K.; INCE, V.; SCHARES, G.; HEMPHILL, A.; ELLER, S. K.; DAUBENER, W. First Characterization of the *Neospora caninum* Dense Granule Protein GRA9. **Biomed Res Int**, 2017, 6746437,2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6746437>

LI, S.; GONG, P.; ZHANG, N.; LI, X.; TAI, L.; WANG, X.; YANG, Z.; YANG, J.; ZHU, X.; ZHANG, X.; LI, J. 14-3-3 Protein of *Neospora caninum* Modulates Host Cell Innate Immunity

Through the Activation of MAPK and NF-kappaB Pathways. **Front Microbiol**, 10, 37,2019.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00037>

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

LIDDELL, S.; LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. **Mol Biochem Parasitol**, 93, 153-158,1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00031-0)

LIN, R.; HEYLBROECK, C.; PITHA, P. M.; HISCOTT, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. **Mol Cell Biol**, 18, 2986-2996,1998.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.18.5.2986>

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, 36, 205-222,2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>

LIO, C. W.; MCDONALD, B.; TAKAHASHI, M.; DHANWANI, R.; SHARMA, N.; HUANG, J.; PHAM, E.; BENEDICT, C. A.; SHARMA, S. cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection. **J Virol**, 90, 7789-7797,2016.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01040-16>

LIU, D.; WU, H.; WANG, C.; LI, Y.; TIAN, H.; SIRAJ, S.; SEHGAL, S. A.; WANG, X.; WANG, J.; SHANG, Y.; JIANG, Z.; LIU, L.; CHEN, Q. STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. **Cell Death Differ**, 26, 1735-1749,2019.  
<https://doi.org/10.1038/s41418-018-0251-z>

LIU, G.; CUI, X.; HAO, P.; YANG, D.; LIU, J.; LIU, Q. GRA 14, a novel dense granule protein from *Neospora caninum*. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 45, 607-609,2013.  
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmt036>

LIU, L.; BOTOS, I.; WANG, Y.; LEONARD, J. N.; SHILOACH, J.; SEGAL, D. M.; DAVIES, D. R. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. **Science**, 320, 379-381,2008. <https://doi.org/10.1126/science.1155406>

LIU, Y.; REICHEL, M. P.; LO, W. C. Combined control evaluation for *Neospora caninum* infection in dairy: Economic point of view coupled with population dynamics. **Vet Parasitol**, 277, 108967,2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108967>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, 402-408,2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

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. **Clin Vaccine Immunol**, 13, 84-89,2006. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.84-89.2006>

LOPEZ, R.; DEMICK, K. P.; MANSFIELD, J. M.; PAULNOCK, D. M. Type I IFNs play a role in early resistance, but subsequent susceptibility, to the African trypanosomes. **J Immunol**, 181, 4908-4917,2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4908>

LUND, J. M.; ALEXOPOULOU, L.; SATO, A.; KAROW, M.; ADAMS, N. C.; GALE, N. W.; IWASAKI, A.; FLAVELL, R. A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, 5598-5603,2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400937101>

MA, L.; LIU, G.; LIU, J.; LI, M.; ZHANG, H.; TANG, D.; LIU, Q. *Neospora caninum* ROP16 play an important role in the pathogenicity by phosphorylating host cell STAT3. **Vet Parasitol**, 243, 135-147,2017a. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.020>

MA, L.; LIU, J.; LI, M.; FU, Y.; ZHANG, X.; LIU, Q. Rhoptry protein 5 (ROP5) Is a Key Virulence Factor in *Neospora caninum*. **Front Microbiol**, 8, 370,2017b. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00370>

MAJUMDAR, T.; CHATTOPADHYAY, S.; OZHEGOV, E.; DHAR, J.; GOSWAMI, R.; SEN, G. C.; BARIK, S. Induction of interferon-stimulated genes by IRF3 promotes replication of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**, 11, e1004779,2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004779>

MANN, T. R.; CADORE, G. C.; CAMILLO, G.; VOGEL, F. S.; SCHMIDT, C.; ANDRADE, C. M. Canine cutaneous neosporosis in Brazil. **Vet Dermatol**, 27, 195-197,2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12294>

MANSILLA, F. C.; QUINTANA, M. E.; LANGELLOTTI, C.; WILDA, M.; MARTINEZ, A.; FONZO, A.; MOORE, D. P.; CARDOSO, N.; CAPOZZO, A. V. Immunization with *Neospora caninum* profilin induces limited protection and a regulatory T-cell response in mice. **Exp Parasitol**, 160, 1-10,2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.10.008>

MARCAIS, A.; VIEL, S.; GRAU, M.; HENRY, T.; MARVEL, J.; WALZER, T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. **Front Immunol**, 4, 450,2013. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00450>

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S., JR.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, 5, e15263,2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015263>

MARIN, M. S.; HECKER, Y. P.; QUINTANA, S.; PEREZ, S. E.; LEUNDA, M. R.; CANTON, G. J.; COBO, E. R.; MOORE, D. P.; ODEON, A. C. Immunization with inactivated antigens of *Neospora caninum* induces toll-like receptors 3, 7, 8 and 9 in maternal-fetal interface of infected pregnant heifers. **Vet Parasitol**, 243, 12-17,2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.005>

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J Parasitol**, 84, 983-991,1998. <https://doi.org/10.2307/3284632>

MARUGAN-HERNANDEZ, V. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. **J Comp Pathol**, 157, 193-200,2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.08.001>

MATTA, S. K.; OLIAS, P.; HUANG, Z.; WANG, Q.; PARK, E.; YOKOYAMA, W. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116, 17480-17491,2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904637116>

MATTNER, J.; WANDERSEE-STEINHAUSER, A.; PAHL, A.; ROLLINGHOFF, M.; MAJEAU, G. R.; HOCHMAN, P. S.; BOGDAN, C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN-beta. **J Immunol**, 172, 7574-7582,2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7574>

MCALLISTER, C. S.; LAKHDARI, O.; PINETON DE CHAMBRUN, G.; GAREAU, M. G.; BROQUET, A.; LEE, G. H.; SHENOUDA, S.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival in vivo. **J Immunol**, 190, 418-427,2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202756>

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, 32, 443-463,2016. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>

MIN, C. K.; KIM, H. I.; HA, N. Y.; KIM, Y.; KWON, E. K.; YEN, N. T. H.; YOUN, J. I.; JEON, Y. K.; INN, K. S.; CHOI, M. S.; CHO, N. H. A Type I Interferon and IL-10 Induced by *Orientia tsutsugamushi* Infection Suppresses Antigen-Specific T Cells and Their Memory Responses. **Front Immunol**, 9, 2022,2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02022>

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

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

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. **Vet Parasitol**, 182, 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 Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunol Cell Biol**, 88, 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. Toll-Like Receptor 3-TRIF Pathway Activation by *Neospora caninum* RNA Enhances Infection Control in Mice. **Infect Immun**, 87, 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00739-18>

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Exp Parasitol**, 140, 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. **Vet Parasitol**, 175, 245-251,2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.020>

MOSEMAN, E. A.; WU, T.; DE LA TORRE, J. C.; SCHWARTZBERG, P. L.; MCGAVERN, D. B. Type I interferon suppresses virus-specific B cell responses by modulating CD8(+) T cell differentiation. **Sci Immunol**, 1, 2016.

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

MOTA, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; NADIPURAM, S. M.; VASHISHT, A. A.; 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. **Front Microbiol**, 7, 1456,2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01456>

NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; BJORKMAN, C.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. **Infect Immun**, 69, 6483-6494,2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6483-6494.2001>

NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. **Exp Parasitol**, 104, 149-158,2003. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00137-1)

NECESANKOVA, M.; VYCHODILOVA, L.; ALBRECHTOVA, K.; KENNEDY, L. J.; HLAVAC, J.; SEDLAK, K.; MODRY, D.; JANOVA, E.; VYSKOCIL, M.; HORIN, P. MYD88 and functionally related genes are associated with multiple infections in a model population of Kenyan village dogs. **Mol Biol Rep**, 43, 1451-1463,2016. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4078-8>

NISHIKAWA, Y.; SHIMODA, N.; FERREIG, R. M.; MORITAKA, T.; UMEDA, K.; NISHIMURA, M.; IHARA, F.; KOBAYASHI, K.; HIMORI, Y.; SUZUKI, Y.; FURUOKA, H. *Neospora caninum* Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. **Appl Environ Microbiol**, 84, 2018. <https://doi.org/10.1128/AEM.01350-18>

OKABE, Y.; KAWANE, K.; AKIRA, S.; TANIGUCHI, T.; NAGATA, S. Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. **J Exp Med**, 202, 1333-1339,2005. <https://doi.org/10.1084/jem.20051654>

OROZCO, M. A.; MORALES, E.; SALMERON, F. Characterization of the inflammatory response in the uteri of cows infected naturally by *Neospora caninum*. **J Comp Pathol**, 148, 148-156,2013. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.05.008>

OSHIRO, L. M.; MOTTA-CASTRO, A. R.; FREITAS, S. Z.; CUNHA, R. C.; DITTRICH, R. L.; MEIRELLES, A. C.; ANDREOTTI, R. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis

in human immunodeficiency virus carriers. **Rev Soc Bras Med Trop**, 48, 568-572,2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0151-2015>

PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, a016246,2014. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>

PASTOR-FERNANDEZ, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; HEMPHILL, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhopty proteins during the tachyzoite lytic cycle. **Parasitology**, 143, 97-113,2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001511>

PEPPER, M.; DZIERSZINSKI, F.; WILSON, E.; TAIT, E.; FANG, Q.; YAROVINSKY, F.; LAUFER, T. M.; ROOS, D.; HUNTER, C. A. Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. **J Immunol**, 180, 6229-6236,2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6229>

PERALES-LINARES, R.; NAVAS-MARTIN, S. Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: friend or foe? **Immunology**, 140, 153-167,2013. <https://doi.org/10.1111/imm.12143>

PEREIRA, L. M.; CANDIDO-SILVA, J. A.; DE VRIES, E.; YATSUDA, A. P. A new thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum* (NcMIC2-like1). **Parasitology**, 138, 287-297,2011. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001290>

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunol Rev**, 202, 8-32,2004. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>

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

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nat Rev Immunol**, 5, 375-386,2005. <https://doi.org/10.1038/nri1604>

PONTS, N.; FU, L.; HARRIS, E. Y.; ZHANG, J.; CHUNG, D. W.; CERVANTES, M. C.; PRUDHOMME, J.; ATANASOVA-PENICHON, V.; ZEHAOU, E.; BUNNIK, E. M.; RODRIGUES, E. M.; LONARDI, S.; HICKS, G. R.; WANG, Y.; LE ROCH, K. G. Genome-wide mapping of DNA methylation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell Host Microbe**, 14, 696-706,2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.007>

RAMNATH, D.; POWELL, E. E.; SCHOLZ, G. M.; SWEET, M. J. The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair. **Semin Cell Dev Biol**, 61, 22-30,2017. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.014>

RAMNATH, D.; TUNNY, K.; HOHENHAUS, D. M.; PITTS, C. M.; BERGOT, A. S.; HOGARTH, P. M.; HAMILTON, J. A.; KAPETANOVIC, R.; STURM, R. A.; SCHOLZ, G. M.; SWEET, M. J. TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes. **Immunol Cell Biol**, 93, 771-779,2015. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.77>

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

REICHEL, M. P.; MCALLISTER, M. M.; NASIR, A.; MOORE, D. P. A review of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Vet Parasitol**, 212, 75-79,2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.008>

REID, A. J.; VERMONT, S. J.; COTTON, J. A.; HARRIS, D.; HILL-CAWTHORNE, G. A.; KONEN-WAISMAN, S.; LATHAM, S. M.; MOURIER, T.; NORTON, R.; QUAIL, M. A.; SANDERS, M.; SHANMUGAM, D.; SOHAL, A.; WASMUTH, J. D.; BRUNK, B.; GRIGG, M. E.; HOWARD, J. C.; PARKINSON, J.; ROOS, D. S.; TREES, A. J.; BERRIMAN, M.; PAIN, A.; WASTLING, J. M. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathog**, 8, e1002567,2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002567>

ROCCHI, M. S.; BARTLEY, P. M.; INGLIS, N. F.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ENTRICAN, G.; KATZER, F.; INNES, E. A. Selection of *Neospora caninum* antigens stimulating bovine CD4+ve T cell responses through immuno-potency screening and proteomic approaches. **Vet Res**, 42, 91,2011. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-91>

SAADOUN, D.; RESCHE RIGON, M.; POL, S.; THIBAUT, V.; BLANC, F.; PIALOUX, G.; KARRAS, A.; BAZIN-KARA, D.; CAZORLA, C.; VITTECOQ, D.; MUSSET, L.; PELTIER, J.; DECAUX, O.; ZIZA, J. M.; LAMBOTTE, O.; CACOUB, P. PegIFNalpha/ribavirin/protease inhibitor combination in severe hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. **J Hepatol**, 62, 24-30,2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.015>

SANTOLARIA, P.; ALMERIA, S.; MARTINEZ-BELLO, D.; NOGAREDA, C.; MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; PABON, M.; YANIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F. Different humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in

purebred and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies. **Vet Parasitol**, 178, 70-76,2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.018>

SHIRAHATA, T.; MORI, A.; ISHIKAWA, H.; GOTO, H. Strain differences of interferon-generating capacity and resistance in toxoplasma-infected mice. **Microbiol Immunol**, 30, 1307-1316,1986. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1986.tb03051.x>

SILVA-BARRIOS, S.; SMANS, M.; DUERR, C. U.; QURESHI, S. T.; FRITZ, J. H.; DESCOTEAUX, A.; STAGER, S. Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. **Cell Rep**, 15, 2427-2437,2016. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.028>

SILVA, D. A.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Vet Parasitol**, 143, 234-244,2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028>

STARK, G. R.; DARNELL, J. E., JR. The JAK-STAT pathway at twenty. **Immunity**, 36, 503-514,2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013>

SUN, L.; WU, J.; DU, F.; CHEN, X.; CHEN, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science**, 339, 786-791,2013. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>

SYED-HUSSAIN, S. S.; HOWE, L.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; HARDCASTLE, M.; WILLIAMSON, N. B. Study on the use of toltrazuril to eliminate *Neospora caninum* in congenitally infected lambs born from experimentally infected ewes. **Vet Parasitol**, 210, 141-144,2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.019>

TAKASHIMA, K.; OSHIUMI, H.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. TICAM-1 is dispensable in STING-mediated innate immune responses in myeloid immune cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 499, 985-991,2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.035>

TAKASHIMA, K.; TAKEDA, Y.; OSHIUMI, H.; SHIME, H.; OKABE, M.; IKAWA, M.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation. **Biochem Biophys Res Commun**, 478, 1764-1771,2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.021>

TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of

BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Vet Parasitol**, 90, 183-191,2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00238-7)

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

TRINCHIERI, G. Type I interferon: friend or foe? **J Exp Med**, 207, 2053-2063,2010.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20101664>

VERSTAK, B.; ARNOT, C. J.; GAY, N. J. An alanine-to-proline mutation in the BB-loop of TLR3 Toll/IL-1R domain switches signalling adaptor specificity from TRIF to MyD88. **J Immunol**, 191, 6101-6109,2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300849>

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

VILLANUEVA, A. I.; HAERYFAR, S. M.; MALLARD, B. A.; KULKARNI, R. R.; SHARIF, S. Functions of invariant NK T cells are modulated by TLR ligands and IFN-alpha. **Innate Immun**, 21, 275-288,2015. <https://doi.org/10.1177/1753425914527327>

WANG, P.; LI, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; LI, Y.; LIU, S.; DU, H.; CAO, L.; OU, M.; YE, X.; LI, P.; GAO, X.; WANG, P.; JING, C.; SHAO, F.; YANG, G.; YOU, F. The GRA15 protein from *Toxoplasma gondii* enhances host defense responses by activating the interferon stimulator STING. **J Biol Chem**, 294, 16494-16508,2019. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009172>

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. **Front Immunol**, 9, 1791,2018.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01791>

WANG, X.; MAJUMDAR, T.; KESSLER, P.; OZHEGOV, E.; ZHANG, Y.; CHATTOPADHYAY, S.; BARIK, S.; SEN, G. C. STING Requires the Adaptor TRIF to Trigger Innate Immune Responses to Microbial Infection. **Cell Host Microbe**, 20, 329-341,2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.002>

WAY, S. S.; HAVENAR-DAUGHTON, C.; KOLUMAM, G. A.; ORGUN, N. N.; MURALI-KRISHNA, K. IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after Listeria

monocytogenes infection. **J Immunol**, 178, 4498-4505,2007.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4498>

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. **Clin Vaccine Immunol**, 20, 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. **Prev Vet Med**, 103, 136-144,2012. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.08.010>

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

WOO, S. R.; FUERTES, M. B.; CORRALES, L.; SPRANGER, S.; FURDYNA, M. J.; LEUNG, M. Y.; DUGGAN, R.; WANG, Y.; BARBER, G. N.; FITZGERALD, K. A.; ALEGRE, M. L.; GAJEWSKI, T. F. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. **Immunity**, 41, 830-842,2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.017>

XU, J.; HIRAMATSU, R.; SUHAIMI, H.; KATO, T.; FUJIMOTO, A.; TOKIWA, T.; IKE, K.; PARK, E. Y. *Neospora caninum* antigens displaying virus-like particles as a bivalent vaccine candidate against neosporosis. **Vaccine**, 37, 6426-6434,2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.002>

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; MORI, K.; HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol**, 169, 6668-6672,2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6668>

YANIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BECH-SABAT, G.; SERRANO, B.; NOGAREDA, C.; SANCHEZ-NADAL, J. A.; ALMERIA, S.; SANTOLARIA, P. Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. **Reprod Domest Anim**, 45, 699-705,2010.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x>

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol**, 14, 109-121,2014. <https://doi.org/10.1038/nri3598>

ZHANG, H.; TANG, K.; ZHANG, Y.; MA, R.; MA, J.; LI, Y.; LUO, S.; LIANG, X.; JI, T.; GU, Z.; LU, J.; HE, W.; CAO, X.; WAN, Y.; HUANG, B. Cell-free tumor microparticle vaccines stimulate dendritic cells via cGAS/STING signaling. **Cancer Immunol Res**, 3, 196-205,2015.  
<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0177>