



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

Manipulação gênica do protozoário *Neospora caninum* como ferramenta  
para o estudo das interações parasito-hospedeiro

CAROLINE MARTINS MOTA

UBERLÂNDIA - MG  
- 2016 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

Manipulação gênica do protozoário *Neospora caninum* como ferramenta  
para o estudo das interações parasito-hospedeiro

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

Caroline Martins Mota

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Co-orientador: Prof. Dr. Peter John Bradley

UBERLÂNDIA - MG  
- 2016 -

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

---

M917m Mota, Caroline Martins, 1986-  
2016 Manipulação gênica do protozoário *Neospora caninum* como ferramenta para o estudo das interações parasito-hospedeiro / Caroline Martins Mota. - 2016.  
115 f. : il.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.  
Coorientador: Peter John Bradley.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Genética - Teses. 3. *Toxoplasma gondii* - Teses. 4. *Neospora* - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Peter John Bradley, Peter John. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

---



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Caroline Martins Mota**

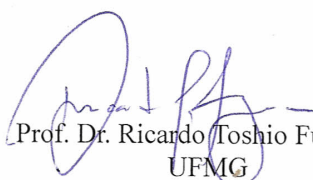
“Manipulação gênica do protozoário *Neospora caninum* como ferramenta para o estudo das interações parasito-hospedeiro”

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


Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.


Banca Examinadora:


Uberlândia, 8 de setembro de 2016.

  
Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara  
UFMG

  
Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira  
UFTM

  
Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva  
ICBIM/UFU

  
Profa. Dra. Neide Maria da Silva  
ICBIM/UFU

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

[www.imunoparasito.ufu.br](http://www.imunoparasito.ufu.br) - E-mail: [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br) - Telefax: (034) 3225-8672  
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama  
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320



*Agradecimientos*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me guiar e estar sempre presente na minha vida, me dando força, coragem e saúde para superar os obstáculos da vida. Pela oportunidade de conhecer e conviver com pessoas especiais que contribuem para que meu dia seja único.

Aos meus pais, por serem um exemplo de amor, dedicação e carinho, por me ouvirem e me aconselhar, pelo colo que consola, pelos momentos fortalecedores e por sempre estarem comigo.

Às minhas irmãs, ávos, tios (as) e primos (as) por me apoiarem e compreenderem os momentos de ausência.

Ao meu noivo Alessandro pela compreensão e carinho. Por sempre estar ao meu lado independente das circunstâncias.

Ao meu orientador Tiago Mineo, por sempre me incentivar a buscar mais na pesquisa, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e amizade. Espero um dia retribuir um pouco que me ensinaste nestes anos de convívio e orientação.

Ao Prof. José Roberto Mineo por ter me acolhido no laboratório e ter me ensinado a dar os primeiros passos na área científica, que me ensinou a amar e me dedicar a pesquisa.

Ao meu co-orientador, Prof. Peter Bradley por ter me acolhido tão bem em seu laboratório, pela atenção, paciência e ensinamentos.

À Dra. Deise A. O. Silva, que me ensinou a ter responsabilidade na realização dos experimentos e como fazê-los.

Aos meus queridos amigos Cris, Fer, Vanessa M., Flavinha, Murilo, Mylla, Zé, Marcela, Sabrina, Nerry, Pathy, Isa, Everton, Cynthia, Thiago, Fred e Patrick pela paciência e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia Vanessa R., Tamires, Heber, Vinicius, Carolina Salomão, Mariana, Jacqueline pelo convívio e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Peter Bradley, Allan, Jenny, Elliot, Charles, Hannah, Santhosh, Kevin, Andrew, Justin e Amy pelo apoio, amizade e ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Marley, Zilda, Ana Cláudia pelo apoio na rotina laboratorial, na realização dos experimentos, pela amizade e pelos momentos de descontração.

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

Às secretárias da pós-graduação, Lucileide e Lucélia, pelos conselhos valiosos, pela amizade e por sempre estarem disponíveis em ajudar.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido à aquisição de material e reagentes para a execução deste trabalho, em especial a CAPES, pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

## RESUMO

*Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, caracterizado pela presença do complexo apical composto por proteínas de micronemas, roptrias e grânulos densos, utilizadas pelo parasito durante o processo de adesão e invasão da célula hospedeira, caracterizando o principal evento na patogênese da infecção por *N. caninum* e por outros parasitos do filo Apicomplexa, influenciando assim na biologia do parasito e na interação parasito-hospedeiro. Dessa forma, ferramentas moleculares tem sido desenvolvidas na tentativa de se identificar e caracterizar esses possíveis fatores de virulência. Portanto, o presente trabalho buscou desenvolver ferramentas moleculares específicas para *N. caninum* de modo a melhorar a eficiência na manipulação genética deste parasito, sendo assim desenvolvemos *N. caninum* depletado geneticamente para a roptria Rop9 por meio da utilização do plasmídeo CRISPR-Cas9 pU6-Universal de *T. gondii* modificado pela inserção de Ku80. O parasito depletado para Rop9 mostrou-se importante durante a fase inicial da invasão e replicação do parasito, entretanto não foi caracterizado como um potencial fator de virulência para *N. caninum*. Complementarmente, proteínas de *T. gondii* foram expressas em *N. caninum* utilizando vetores específicos para este parasito, apresentando um sistema heterólogo para estudo de proteínas presentes em *Toxoplasma*. Pois, Gra15 ou Gra24 de *T. gondii* tipo II, e Rop16 de *T. gondii* tipo I foram expressos em taquizoítos de *N. caninum* de forma estável e mantiveram o seu fenótipo biológico como já apresentado pelo parasito de origem, que expressa naturalmente estas proteínas. Adicionalmente, foi observado que *N. caninum* induziu a ativação do inflamassoma através da via NLRP3, ASC e Caspase-1. Sendo a via IL-1R/ MyD88 uma via indireta importante no controle da replicação do parasito. Além disso, foi demonstrado que essa ativação é dependente de efluxo de potássio, e que diferentes cepas de *N. caninum* mantêm esse perfil de ativação. No entanto, cepas de *T. gondii* bloqueiam essa ativação sendo necessário um primeiro sinal para acionar a via do inflamassoma. Foi identificado Rop16 de *T. gondii* da cepa tipo I como responsável por bloquear essa ativação, de modo dependente a ativação de STAT3. Portanto, as ferramentas moleculares desenvolvidas e aplicadas em *N. caninum* revelaram-se úteis para identificar e caracterizar fatores de virulência envolvidos na patogênese por estes dois protozoários.

**Palavras-chave:** manipulação genética, *N. caninum*, *T. gondii*, resposta imune, inflamassoma.

## ABSTRACT

*Neospora caninum* is an obligate intracellular parasite classified in the phylum Apicomplexa, characterized by the presence of the apical complex composed by micronemes proteins, rhoptries and dense granules, used by parasite during the adhesion and invasion process of the host cell. This is the mean event in infection pathogenesis generated by *N. caninum* and other parasites from the phylum Apicomplexa, promoting influence in the parasite biology and the interface between the parasite and its host. Therefore, molecular tools have been developed in order to identify and characterize these possible virulence factors. Thus, the present study sought to establish a specific system of genetic manipulation of *N. caninum*, searching for the improvement of the genetics manipulation of this parasite. So, we developed genetically depleted *N. caninum* to Rop9 rhoptry using the pU6-Universal CRISPR-Cas9 plasmid of *T. gondii* modified by the insertion of Ku80. The Rop9 depleted parasite showed important during initial phase of invasion and replication of the parasite, however it was not characterized as a potential virulence factor for *N. caninum*. Furthermore, *T. gondii* proteins were expressed in *N. caninum* by the use of specific vectors for this parasite, showing an heterologous system for the study of *Toxoplasma* proteins, due to the fact that Gra15 or Gra24 of type II *T. gondii* and Rop16 of type I *T. gondii* were expressed in *N. caninum* tachyzoites in a stable way and kept its biological phenotype, as already presented the former parasite, that naturally expresses these proteins. In addition, it was observed that *N. caninum* induced an inflammasome activation through NLRP3, ASC and Caspase-1. IL-1R/MyD88 demonstrated an indirect pathway in the control of parasite replication. Furthermore, it was observed that this activation is dependent of the potassium efflux and that different strains of *N. caninum* keep this activation profile. However, *T. gondii* strains block this activation, making necessary a prior signal in order to active the inflammasome pathway. Type I *T. gondii* Rop16 was identified as responsible for blocking this activation, in a dependent way to the STAT3 activation. Therefore, the development of molecular tools and their application in *N. caninum* may prove to be useful to identify and characterize virulent factors involved in the pathogenesis by these two protozoans.

**Keywords:** genetic manipulation, *N. caninum*, *T. gondii*, immune response, inflammasome.

	<i>Sumário</i>
--	----------------

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	<i>Neospora caninum</i> .....	14
1.1.1	Agente etiológico.....	14
1.1.2	Ciclo biológico .....	14
1.1.3	Via de transmissão.....	17
1.1.4	Manifestações clínicas da neosporose .....	18
1.1.5	Epidemiologia.....	19
1.2	Interação parasito-hospedeiro .....	20
1.2.1	Ciclo lítico .....	20
1.2.2	Mecanismos da resposta imune protetora induzida por <i>N. caninum</i> .....	22
1.2.3	Resposta imune inata a <i>Neospora caninum</i> .....	23
1.3	Fatores de virulência de <i>Toxoplasma gondii</i> e o seu papel na resposta imune do hospedeiro.....	29
1.4	Desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética aplicados na identificação e caracterização de possíveis fatores de virulência.....	30
2	JUSTIFICATIVA .....	33
3	OBJETIVOS .....	35
3.1	Objetivo geral .....	35
3.2	Objetivos específicos .....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1	Cultura de células .....	37
4.2	Cultura de parasitos .....	37
4.3	Extração do DNA genômico de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> .....	37
4.4	Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	38
4.5	Eletroforese em gel de agarose .....	38
4.6	Purificação do fragmento de DNA em gel de agarose.....	38
4.7	Ligação do fragmento de DNA (inserto) ao plasmídeo.....	39
4.8	Preparo das células competentes .....	39
4.9	Transformação de células competentes e seleção das colônias .....	39
4.10	Purificação dos plasmídeos (Miniprep) .....	40
4.11	Transfecção estável em <i>N. caninum</i> .....	40
4.12	Obtenção e complementação do gene HPT em <i>NcLivΔHPT</i> .....	41

4.13 Depleção gênica por CRISP/Cas9 .....	41
4.14 Geração de parasitos NcLivΔHPT expressando GFP e mCherry.....	42
4.15 Geração de <i>N. caninum</i> expressando fatores de virulência de <i>T. gondii</i> .....	43
4.16 Ensaio de crescimento competitivo .....	44
4.17 Ensaio de placa .....	44
4.18 Imunofluorescência (IFA) .....	44
4.19 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	45
4.20 Western blotting (WB) .....	45
4.21 Ensaio de captura por afinidade de proteínas biotiniladas.....	46
4.22 Espectrometria de massa das proteínas biotiniladas .....	46
4.23 Detecção da ativação de STAT3 por imunofluorescência e western blotting ....	47
4.24 Obtenção dos camundongos .....	47
4.25 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	47
4.26 Infecção por <i>N. caninum</i> em BMDMs.....	48
4.27 Marcação de caspase-1 ativa.....	48
4.28 Cultura de esplenócitos.....	48
4.29 Quantificação de citocina .....	49
4.30 Ensaio in vivo para detecção de citocina .....	50
4.31 Desafio .....	50
4.32 Análise estatística .....	50
4.33 Normas de biossegurança .....	50
5 RESULTADOS .....	53
5.1 Depleção do gene HPT não altera a virulência do parasito e o perfil de resposta imune do hospedeiro.....	53
5.2 Desenvolvimento de parasitos <i>N. caninum</i> depletados geneticamente para a proteína Rop9 ( <i>Knock-out</i> ) .....	55
5.3 Depleção de Rop9 em <i>N. caninum</i> altera o crescimento do parasito in vitro.....	59
5.4 Identificação de promotores específicos e eficientes para expressão de proteínas heterólogas em <i>Neospora caninum</i> ( <i>Knock-in</i> ) .....	61
5.5 Estabelecimento de <i>N. caninum</i> expressando proteínas de <i>T. gondii</i> .....	63
5.6 Inserção de Gra15 ou Rop16 de <i>T. gondii</i> em <i>N. caninum</i> não altera o crescimento do parasito in vitro e Rop16 reduz a virulência do parasito .....	67
5.7 <i>N. caninum</i> expressando proteínas de <i>T. gondii</i> do tipo II (Gra15 e Gra24) ou tipo I (Rop16) mantêm o fenótipo imunológico .....	70



5.8 <i>N. caninum</i> é capaz de induzir ativação do inflamassoma .....	76
5.9 A ativação do inflamassoma em resposta à infecção por <i>N. caninum</i> é dependente de MyD88, NLRP3, ASC e Caspase-1 .....	77
5.10 Ativação do inflamassoma por <i>N. caninum</i> é dependente do efluxo de potássio .....	80
5.11 <i>T. gondii</i> não possui capacidade semelhante à de <i>N. caninum</i> em ativar o inflamassoma .....	81
5.12 <i>N. caninum</i> expressando proteínas de <i>T. gondii</i> tipo I (Rop16) inibe a ativação do inflamassoma .....	83
6 DISCUSSÃO .....	86
7 CONCLUSÃO .....	96
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98
9 APÊNDICE .....	113
9.1 Apêndice I: Lista de primers utilizados neste estudo .....	113
10 ANEXO .....	115
10.1 Anexo I: Comprovante da aprovação do Comitê de Ética e Utilização Animal institucional .....	115



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Neospora caninum*

### 1.1.1 Agente etiológico

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, estreitamente relacionado ao parasito *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 1988a). Historicamente, este parasito foi descrito pela primeira vez por Bjerkas et al. em 1984, na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos, paralisia dos membros posteriores, soronegativos para *T. gondii* e com cistos teciduais detectados no sistema nervoso central morfológicamente distintos dos cistos de *T. gondii* (GOODSWEN et al., 2013). Em 1988, *N. caninum* foi reconhecido como nova espécie e gênero ao se analisar cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva para toxoplasmose. Dubey et al. encontraram características que o diferenciavam do quadro de toxoplasmose, constatando-se que este agente era capaz de provocar em cães um quadro clínico mais grave que o de *T. gondii* e que havia, de fato, diferenças estruturais, histopatológicas e ausência de reatividade para *T. gondii* nos testes sorológicos e imunohistoquímicos (DUBEY e LINDSAY, 1993). Após a sua descrição, *N. caninum* foi isolado em cultura celular a partir de cistos teciduais de cães com infecção congênita (DUBEY et al., 1988b) e identificado em bovinos como causa de aborto (THILSTED e DUBEY, 1989).

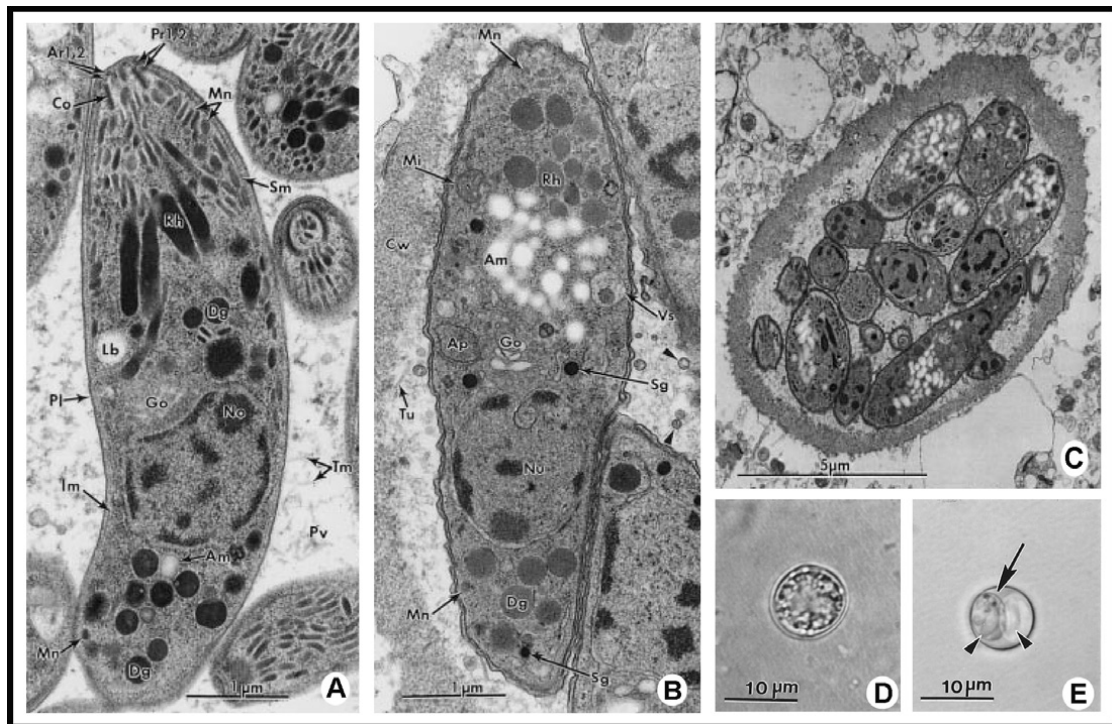
*N. caninum* é o causador da neosporose e está amplamente distribuído mundialmente, infectando diversas espécies animais, causando doença clínica significativa em bovinos e cães. A infecção natural por *N. caninum* foi demonstrada em diversos espécies de hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (DONAHOE et al., 2015).

### 1.1.2 Ciclo biológico

*N. caninum* apresenta ciclo biológico heteroxeno, ou seja, o ciclo se desenvolve em hospedeiros distintos, subdivididos em fases sexuada e assexuada. A reprodução sexuada ocorre em canídeos (cão, coiote, dingo australiano, lobo) que são considerados hospedeiros definitivos (McALLISTER et al., 1999; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011), enquanto que a reprodução assexuada ocorre em vários hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, galinhas, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes,

lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (MINEO et al., 2011; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013).

O ciclo de vida envolve três formas infecciosas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos) (Figura 1), sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito (GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013, 2013; DONAHOE et al., 2015).



**Figura 1-** Ultra-estrutura de (A) taquizoíto, (B) bradizoíto, (C) cisto, (D) oocisto não-esporulado, e (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (cabeça da seta) do parasito *N. caninum*.

**Fonte:** Goodswen (2013).

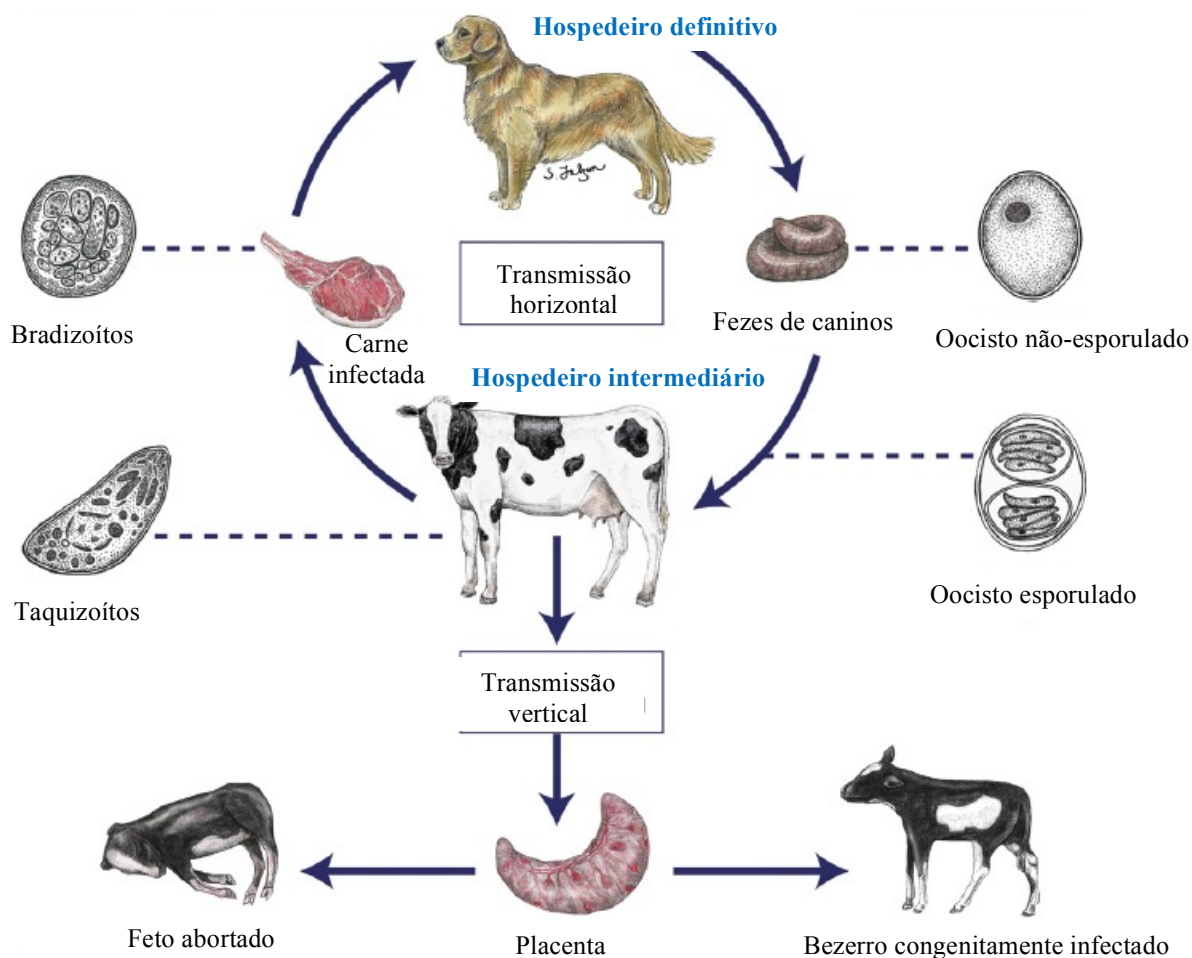
Oocistos não-esporulados (imaturos ou não infecciosos) são eliminados nas fezes de canídeos infectados. No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados, que contêm dois esporocistos dos quais cada um contém quatro esporozoítos (DUBEY, 2003; DUBEY e SCHARES, 2011).

Os hospedeiros intermediários tais como os bovinos, podem ingerir os oocistos esporulados encontrados em alimentos ou água contaminada e tornar-se infectados. Os esporozoítos são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítos que disseminam por todo organismo (GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013).

Taquizoítos residem em compartimentos intracelulares chamados vacúolos parasitóforos (VP), replicam rapidamente por endodiogenia (um processo de desenvolvimento assexuado). Neste estágio o parasito pode invadir e infectar diversos tipos de células do hospedeiro, incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, endotélio vascular, células musculares e hepatócitos (BARR et al., 1994; DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos causam uma forte resposta inflamatória e destruição de tecidos e são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (fase aguda). Sob a pressão da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos e forma os cistos que iniciam a segunda fase do desenvolvimento assexuado (ELLIS et al., 2010; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013; MONNEY e HEMPHILL, 2014).

Quanto aos bradizoítos, estes são formas de latência que se multiplicam lentamente por endodiogenia e vão formar os cistos teciduais, predominantemente em células do sistema nervoso central e músculo esquelético, podendo persistir por toda vida do hospedeiro sem causar manifestações clínicas significativas (fase crônica), embora possa ocorrer uma baixa taxa de reativação espontânea (DUBEY et al., 1992; MONNEY & HEMPHILL, 2014; McALLISTER, 2016).

O ciclo de vida (Figura 2), é completado quando os cistos presentes nos tecidos de presas (por exemplo, em tecidos musculares de animais infectados) são ingeridos por hospedeiros definitivos, e os bradizoítos liberados no intestino delgado que invadem células epiteliais e iniciam a fase sexuada com a formação de esquizontes e liberação de merozoítos. A partir deste momento, há início da gamogonia, com a produção final de oocistos não esporulados eliminados com as fezes, repetindo-se o ciclo novamente (GONDIM et al., 2004; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013; MONNEY e HEMPHILL, 2014).



**Figura 2** - Ciclo Biológico de *Neospora caninum*.  
**Fonte:** Goodswen (2013).

### 1.1.3 Via de transmissão

A transmissão a um novo hospedeiro não infectado pode ocorrer através de duas vias diferentes, chamadas transmissão horizontal e transmissão vertical. A transmissão horizontal ocorre pela ingestão de cistos teciduais (cérebro, medula espinhal, coração e músculos), que é mais provável para os carnívoros ou pela ingestão de oocistos, através de água ou alimentos contaminados (DUBEY e SCHARES, 2011; MONNEY e HEMPHILL, 2014). Além disso, outras vias secundárias de transmissão horizontal como lactogênica, venérea ou inseminação artificial têm sido investigadas e ainda não comprovadas (UGGLA et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2003; MOSKWA et al., 2007).

A transmissão vertical tem sido demonstrada em vários hospedeiros (bovinos, carneiros, cabras, cães, gatos, camundongos, macacos e porcos) e é o principal modo de transmissão em bovinos, contribuindo significativamente para a persistência da infecção no rebanho (Figura 2) (COLE et al., 1995; DUBEY e LINDSAY, 1993; MOSKWA et al., 2007). A transmissão vertical pode ser separada em duas vias distintas, designadas

transmissão transplacentária “exógena” ou “endógena”. A transmissão transplacentária exógena ocorre quando o hospedeiro adquire a infecção durante a gestação, principalmente após a ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos, e parasitos posteriormente infectam o tecido fetal. A transmissão transplacentária endógena é devido ao recrudesimento, ou seja, reativação e reconversão de bradizoítos em taquizoítos durante a gestação e subsequente infecção fetal (MONNEY e HEMPHILL, 2014). Dessa forma, os fetos são abortados ou nascidos persistentemente infectados (MONNEY e HEMPHILL, 2014; McALLISTER, 2016).

#### **1.1.4 Manifestações clínicas da neosporose**

A maioria das infecções por *N. caninum* em bovinos é subclínica, mas o aborto é o principal problema, que geralmente é o único sinal clínico observado, podendo ser esporádico, endêmico ou epidêmico (DUBEY, 2003; DONAHOE et al., 2015; McALLISTER, 2016). O aborto em bovinos pode ocorrer entre o 4º mês de gestação até o final da gestação, sendo mais comum entre o 5º e 7º mês de gestação. O aborto ocorre quando o feto ou a placenta são danificados de modo que já não é viável prosseguir com a gestação, e vários fatores podem interagir para influenciar esses danos (DONAHOE et al., 2015; McALLISTER, 2016). Os danos induzidos na placenta pelo parasito podem pôr em risco a sobrevivência fetal diretamente ou induzir a liberação de prostaglandinas que por sua vez induzem o aborto. As lesões fetais podem ocorrer devido aos danos nos tecidos pela multiplicação do parasito no feto ou devido a insuficiência de oxigênio/nutrição (DUBEY et al., 2002; CANTÓN et al., 2014). Outras manifestações clínicas também podem ocorrer, como morte, reabsorção, mumificação, natimortos, recém-nascidos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados (DUBEY, 2003; DONAHOE et al., 2015).

Os casos mais graves da neosporose canina geralmente evoluem para uma doença neuromuscular em cães jovens, que apresentam um quadro mais comum de paresia inicial de membros posteriores que progride para a paralisia (DONAHOE et al., 2015). Em contraste, a encefalomielite causada pelo protozoário é mais susceptível em cães adultos e é caracterizada por uma variável de sinais neurológicos que são dependentes do local parasitado no Sistema Nervoso Central (SNC) (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002; DONAHOE et al., 2015). Embora principalmente reconhecida como uma doença neuromuscular em cães, a neosporose pode induzir outras disfunções menos comuns que incluem dificuldade na deglutição, paralisia da

mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia de nervos faciais, miocardite, pancreatite, pneumonia e até falência cardíaca dependendo das células parasitadas. Dessa forma, a neosporose canina clínica pode ser localizada ou generalizada, com o envolvimento de todos os órgãos, inclusive da pele causando a neosporose cutânea (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002; MANN et al., 2016). Uma característica marcante nestes casos é o intenso parasitismo, com um grande número de taquizoítos nas lesões cutâneas, sugerindo uma falta de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos (DUBEY, 2003).

### **1.1.5 Epidemiologia**

A neosporose tem emergido como uma doença grave em bovinos e cães em todo o mundo (DUBEY, 2003). A infecção em bovinos por *N. caninum* já foi relatada em diversos continentes, dentre eles: Europa, Oceania, Ásia, América do Norte e Sul (DUBEY, SCHARES e OTEGA-MORA, 2007; SPILOVSKÁ et al., 2009; YU et al., 2009; PANADERO et al., 2010, REICHEL et al., 2013). Na região do Triângulo Mineiro, a soroprevalência da neosporose em rebanhos bovinos com problemas reprodutivos foi estimada em 17% (MINEO et al., 2006). No entanto, a prevalência da neosporose bovina varia dependendo do país, região, e entre bovinos de corte e de leite. Estas diferenças estão predominantemente relacionadas aos diversos fatores de risco (número de gestações, presença e número de cães na fazenda, idade do gado, entre outros), proteção (número de oocistos ingeridos, etapa da gestação, resposta imunológica, entre outros), e o tipo de teste sorológico utilizado para determinar a exposição ou infecção (GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013).

Infecções subclínicas por *N. caninum* em cães também têm grande importância epidemiológica por serem os hospedeiros definitivos e poderem eliminar oocistos nas fezes, contribuindo para a contaminação ambiental. Globalmente, destaca-se que há uma maior soroprevalência em cães de área rural (20% a 97%) que de área urbana (7% a 26%), sugerindo que cães que vivem em ambientes rurais sofrem maior exposição ao parasito e ressaltando a importante associação epidemiológica entre bovinos e cães, já que eles podem ter contato com placentas e fetos abortados de bovinos (PATITUCCI et al., 2001; ANTONY e WILLIAMSON, 2003; FERNANDES et al., 2004; LASRI et al., 2004; KING et al., 2012).

As perdas médias estimadas devido aos abortos induzidos por *N. caninum* é de 1 bilhão de dólares, possivelmente chegue a 2-4 bilhões de dólares por ano em apenas 10



países (que representam as maiores indústrias de gado no mundo), o que significa aproximadamente dois terços dos prejuízos nas indústrias de laticínios e mais de um terço nas de carne (REICHEL et al., 2013). Estima-se que neosporose custa a indústria de laticínios nos Estados Unidos 546 milhões de dólares e na indústria de carne 111 milhões de dólares por ano (McALLISTER, 2016). E no Brasil, aproximadamente 51,3 milhões de dólares e 101,0 milhões dólares por ano na indústria de laticínios e carne, respectivamente (REICHEL et al., 2013).

O impacto econômico de tal magnitude sugere que uma vacina seria a melhor alternativa custo-efetiva para controlar a infecção. Pois, ao contrário de tratamentos com fármacos, vacinas não deixam resíduos de longa duração em carne ou leite. A primeira vacina comercial, chamada NeoGuard<sup>TM</sup>, foi retirada do mercado por ter uma baixa eficácia em ensaios de campo. Atualmente, não existe nenhuma vacina comercialmente disponível para a neosporose (GOODSWEN et al., 2015).

## **1.2 Interação parasito-hospedeiro**

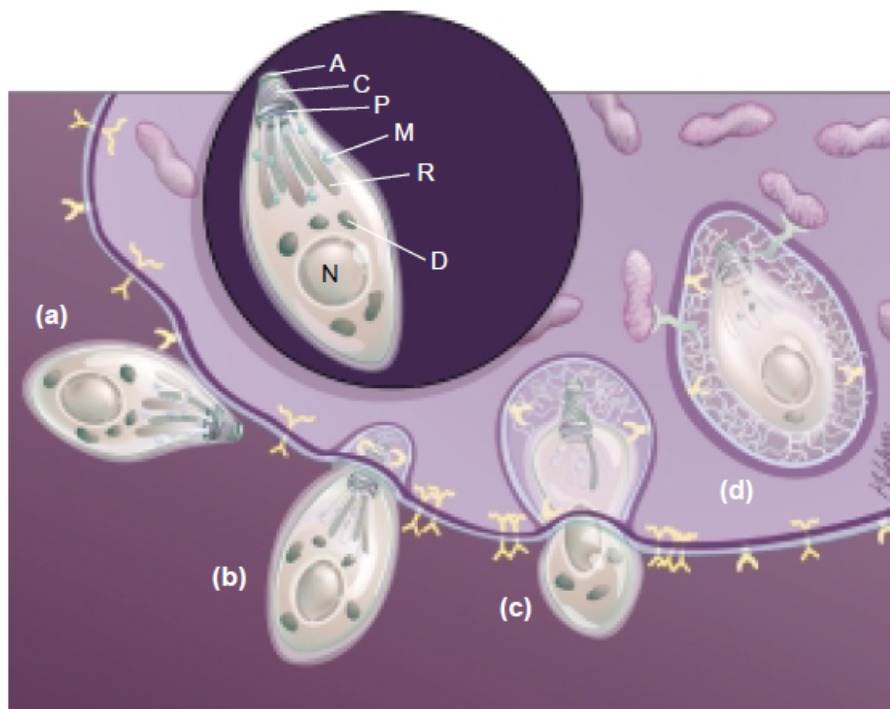
### **1.2.1 Ciclo lítico**

A invasão e lise celular são os principais eventos na patogênese da infecção por *N. caninum*, os quais envolvem processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa, por apresentarem uma maquinaria dedicada em seus complexos apicais, os quais são compostos por micronemas, roptrias e grânulos densos, utilizados pelos parasitos durante a adesão e invasão de células hospedeiras (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002; LI et al., 2015). A invasão celular, dessa forma, é um mecanismo dinâmico com a participação ativa do parasito, e pode ser resumida em três etapas (Figura 3):

A primeira etapa é caracterizada pela adesão inicial do parasito à célula hospedeira com orientação aleatória do parasito, envolvendo antígenos de superfície imunodominantes (SAG). Após a adesão inicial, os parasitos posicionam a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (MIC) são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão de modo irreversível. Em sequência, inicia-se o movimento de invasão celular, que o força para dentro do VP (LI et al., 2015). A membrana plasmática da célula hospedeira é usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos (BUXTON,

McALLISTER e DUBEY, 2002; KELLER et al., 2002). A segunda etapa é caracterizada pela secreção de proteínas de roptrias (ROP), que são liberadas dentro do VP e estendem a MVP para induzir a associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático posicionam-se de forma adjacente ao VP (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002). Na última etapa, proteínas de grânulos densos (GRA) modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo, com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento e sobrevivência do parasito (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002).

Os taquizoítos dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novas gerações de parasitos em poucas horas após a infecção e, subsequentemente, há lise da célula hospedeira e liberação dos taquizoítos que ficam livres para infectar uma variedade de tecidos e tipos celulares (HEMPHILL, VONLAUFEN e NAGULESWARAN, 2006).



**Figura 3** - Processo de invasão celular de uma taquizoíta de *Neospora caninum*. (a) adesão; (b) invasão; (c) penetração; (d) estabelecimento do vacúolo parasitóforo; (A) anel apical; (C) conoide; (D) grânulo denso; (M) micronema; (núcleo); (P) anel polar; (R) roptria.

**Fonte:** Buxton (2002).

### 1.2.2 Mecanismos da resposta imune protetora induzida por *N. caninum*

A resposta imune do hospedeiro induzida pela infecção por *N. caninum* tem sido estudada utilizando principalmente modelos experimentais, sendo os murinos as espécies de predileção (HEMPHILL, AGUADO-MARTÍNEZ E MÜLLER, 2015). A imunidade é similar a outros parasitos intracelulares, cujo a imunidade mediada por células desempenha um papel crucial no hospedeiro, por meio da redução da replicação de *N. caninum* (INNES et al., 2002). Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos deficientes para a interleucina 12 (IL-12) ou interferon gama (IFN- $\gamma$ ) são incapazes de resistir à infecção com *N. caninum* (INNES et al., 2002). Dessa forma, em concordância com o observado para outros patógenos intracelulares, os dados indicam que a imunidade protetora do hospedeiro induzida pela infecção por *N. caninum* é tipicamente mediada por um padrão de resposta imune do tipo Th1, que envolve a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com a produção de óxido nítrico (NO) (DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015).

Durante a fase aguda da infecção, macrófagos e células dendríticas (DCs) produzem e secretam altos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  em resposta a antígenos produzidos por taquizoítos. A citocina IL-12 estimula as células NK a produzirem e secretarem altos níveis de IFN- $\gamma$ , bem como induz a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> na subpopulação Th1 produtora de IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são citocinas críticas para a sobrevivência do hospedeiro (ALIBERTI, 2005; DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015). Esta resposta pró-inflamatória, apesar de ser essencial para restringir a replicação do parasito e consequente colonização tecidual, pode atuar de forma deletéria, afetando a integridade fisiológica da placenta e, por consequência, induzindo o aborto ou má-formação fetal (MINEO et al., 2009; MUNOZ, LIESENFELD e HEIMESAAT, 2011; MONNEY e HEMPILL, 2014; HECKER et al., 2015). A imunomodulação do hospedeiro que ocorre durante a gestação, favorece o perfil de resposta mediada por células Th2/ T regulatórias, que viabilizam a manutenção da gestação, mas que pode resultar numa falha para controlar a infecção por *N. caninum*. A concomitância entre a gestação, caracterizada imunologicamente pelo aumento da produção das citocinas IL-4 e IL-10, associada a infecções agudas ou crônicas por *N. caninum*, leva a uma replicação descontrolada do parasito, seguidos de efeitos deletérios para o feto (MONNEY e HEMPILL, 2014; DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015). Assim, uma resposta imune de perfil misto parece ser crucial no controle da

infecção e na manutenção da gestação (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2016), tornando o balanço da resposta imune específica contra *N. caninum* durante a gestação um grande desafio.

Células T CD8<sup>+</sup> também são diferenciadas durante a infecção e contribuem significativamente para controlar a replicação parasitária, por meio de lise de células infectadas e ativação de macrófagos dependente de IFN- $\gamma$ . As células lisadas por células T CD8<sup>+</sup> liberam taquizoítos para o meio extracelular, os tornando acessíveis a outros mecanismos imunológicos (ABE et al., 2014; HEMPHILL et al., 2006; DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015).

### **1.2.3 Resposta imune inata a *Neospora caninum***

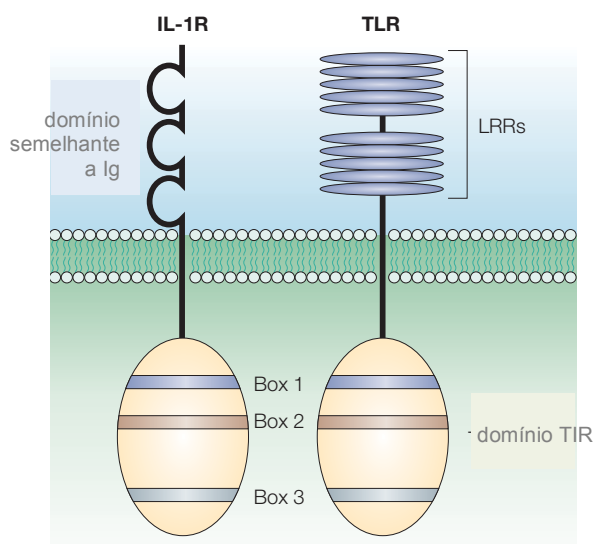
A imunidade inata desempenha um papel importante na proteção e na patogênese da infecção por protozoários. Pois, além de ter um papel na primeira linha de ação contra agentes patogênicos, é um pré-requisito para indução da imunidade adaptativa, particularmente para a indução de uma resposta de perfil Th1 (AKIRA & TAKEDA, 2004). As células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como, as células dendríticas (DCs) e os macrófagos (MØs) possuem um papel chave em diversos processos biológicos, tais como a apresentação e processamento de antígeno, produção de citocina, expressão de moléculas co-estimulatórias, indução de morte microbiana, eliminação de células apoptóticas, dentre outros (MARIM et al., 2010; DION, et al., 2011; ABE et al., 2015). Dessa forma, estas células possuem um papel chave na indução da ativação de células NK e células TCD4<sup>+</sup> (DION, et al., 2011; ABE et al., 2015).

O reconhecimento imune intato é realizado por famílias de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Estes PRRs comumente reconhecem estruturas conservadas, chamadas padrões moleculares associados a patógeno (PAMP) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMP) de estruturas microbianas, derivadas do próprio organismo, ou de fatores ambientais, induzindo uma resposta imune inata (AKIRA e TAKEDA, 2004; PATRA E CHOI, 2016; KIM, SHIN e NAHM, 2016). Ao detectar um PAMP ou DAMP, os PRRs desencadeiam uma cascata de sinalização que ativa as respostas antimicrobianas inatas. Estes sinais induzem também a ativação de células B e T, unindo assim a resposta imune inata e adaptativa (PATRA e CHOI, 2016). Diversos PRRs foram identificados desde a descoberta dos receptores toll-like (TLRs). Com base nas diferenças genéticas e funcionais, PRRs são classificados

atualmente em cinco famílias: os TLRs (*Toll-Like Receptors*), os NLRs (*NOD-Like Receptors*), RLRs (*RIG-I-Like Receptors*), os CRLs (*C-type lectin receptors*), e os ALRs (*AIM-like receptors*) (KIM et al., 2016).

Uma das principais famílias de PRRs são os TLRs. Os TLRs são proteínas transmembrana localizados na superfície da célula (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou no interior dos endossomos (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13), em grande parte expressos em APCs (DE NARDO, 2015). Atualmente, foram identificados, 10 e 13 membros TLR em humanos e camundongos, respectivamente. Os TLRs são membros de uma superfamília que inclui os receptores de interleucina - 1 (IL-1R), o qual possuem uma cauda citoplasmática com aproximadamente 200 aminoácidos conservados, denominado como domínio TIR. No entanto, a região extracelular se difere, pois nessa região os TLRs contêm *motifs* com repetições ricas em leucina (LRR), enquanto que a região extracelular dos IL-1R contém três domínios semelhantes a imunoglobulina (Figura 4) (AKIRA & TAKEDA, 2004). Os TLRs são capazes de reconhecer moléculas derivadas de várias classes de patógenos, incluindo membros do filo Apicomplexa, e consequentemente desencadear uma cascata de sinalização culminando na produção de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, peptídeos antimicrobianos e moléculas co-estimulatórias (DENKERS e BUTCHER, 2005; TAYLOR et al., 2005; MINEO et al., 2010; MURRAY e WYNN, 2011).

A transdução de sinal via TLRs ocorre através de proteínas adaptadoras contendo domínio amino terminal TIR, tais como MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*TIR-containing adaptor protein, também conhecida como MAL [MyD88-adaptor-like]*), TRIF (*TIR-containing adaptor- inducing IFN [interferon]- $\beta$* ) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) que resulta no recrutamento de proteínas da família IRAK e TRAF, gerando a ativação de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e fatores de transcrição, tais como NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B) e IRFs (fatores reguladores de Interferon), os quais redundam na produção de citocinas inflamatórias (KAWAI e AKIRA, 2007; KAWAI e AKIRA, 2011). A via de sinalização que parece ser dividida por todos os membros da família Toll e IL-1R inclui alguns componentes essenciais, como a proteína adaptadora MyD88, proteína quinase IRAK e outra proteína adaptadora TRAF6 (MEDZHITOV, 2001).

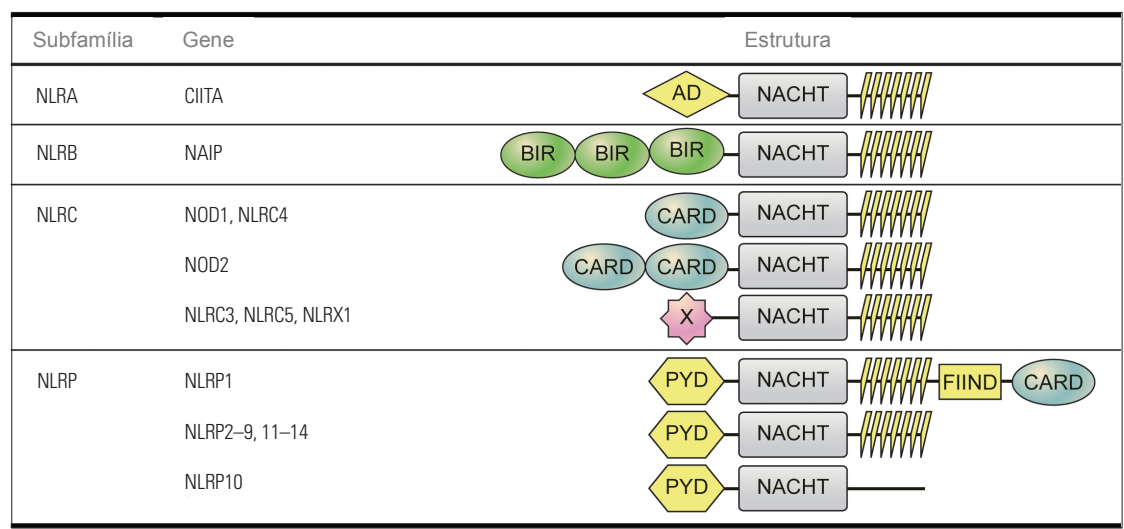


**Figura 4 -** Representação esquemática da estrutura dos receptores TLR e IL-1R  
**Fonte:** Adaptado de Akira and Takeda (2004).

O primeiro estudo avaliando TLRs e as vias dependentes de MyD88 na infecção por *N. caninum* foi realizado por Mineo et al. (2009). Os autores demonstraram que camundongos geneticamente deficientes em MyD88 e infectados por *N. caninum* apresentaram uma redução significativa na síntese de IL-12 e IFN- $\gamma$ , o que resulta em aumento da mortalidade (MINEO et al., 2009). Posteriormente, Mineo et al. (2010) demonstraram que TLR2, de modo dependente de MyD88, é crucial para a ativação de DCs, indução de uma resposta adequada de células Th1 e produção de anticorpos durante a infecção por *N. caninum*, que estão diretamente associados com a redução da carga parasitária durante as fases aguda e crônica da infecção (MINEO et al., 2010). Vias de ativação de TLR independentes de MyD88, como a via TLR3 dependente de TRIF, são também importantes para ativação da resposta imune contra *N. caninum*, pois são potentes indutores de interferon tipo I (BEITING et al., 2014). Outro receptor que regula a resposta imune inata do hospedeiro após infecção por *N. caninum* é o receptor de quimiocina cisteína-cisteína 5 (CCR5). A literatura vigente demonstra que a migração e a ativação de células imunes através do receptor CCR5 ocorre durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*, através da interação entre ciclofilina e CCR5 (MINEO et al., 2010; ABE et al., 2015).

Os NLRs também têm emergido como importantes componentes do sistema imune inato para reconhecimento e eliminação de parasitos intracelulares. Os NLRs são receptores citoplasmáticos que se ligam a componentes dos patógenos, das células hospedeiras e fontes ambientais (KIM, SHIN e NAHM, 2016). Esses receptores são

expressos em células imunes, como linfócitos e APCs, e podem também ser expressos em células não imunes, tais como células epiteliais e mesoteliais (CHEN et al., 2009). As proteínas NLR apresentam uma estrutura composta por três domínios: um domínio NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*, NACHT: NAIP, CIITA, HET-E, e TP-2), responsável pela atividade dNTPase e oligomerização do receptor; um domínio amino-terminal distinto, o qual desencadeia a função efetora do receptor por interação com outras proteínas; e um domínio carboxi-terminal LRR que, assim como nos TLRs, estão envolvidos na ligação e no reconhecimento da molécula antigênica (KIM et al., 2016). Há quatro domínios amino terminais conhecidos, que são usados para classificar os NLRs em quatro sub-famílias e dentro dessas sub-famílias existem um ou mais membros: NLRA (CIITA); NLRB (NAIP); NLRC (NOD1, NLRC4, NOD2, NLRC3, NLRC5, NLRX1); e NLRP (NLRP1-10) (Figura 5). Quando ativados os NLRs podem desempenhar várias funções, como reguladores das vias de sinalização ou inflamação; formação do complexo inflamassoma; e ativação de fatores de transcrição (KIM et al., 2016; GURUNG e KANNEGANTI, 2016).



**Figura 5** - Representação esquemática da classificação e da estrutura dos receptores NLRs.  
**Fonte:** Adaptado de Kim et al. (2016).

Os primeiros receptores NLRs reportados como receptores intracelulares microbianos foram NOD1 e NOD2 (GIRARDIN et al., 2003a; GIRARDIN et al., 2003b), sendo seus ligantes componentes de peptideoglicanos presentes em bactérias, denominados D- $\gamma$ -glutamil-meso-DAP (mDAP), e muramil-dipeptídeo (MDP), respectivamente (OGURA et al, 2000; MCDONALD, INOHARA e NUNEZ, 2005). A

ativação de NOD1 e NOD2 ativam NF- $\kappa$ B e MAPKs, através da oligomerização e recrutamento da proteína RIP2 (*receptor-interacting protein 2*), que resulta na ativação do complexo quinase I $\kappa$ B, e síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (HAYDEN e GHOSH, 2004). Estudos também tem demonstrado o papel desses receptores no controle de infecções por parasitos intracelulares, como *T. gondii* e *N. caninum*. Os resultados sugerem que NOD2 é parte integrante das vias alternativas que cooperam com os TLRs para a indução de mecanismos de controle da infecção por estes protozoários, contudo gerando uma inflamação exacerbada que pode redundar em um quadro de imunopatologia (DUTRA et al., 2013; DAVOLI- FERREIRA et al., 2016).

Alguns NLRs, diferentemente de NOD1 e NOD2, estão envolvidos tanto no reconhecimento de moléculas microbianas, quanto no reconhecimento de fatores endógenos liberados por células e tecidos lesados (BROZ e DIXIT, 2016). Este reconhecimento faz com que as proteínas NLRs possam induzir a ativação do inflamassoma, um complexo multimérico de proteínas que é composto por caspases inflamatórias como, por exemplo, caspase-1 (LIMA-JUNIOR et al., 2013; KIM et al., 2016). A ativação de caspase-1 resulta no processamento e maturação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-18, bem como morte celular inflamatória denominado piroptose (KIM et al., 2016). O inflamassoma pode ser ativado por oito membros dos NLRs (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4 e NAIP) e AIM2 (*absent in melanoma 2-like receptor*, membro da família das proteínas HIN200). O reconhecimento dos ligantes resulta na oligomerização e recrutamento da proteína adaptadora, conhecida como ASC, que consiste em dois domínios: um PYD (*pyrin domain*) e um CARD (*caspase recruitment domain*), que permitem que ative caspases inflamatórias, especialmente caspase-1, que quando ativada conduz à clivagem de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em citocinas biologicamente ativas (BROZ e DIXIT, 2016; RATHINAM e FITZGERALD, 2016). No entanto, têm sido descritos inflamassomas que ativam a caspase-1 de maneira independente de ASC, como o inflamassoma de NLRC4 e NLRP1 (MARIATHASAN e MONACK, 2007; OGURA, SUTTERWALA e FLAVELL, 2006; HSU et al., 2008).

NLRs, tais como NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2 constituem os os inflamassomas canônicos mais bem caracterizados. Entre estes, NLRP3 é o mais intensamente investigado, sendo ativado por diversos ligantes derivados do hospedeiro e do patógeno. NLRC4 é ativado por componentes bacterianos de secreção (T3SS) e flagelina; A toxina antraz agoniza NLRP1b e AIM2 é ativado por dsDNA bacteriano ou



viral presente no citosol. Estudos recentes mostram o papel dos inflamassomas de NLRP6 e NLRP12 em processos infecciosos, porém os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos (VANAJA, RATHINAM e FITZGERALD, 2015). Adicionalmente, foi reportado uma nova forma de ativação não-canônica do inflamassoma envolvendo uma protease similar a caspase-1, denominada caspase-11 em células de camundongos, e caspase-4 e caspase-5 em células humanas, que iniciam sua ativação em resposta ao estímulo por lipopolissacarídeo (LPS) no citosol da célula hospedeira. Após a ativação, as caspases iniciam o processo de piroptose semelhante ao da caspase-1, mas não clivam as citocinas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. A secreção destas citocinas é, no entanto, observada durante a ativação destas caspases que desencadeiam a montagem de NLRP3 (BROZ e DIXIT, 2016).

O inflamassoma foi reconhecido por seu papel fundamental na defesa do hospedeiro contra patógenos, mas sua ativação desregulada está relacionada com o desenvolvimento de câncer, doenças auto-imunes, doenças metabólicas e neurodegenerativas. Dessa forma, a ativação do inflamassoma e o seu controle é crucial para resposta imune anti-microbiana e inflamatórias, evitando danos no tecido (BROZ e DIXIT, 2016). A ativação do inflamassoma tem sido amplamente reportada em resposta a bactérias patogênicas e recentemente tem se destacado por desempenhar um papel importante na resposta imune do hospedeiro frente às infecções por protozoários intracelulares (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015; STEWART e COOKSON, 2016).

A ativação de caspase-1 em macrófagos por diferentes espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii* foi demonstrado ser dependente de NLRP3 e ASC, que culmina na secreção de IL-1 $\beta$  ativa, que é responsável por regular a produção de NO mediado por IL-1R e MyD88, sendo esta via importante na restrição da replicação do parasito (SILVA et al., 2013; LIMA-JUNIOR et al., 2013; GORFU et al., 2014). Para o parasito apicomplexa *Plasmodium*, também há indução da produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$  ativa, num processo dependente de ASC, NLRP3, e caspase-1 (SHIO et al., 2009; DOSTERT et al., 2009). Porém, o papel deste processo na proteção frente a malária experimental é controverso. Camundongos deficientes em NLRP3 e IL-1 $\beta$  sobrevivem por mais tempo a infecção por *P. chabaudi*, uma vez que a ativação de NLRP3 contribui para o desenvolvimento da malária cerebral (GRIFFITH et al., 2009). Em contrapartida, outros estudos não corroboram com o papel de NLRP3 no desenvolvimento dos quadros clínicos decorrentes da infecção. Estes estudos indicam que *P. berghei* é capaz de desencadear a ativação de NLRP3, mas a sinalização

pelo inflamassoma e IL - 1R não desempenham algum papel na imunopatologia da malária cerebral em modelo murino (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015).

### **1.3 Fatores de virulência de *Toxoplasma gondii* e o seu papel na resposta imune do hospedeiro**

*N. caninum* divide muitas características morfológicas e biológicas com *T. gondii*. Contudo, algumas diferenças cruciais contribuem para distinguir os dois parasitos, seja em relação à sua gama de hospedeiros naturais, antigenicidade, fatores de virulência e patogênese. As diferenças entre ambos parasitos também têm sido abordadas por meio de análises comparativas de genomas e transcriptomas (REID et al., 2012; DONAHOE et al., 2015; KRISHNA et al., 2015).

As roptrias e grânulos densos têm sido descritos por possuírem uma variedade de proteínas efetoras em *T. gondii* que são secretadas e excretadas na célula hospedeira durante o processo de invasão e replicação, induzindo um impacto direto sobre as vias de sinalização do sistema imune do hospedeiro (DLUGONSKA, 2008). As ROPs, secretadas no citosol para sequestrar funções da célula hospedeira, incluem enzimas como quinases e fosfatases. Dentre estas, ROP5, ROP18 e ROP17 são pseudoquinases /quinases que desativam mecanismos efetores da imunidade inata como os genes relacionados a imunidade relacionada-GTPases (IRGs), que agem na MVP para romper o que o parasito estabeleceu como um nicho hospitaleiro (STEINFELDT et al., 2010; LEI et al., 2014; ZHAO e YAP, 2014). No entanto, a fosforilação das IRGs por ROP5/18/7 inativa-as, libertando-as a partir da membrana vacuolar e permitindo que o parasito evada a resposta do hospedeiro (NIEDELMAN et al., 2012; ZHAO e YAP, 2014; SHWAB et al., 2016). ROP16 é outra proteína quinase secretada no citoplasma da célula hospedeira por taquizoítos de cepas de *T. gondii* do tipo I e III, e que transita para o núcleo da célula. ROP16 induz a ativação de STATs (STAT-3 e STAT-6) e o consequente bloqueio da produção de IL-12 (BUTCHER et al., 2011; YUAN et al., 2011; JENSEN et al., 2013; HAKIMI e BOUGDOUR, 2015). ROP9 também emerge como uma possível proteína efetora durante o processo infeccioso, por representar um determinante de virulência de atuação ainda não esclarecida. Sabe-se até o momento que a proteína contém epítopos de células B e induz uma resposta imune mediada por células TCD4<sup>+</sup> (REICHMANN et al., 2002; CHEN et al., 2014), contudo seus potenciais efeitos em células da imunidade inata ainda não foram descritos.

Após a invasão e a liberação das roptrias, inicia-se a secreção dos grânulos densos no espaço vacuolar. Inicialmente, julgou-se que as funções das GRAs fossem restritas a biogênese do vacúolo e maturação ou aquisição de nutrientes. A primeira evidência que contradizia esta afirmação foi a demonstração da atividade extra-vacuolar de GRA15 expresso por cepas de *T. gondii* do tipo II, demonstrando a ativação direta da proteína na subunidade p65 de NF- $\kappa$ B, elevando a produção de IL-12 (ROSOWSKI et al., 2011; HAKIMI e BOUGDOUR, 2015), ou a ativação do inflamassoma via ASC em monócitos humanos (GOV et al., 2013). Gradativamente, outras proteínas de grânulos densos foram ganhando destaque, como GRA6 que se mostrou como um ativador direto do fator de transcrição NFAT4 (*nuclear factor of activated T cells 4*) contribuindo para a indução de CXCL2 e consequente recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local da infecção, promovendo a disseminação do parasito (HAKIMI e BOUGDOUR, 2015). GRA16 que atravessa a MVP e acumula-se no núcleo da célula hospedeira, modulando positivamente os genes envolvidos no metabolismo, ciclo celular, biossíntese de esteróides e aumentando os níveis de p53. Adicionalmente, linhagens deficientes em GRA16 apresentam diminuição da virulência, indicando a importância destas alterações no desenvolvimento da patogênese (BOUGDOUR et al., 2013; HAKIMI e BOUGDOUR, 2015). GRA24 é outra proteína exportada que acumula no núcleo da célula hospedeira, se ligando a MAPK p38 $\alpha$  induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 (BRAUN et al., 2013; BOUGDOUR, TARDIEUX e HAKIMI, 2014). GRA22 também está envolvido nos mecanismos de evasão do parasito no VP (OKADA et al., 2013), GRA7 potencializa os efeitos de ROP18 e ROP5 sobre as IRGs por um mecanismo distinto, porém sinérgico (ALAGANAN et al., 2014), e GRA17 atua sinergicamente com GRA23 na permeabilidade e o acesso de pequenas moléculas e nutrientes através da MVP (GOLD et al., 2015).

#### **1.4 Desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética aplicados na identificação e caracterização de possíveis fatores de virulência**

Parasitos geneticamente modificados tem sido desenvolvidos para melhor entender o papel de proteínas alvo na diversidade das respostas imune do hospedeiro. E assim, proporcionar uma nova visão sobre como o parasito modula a resposta imune do hospedeiro e otimiza seu nicho intracelular (DUBREMETZ, 2007). A utilização da técnica de recombinação homóloga é um método poderoso capaz de fornecer

informações conclusivas para avaliar a função do gene (CAPECCHI, 2005, GAJ et al., 2013; ANDENMATTEN et al., 2013). No entanto, a utilização desta técnica tem sido dificultada por vários fatores, incluindo a baixa eficiência da engenharia de construções, a necessidade de uma seleção demorada e trabalhosa. Enquanto, uma nova abordagem tem surgido, que permite manipular qualquer gene de uma variada gama de tipos de células e organismos, que se baseia na edição do genoma utilizando uma endonuclease. O sistema CRISPR-Cas surgiu recentemente como uma alternativa fácil e eficiente para induzir alteração no gene alvo (GAJ et al., 2013; SIDIK et al., 2014; SHEN et al., 2014).

O sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) é uma característica do sistema imune dos genomas da maioria das bactérias e Archaea e estão envolvidos na resistência a bacteriófagos e plasmídeos (BARRANGOU et al., 2007). Recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 foi adaptado para edição do genoma em uma variedade de organismos. A nuclease Cas9 (CRISPR associated protein 9) promove a clivagem da sequência de interesse tornando esta disponível para atuação da maquinaria de reparo da célula e assim, promover edição da porção de interesse presente no genoma alvo. O sistema CRISPR/Cas9 tem se consolidado por ser uma técnica rápida, com relativa facilidade de manipulação, baixo custo, e principalmente com alta taxa de sucesso devido a sua alta sensibilidade para o reconhecimento de sequências específicas presentes no DNA alvo de células, parasitos ou até mesmo em modelos animais (GAJ et al., 2013; SIDIK et al., 2014; SHEN et al., 2014; ZHU et al., 2014; SUNG et al., 2014; BEVERLEY, 2015; WANG et al., 2015; de KONING-WARD, 2015). Portanto, parasitos geneticamente modificados têm sido desenvolvidos utilizando a ferramenta molecular CRISPR/Cas9 para melhor entender o papel de proteínas alvo na diversidade da resposta imune do hospedeiro, visto que mais estudos são necessários para determinar o papel exato das proteínas secretadas e a sua função na interação parasito-hospedeiro.

*Justificativa*

## 2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de ferramentas moleculares tem sido aplicado como estratégia para melhor compreender esse sistema de invasão/replicação do parasito e a interação parasito-hospedeiro. Dessa maneira, parasitos geneticamente modificados têm sido desenvolvidos para se explorar o papel de proteínas alvo na diversidade das respostas imune do hospedeiro. E assim, proporcionar uma nova visão sobre como o protozoário em estudo sequestra a célula hospedeira e otimiza seu nicho intracelular. Visto que, poucos estudos têm abordado a manipulação gênica em *N. caninum*, o presente estudo propôs desenvolver ferramentas biotecnológicas para utilização de *N. caninum* como um sistema heterólogo, e assim proporcionar com maior facilidade a manipulação molecular e a disponibilidade de ferramentas genéticas avançadas que permitem servir como um organismo modelo para estudo de outros parasitos Apicomplexa. Por conseguinte, a manipulação do genoma do patógeno é o caminho mais direto para se entender as funções de genes específicos no desenvolvimento do parasito e da sua patogênese. Portanto, foi também utilizado e aprimorado a técnica CRISPR-Cas9 para depleção gênica em *Neospora* para um estudo aprofundado da interação *N. caninum*-hospedeiro. Mediante a disponibilidade destes insumos, seremos capazes de avançar no conhecimento comparativo sobre os mecanismos de virulência e indução de latência deste parasito, bem como compará-lo com outros parasitos do filo apicomplexa, por exemplo com *T. gondii*, aprimorando o conhecimento na biologia do parasito e a relação parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, contribuir para o avanço de protocolos profiláticos e terapêuticos direcionados as doenças decorrentes destas infecções.

Além disso, o desenvolvimento de métodos novos e acessíveis para sequenciamento do genoma e transcriptoma tem resultado numa riqueza de informações apresentando um novo desafio de converter esta enorme quantidade de dados em conhecimento funcional e clinicamente relevante. Central para este problema é a necessidade de métodos eficazes e confiáveis que permitem determinar como genótipo influencia no fenótipo. Portanto, a modificação gênica é uma ferramenta importante para complementar as informações obtidas por genomas e transcriptomas.

*Objetivos*

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Utilizar a tecnologia de edição genômica para produzir taquizoítos de *Neospora caninum* geneticamente modificados por deleção ou inserção de genes de interesse, com a intenção de se mapear o mecanismo de ativação do inflamassoma.

#### **3.2 Objetivos específicos**

**A.** Modificar geneticamente *N. caninum* por depleção da roptria Rop9 através da técnica CRISPR-Cas9 padronizada para edição genômica em *Neospora*;

**B.** Desenvolver plasmídeos direcionados a promotores gênicos específicos de *N. caninum* com marcadores fluorescentes e tags de expressão em genes de interesse, facilitando a identificação e a caracterização das interações com os alvos antigênicos observados;

**C.** Construir taquizoítos de *N. caninum* geneticamente modificados, expressando proteínas de *T. gondii*, com a intenção de se obter uma plataforma de observação para fatores diferenciais de virulência;

**D.** Avaliar o fenótipo induzido pelas diferentes linhagens transgênicas de *N. caninum* na célula hospedeira;

**E.** Avaliar se a infecção por *N. caninum* é capaz de induzir a ativação do inflamassoma em macrófagos;

**F.** Determinar a via responsável pela ativação do inflamassoma em resposta à infecção por *N. caninum*;

**G.** Verificar a capacidade de diferentes cepas de *T. gondii* e *N. caninum* em ativar o inflamassoma;

**H.** Avaliar a função do fator de virulência Rop16 de *T. gondii* da cepa tipo I na ativação do inflamassoma.





# *Material e Métodos*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de células

Célula HeLa (CCL-2, ATCC) e fibroblastos CCD-1079Sk (CRL-2097, ATCC) ou HFF (SCRC-1041, ATCC) foram obtidos do Laboratório de Imunoparasitologia Mário Endsfieldz Camargo, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e do Laboratório Peter Bradley, da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA) e cultivados em garrafas de cultura de tecidos de 25 cm<sup>2</sup> até atingirem a confluência. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/mL penicilina (Gibco), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), 2 mM L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), 3 mM bicarbonato de sódio (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem a confluência.

### 4.2 Cultura de parasitos

Linhagens parentais e geneticamente modificadas de *T. gondii* e *N. caninum* foram mantidas por passagens seriadas em monocamadas confluentes de HeLa como descrito anteriormente (RIBEIRO et al., 2009) e utilizados para experimentos *in vivo* e *in vitro*. Resumidamente, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* ou *T. gondii* e mantidos por passagens seriadas em meio RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2% de SFB, a 37°C em atmosfera e 5% de CO<sub>2</sub>, a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado (1000 x g, 10 minutos, 4°C). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspensionado em RPMI e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

### 4.3 Extração do DNA genômico de *N. caninum* e *T. gondii*

A extração de DNA foi realizada a partir de 10<sup>7</sup> taquizoítos de *N. caninum* ou *T. gondii* utilizando o kit de purificação de DNA genômico (Wizard<sup>®</sup>, Promega Co., Madison, EUA), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de

DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e o material extraído foi armazenado a -20 °C.

#### **4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)**

Para as reações em cadeia de polimerase, diferentes enzimas foram utilizadas (Taq e PFU polimerase), mantendo-se as concentrações dos reagentes: 10x tampão para Taq/PFU polimerase; 200 µM de dNTP Mix; 2 pmol de cada primer; 2,5 U da enzima Taq/PFU polimerase. As reações foram realizadas em termociclador (MasterCycler, Eppendorf), iniciando-se com pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento com temperatura adequada aos primers (ver Anexo I) por 30 segundos; e extensão a 72°C com tempo adequado ao tamanho do fragmento de DNA. Uma extensão final foi adicionada após a finalização dos 30 ciclos, a 72°C por 10 minutos.

#### **4.5 Eletroforese em gel de agarose**

Géis de agarose (1%) foram preparados em tampão TAE (0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA em pH 8,3) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As eletroforeses foram realizadas em tampão TAE, usando voltagem constante de 100 V e amperagem livre. As amostras foram diluídas seis vezes em tampão de corrida Orange DNA Loading Dye (Fermentas) e foram utilizados o marcador molecular (5 µL/poço) GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific). As fotografias dos géis de agarose foram obtidas no aparelho *ChemiDoc MP Systems* (BioRad).

#### **4.6 Purificação do fragmento de DNA em gel de agarose**

A purificação de DNA no gel de agarose foi realizado utilizando o kit de extração de gel (Thermo Fisher Scientific), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. O procedimento consistiu em excisar o fragmento de um gel de agarose pesando e adicionando o volume em µL equivalente a massa em mg do tampão de captura, incubado por 10 minutos a 50°C e homogeneizado em vortex a cada 2 minutos até o gel não ser mais visível na mistura. O gel solubilizado foi pipetado sobre uma coluna spin acondicionada em tubo de 1,5 mL e centrifugado (10000 x g, 1 minuto), o volume eluído foi descartado e adicionado 700µL de tampão de lavagem na coluna. A amostra foi centrifugada (10000 x g, 1 minuto, 4°C), descartando o filtrado e mantendo a coluna sobre o mesmo tubo, centrifugado novamente para retirada do tampão residual.

A coluna foi colocada sobre um novo tubo de 1,5 ml e adicionado 30 µL de tampão de eluição, centrifugado a 10000 x g por 1 minuto, obtendo-se o material genético e armazenado a -20 °C.

#### **4.7 Ligação do fragmento de DNA (inserto) ao plasmídeo**

Fragmentos de DNA, obtidos de produtos de PCR purificados foram ligados a plasmídeos de clonagem (pJET1.2/blunt), plasmídeos de expressão (pNeoGra7-HA-HPT e pNeoRop13-HA) ou plasmídeo para deleção (pU6-Universal). Para ligação ao plasmídeo pJET1.2/blunt, foi utilizado o kit *CloneJET PCR Cloning* (Thermo Fisher Scientific), seguindo orientações do fabricante. A reação de ligação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora, e depois utilizada para a transformação de células eletrocompetentes TOP10.

A reação para ligação de fragmentos aos plasmídeos de expressão ou deleção foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (BioLabs) em tampão para T4 DNA Ligase. A reação foi incubada a 16 °C por 24 horas e realizado a transformação em células de *E. coli* eletrocompetentes TOP10.

#### **4.8 Preparo das células competentes**

Cepas de *Escherichia coli* TOP10 foram plaqueadas em agar Luria- Bertani (LB: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% agar em pH 7,0) a 37 °C por 18 horas. Uma colônia desta placa foi repicada em 50 mL de meio LB e incubada a 37 °C por 18 horas, sob agitação a 250 rpm. Após incubação, foi adicionado mais 500 mL de meio LB e incubado a 37 °C, sob agitação, até a densidade óptica em 600 nm (OD600) atingir entre 0,3 e 0,4. O conteúdo foi centrifugado (3000 x g, 4 °C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O pellet foi gentilmente ressuspensionado em 20 mL do tampão 1 (RbCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM, KOAc 30mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Glicerol 15% em pH 5,8) e incubado por 15 minutos em gelo. Após centrifugação (3000 x g, 4 °C, 10 minutos), o pellet foi resuspensionado em 6 mL do tampão 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glicerol em pH 6,5) e incubado por 30 minutos no gelo. Aliquotas de 50 µL foram realizadas usando nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

#### **4.9 Transformação de células competentes e seleção das colônias**

Para a multiplicação e seleção de plasmídeos, cepas de *E. coli* competentes TOP10 foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo previamente ligado

ao fragmento de interesse. A solução contendo o plasmídeo ligado ao fragmento de interesse (5 µl) foi adicionado em 50 µl de bactérias competentes e mantidas em gelo por 10 minutos, posteriormente foi mantido a 42°C por 45 segundos. Em seguida foi acrescentado 150 µL do meio de cultura SOC (Invitrogen) e incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação. Após a incubação todo o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB com ampicilina (100µg/mL, Sigma), e incubado a 37 °C por 18 horas. Colônias isoladas foram selecionadas 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 suspensões por minipreps.

#### **4.10 Purificação dos plasmídeos (Miniprep)**

Os plasmídeos foram purificados pelo Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, a suspensão de bactérias transformadas foi transferida para um tubo e centrifugada a 10000 x g por 10 minutos. Após centrifugação, foi adicionado ao pellet 250 µl do tampão de ressuspensão e 250 µl do tampão de lise, e homogeneizado gentilmente por inversão, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, neutralizado com 350 µl de tampão de neutralização e gentilmente homogeneizada até a formação do precipitado. O sobrenadante foi obtido por centrifugação a 10000 x g por 10 minutos, transferido para uma coluna de separação devidamente acondicionada em um tubo coletor, centrifugado por 2 minutos a 10000 x g e descartado o líquido. As colunas foram lavadas com 500 µl do tampão de lavagem, centrifugadas por 2 minutos a 10000 x g, e o processo repetido. Após descarte do tampão de lavagem, foi realizado uma nova centrifugação (10000 x g, 2 minutos) para retirada de qualquer resíduo do tampão de lavagem. As colunas foram transferidas para novos tubos, e foi adicionado 50µl do tampão de eluição. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10000 x g. As colunas foram descartadas e o material eluído contendo o plasmídeo armazenado a -20 °C.

#### **4.11 Transfecção estável em *N. caninum***

Para transfecção os plasmídeos foram concentrados e purificados com fenol-clorofórmio. Resumidamente, foi adicionado a amostra 400µl de fenol-clorofórmio (Sigma) e mantido no vortex por 30 segundos. Após centrifugação (10000 x g, 5 minutos), foi transferido o sobrenadante para um novo tubo e adicionado 400µl de

clorofórmio (Sigma), foi mantido no vortex por 30 segundos e centrifugado (10000 x g, 5 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 40µl de 3M NaOAc e 1200µl de etanol P.A. gelado. A amostra foi homogeneizada gentilmente por inversão, centrifugada a 10000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado e acrescentado 1000 µl de etanol 70%. Posterior centrifugação, o sobrenadante foi descartado e mantido a temperatura ambiente por 20 minutos para secagem e adicionado 30µl de água estéril e mensurado no nanodrop.

Aproximadamente  $1 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* em 400 µl de tampão de eletroporação Cytomix (120 mM KCl, 0,15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{KPO}_4$  [pH 7,6], 25 mM HEPES, 2 mM EGTA [pH 7,6], 5mM  $\text{MgCl}_2$ ) foram eletroporados com 75-100µg de plasmídeo sob 1,5 kV, 100W, 25µF (BioRad). A suspensão resultante foi incubada em cultura de células HFF mantidas em garrafas de cultura 25cm<sup>2</sup>. Após 18 horas de incubação foi adicionado a droga de seleção por 10 dias e realizado a clonagem em placa de cultura de 96 poços por diluição limitante.

#### **4.12 Obtenção e complementação do gene HPT em NcLivΔHPT**

*N. caninum* da cepa Nc-Liverpool (NcLiv) depletado geneticamente para o marcador de seleção HPT (*hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase*) foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Peter J. Bradley da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA).

Para complementação do HPT, foi primeiramente amplificado no vetor pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) e o plasmídeo linearizado pela enzima de restrição Eco-RV, e 100 µg DNA foi transfectado por eletroporação em parasitos NcLivΔHPT. Os parasitos transfectados foram cultivadas em meio contendo 25 µg /mL ácido micofenólico e 25 µg /mL de xantina (MX) por 10 dias. Os parasitos selecionados foram clonados por diluição limitante em placas de 96 poços.

#### **4.13 Depleção gênica por CRISP/Cas9**

Para gerar o parasito *N. caninum* depletado geneticamente foi utilizado o vetor pU6-Universal depositado na Addgene (ID no.52694) (Figura 7A) (SIDIK et al., 2014). Na tentativa de se obter uma deleção eficiente da proteína alvo, foram realizadas modificações no vetor pU6-Universal. A primeira modificação foi substituir a proteína U6 de *T. gondii* (TgU6) do vetor pU6-Universal pela de *N. caninum* (NeoU6), como promotor desse plasmídeo direcionando o RNA guia (gRNA) (Figura 8A), a partir do

NeoU6 sintetizado pela IDT (Integrated DNA Technologies) e a utilização dos sítios de restrição HindIII 3' e XbaI 5'. A outra modificação foi a inserção de Ku80 direcionado por GraI de *T. gondii* no vetor pU6-Universal (Figura 9A).

A obtenção do parasito *N. caninum* depletado geneticamente para Rop9 (NcLivΔRop9) foi obtido no plasmídeo pU6-Universal modificado pela inserção de Ku80. Todos os primers utilizados na construção dos plasmídeos estão listados em Apêndice I. O primer de Rop9 (P1/ P2, ver Apêndice I) contendo 20 nucleotídeos (nt) foi inserido no vetor modificado entre os locais de restrição BsaI. Os parasitos foram transfectados com o plasmídeo CRISPR-Cas9 para Rop9 juntamente com amplicons de HPT purificados (taxa 5:1) por eletroporação como descrito anteriormente. Parasitos NcLivΔHPT foram eletroporados e selecionados por 10 dias no meio contendo 25 µg/mL MX, e clonados por diluição limitante. Para confirmação da deleção adequada de Rop9, os clones resultantes foram analisados por imunofluorescência e western blotting.

#### **4.14 Geração de parasitos NcLivΔHPT expressando GFP e mCherry**

As sequências de GFP (P3/ P4, ver Apêndice I) e mCherry (P5/P6, ver Apêndice I) foram amplificadas por PCR utilizando os primers designados. O produto da PCR resultante foi clonado no vetor de pJET1.2/blunt (ThermoFisher Scientific), clivado pelas enzimas de restrição NsiI 5' e PacI 3', e expressas nos plasmídeos pNeoGra7 (NCLIV\_021640), pNeoRop13 (NCLIV\_055850) e pNeoTubulina (NCLIV\_039100) desenvolvidos a partir da substituição do promotor GraI de *T. gondii* pelos de *N. caninum* por meio de enzimas de restrição SacI 5' e NsiI 3'. Estes vetores contêm marcadores de seleção HPT (Figura 12A e 12C). Os parasitos transformados foram selecionados usando meio contendo 25 µg /mL de MX, e clonados por diluição limitante em placas de 96 poços. Para confirmar a expressão estável das proteínas GFP e mCherry, taquizoítos de parasitos transgênicos foram analisados por IFA e citometria de fluxo por aproximadamente um ano. Para avaliar cistos fluorescente, camundongos foram infectados por 30 dias e o cérebro coletado para triagem dos cistos fluorescentes. Os cistos foram visualizados e fotografados no microscópio de fluorescência invertido (EVOSfl, Thermo Scientific).

#### 4.15 Geração de parasitos *N. caninum* expressando fatores de virulência de *T. gondii*

As construções para expressão de proteínas heterólogas foram desenvolvidas usando os plasmídeos pNeoGra7-3xHA-HPT ou pNeoRop13-3xHA-HPT ou pTgGra1-3xHA-HPT. Resumidamente, proteínas de *T. gondii* tipo II como Gra15 (P7/ P8, ver Apêndice I), e do tipo I como Rop16 (P9/ P10, ver Apêndice I) e Rop18 (P11/ P12, ver Apêndice I) foram definidos por TGME49\_275470, TGGT1\_262730 e TGGT1\_205250, respectivamente, utilizando a base de dados de genoma de *T. gondii* [www.Toxodb.org](http://www.Toxodb.org) (versão 6.0). Os genes foram clonados por PCR contendo sítios NsiI 5' e NotI 3'. Após a amplificação no vetor pJET1.2/blunt, os alvos de interesse foram fusionados nos plasmídeos pNeoGra7-3xHA-HPT ou pNeoRop13-3xHA-HPT ou pTgGra1-3xHA-HPT utilizando os mesmos sítios de restrição. Os plasmídeos foram linearizados através da digestão pela enzima de restrição Hind III, e 75 µg de DNA foi transfectado por electroporação em parasitos NcLivΔHPT. Os parasitos transformados foram selecionados utilizando 25 µg /mL de MX, e posteriormente clonados por diluição limitante em placas de 96 poços. Para confirmação da inserção adequada dos genes, os clones resultantes foram analisados por imunofluorescência (IFA) e western blotting (WB).

Para determinar os ligantes das proteínas de interesse por BioID (*Proximity-dependent biotin identification*), o BirA\*-3xHA (P13/ P14, ver Apêndice I) foi clonado por PCR contendo sítios NotI 5' e PacI 3'. Após a amplificação no vetor pJET1.2/blunt, os alvos de interesse foram fusionados aos plasmídeos pGra7-3xHA-HPT utilizando os mesmos sítios de restrição desenvolvendo o plasmídeo pGra7-BirA\*-3xHA-HPT. Para desenvolver os vetores pGra7-Gra15-BirA\*-3xHA-HPT e pGra7-Gra24-3xBirA\*-HA-HPT, Gra15 ou Gra24 ([TGME49\_230180], P15/ P16, ver Apêndice I) foram clonados por PCR contendo sítios NsiI 5' e NotI 3'. Após a amplificação no vetor pJET1.2/blunt, os alvos de interesse foram fusionados nos plasmídeos utilizando os mesmos sítios de restrição. 100 µg dos constructos foram linearizados pela enzima de restrição HindIII, purificados e transfectados em parasitos NcLivΔHPT. Os parasitos foram seleccionados com meio contendo 25 µg /mL de MX, clonados por diluição limitante, e triados através de IFA e WB. Um clone expressando a proteína de fusão correta foi selecionado e juntamente com a linhagem parental foram cultivados em meio contendo biotina durante 48 h, anteriormente ao egresso do parasito, as proteínas biotiniladas foram observadas por IFA e WB.



#### **4.16 Ensaio de crescimento competitivo**

Taquizoítos parentais e geneticamente modificados foram misturados em diferentes proporções e adicionados a monocamadas confluentes de fibroblastos CCD-1079Sk ou HFF. Parasitos extracelulares foram utilizados para infectar novas monocamadas para análise por imunofluorescência, sendo este processo repetido por até cinco ou dez passagens. Anticorpos específicos para as proteínas de interesse ou tags endógenos foram utilizados para distinguir os parasitos e determinar a taxa de replicação *in vitro*.

#### **4.17 Ensaio de placa**

200 taquizoítos parentais e geneticamente modificados foram adicionados a monocamadas confluentes de células CCD-1079Sk ou HFF em placas de seis poços. Todas as placas foram incubadas durante um total de oito dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 8 dias de infecção, os poços foram lavados com PBS e fixados com metanol P.A. gelado (Sigma) por 3 minutos a temperatura ambiente, lavados novamente com PBS, e corados com 0,5% cristal violeta. Em seguida, as amostras foram lavadas, e o número de placas e o tamanho foi mensurado usando o microscópio (EVOSfl, Thermo Scientific).

#### **4.18 Imunofluorescência (IFA)**

Taquizoítos parentais e geneticamente modificados foram utilizados para infectar lamínulas contendo HFF, durante 24 ou 48 horas. As lamínulas foram posteriormente fixadas em formaldeído-PBS a 3,7%, durante 15 minutos. As lamínulas foram lavadas em PBS, permeabilizadas e bloqueadas em solução contendo PBS/3% de albumina de soro bovino (BSA) /0.2% Triton X-100, durante 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas com anticorpo primário diluído em PBS/BSA a 3%/0,2% de Triton X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com Alexa 488 anti-coelho de cabra e/ou de cabra Alexa 594-anti-camundongo, diluídos 1: 2000 em PBS/BSA a 3%. Após lavagens adicionais, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio com meio de montagem e a fluorescência foi observada utilizando microscópio de luz invertida equipado com sistema de fotodocumentação (Z1 Axio Imager, Zeiss, Alemanha).

#### **4.19 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Lisados de taquizoitos parentais e geneticamente modificados foram segregados por SDS-PAGE. A concentração final de acrilamida no gel de separação foi de 12%, consistindo de solução de 30% poliacrilamida e 0,8% bis-acrilamida, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 2 mM ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), 0,125% N,N,N,N-tetrametil etileno diamino (TEMED) e 0,125% persulfato de amônio (APS). Após o gel de separação ter completado sua polimerização, foi acrescentado à preparação o gel de empilhamento, contendo 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 0,125% TEMED, 0,125% APS e acrilamida- bisacrilamida na concentração final de 5%.

Amostras das preparações testadas, bem como alíquotas de amostras de padrão de peso molecular de referência (Thermo Scientific), foram diluídas separadamente em tampão de amostra (0,1 mM Tris-HCl [pH 6,8], 4% SDS; 0,2% azul de bromofenol; 20% glicerol), e submetidas a aquecimento de 96 °C por 5 minutos, e aplicadas individualmente, em volumes de 25 µL/poço para as amostras e 5 µL/poço para as amostras de referência de peso molecular.

A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA, por aproximadamente uma hora, utilizando-se fonte Macrodrive 1 LKB (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Após a migração eletroforética das preparações, o gel foi corado com solução de azul de Coomassie ou realizado wetern blotting.

#### **4.20 Western blotting (WB)**

Após a separação eletroforética como descrito acima, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA), utilizando sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia) por 2 horas. O sucesso da transferência foi confirmado por visualização das frações do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose por meio de coloração com solução de Ponceau a 0,5%. A membrana foi bloqueada com PBS-T contendo leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 1 hora à temperatura ambiente. Subseqüentemente, a membrana foi incubada com anticorpos primários diluídos em PBS-TM a 1% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após seis ciclos de lavagens durante cinco minutos com PBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário marcado com peroxidase (HRP) diluído em PBS-TM a 1% por 1 hora à temperatura ambiente.

Após novo ciclo de lavagens, a membrana foi revelada pela adição do substrato e visualizada em sistema de captura de imagem *ChemiDoc MP Systems* (BioRad). As massas moleculares aparentes das bandas foram estimadas a partir do padrão de peso molecular de referência.

#### **4.21 Ensaio de captura por afinidade de proteínas biotiniladas**

Células HFF infectadas com parasitos parentais ou que expressam BirA\* foram cultivados em meio contendo 150  $\mu$ M de biotina durante 48 horas antes do egresso. As células infectadas foram coletadas, lavadas em PBS, e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris [ pH 7,5 ], 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % de desoxicolato de sódio, 1% NP- 40 ) suplementado com um cocktail de inibidor de protease (Roche) durante 30 minutos no gelo. Os lisados foram centrifugados durante 10 minutos a 10000 x g para sedimentar os detritos insolúveis e, em seguida o sobrenadante foi coletado e incubado com esferas magnéticas com estreptavidina (PureProteome, Thermo Fisher Scientific) à temperatura ambiente durante 4 h, sob agitação. As esferas foram coletadas através de rack magnético e lavadas cinco vezes em tampão RIPA, seguido por três lavagens em tampão 8 M de ureia (50mM Tris-HCl [ pH 7,4 ], 150 mM NaCl). Dez por cento de cada amostra foi fervida em tampão de amostra e as proteínas eluídas foram analisadas por WB por meio da estreptavidina-HRP antes da espectrometria de massa.

#### **4.22 Espectrometria de massa das proteínas biotiniladas**

As proteínas purificadas com estreptavidina ligadas as esferas foram tratadas por adição de Lys-C e tripsina. A mistura de peptídeos foi dessalinizada utilizando tips C<sub>18</sub> e fracionado em filtro de 75  $\mu$ m ligado a um capilar de sílica com *electrospray* de 5  $\mu$ m conectado a 15 cm de Luna C<sub>18</sub> de 3  $\mu$ m partículas de fase reversa. O gradiente foi aplicado no sistema UHPLC (*Easy-nLC 1000 ultrahigh-pressure liquid chromatography*, Thermo Scientific). Os espectros da espectrometria de massa (MS/MS) foram coletados em um espectrômetro de massa Q-Exactive (Thermo Scientific). A análise dos dados foi realizada utilizando ProLuCID e DTASelect2 implementado no Integrated Proteomics IP2 (Integrated Proteomics Applications, Inc., San Diego, CA). Proteínas e peptídeos identificados foram triados usando DTASelect e requerido no mínimo dois peptídeos únicos por proteína e uma taxa de peptídeos falsos positivos de menos de 5%, como estimado por uma estratégia de banco de dados *decoy*. Os valores de NSAF (*normalized spectral abundance factor*) foram calculados como

descrito por Chen et al. (2015) e os dados foram importados usando o software dedicado (Pathway Studio, Elsevier, <https://www.elsevier.com/solutions/pathway-studio-biological-research>).

#### **4.23 Detecção da ativação de STAT3 por imunofluorescência e western blotting**

Para avaliar a fosforilação de STAT3, células HFF foram infectadas por *N. caninum* (MOI 1) e mantidas por 18 horas a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C para a detecção de STAT3 por IFA e WB. IFA e WB foram realizados como descritos acima usando anticorpos específicos para STAT3 total (Cell Signaling Technologies), vimentina, RONS/c, ou para a forma fosforilada de STAT3 (p-Tyr705) (Cell Signaling Technologies).

#### **4.24 Obtenção dos camundongos**

Camundongos C57BL/6 com seis a dez semanas de idade foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo mantidos no CBEA com água e ração *ad libitum*, em condições padronizadas de temperatura e umidade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 1991).

Os protocolos para utilização dos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização Animal institucional (CEUA / UFU, protocolo número 052/12 – Anexo II).

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

Camundongos C57BL/6 foram anestesiados (Ketamine 100 mg/Kg e Xilazine 5 mg/Kg) e sacrificados por deslocamento cervical e seus fêmures e tíbias extraídos e dissecados. Em seguida, em câmara de fluxo laminar foram imersos em álcool 70% por 1 minuto e suas epífises cortadas. A medula óssea foi lavada com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto e uma agulha de 26G de diâmetro. A suspensão celular obtida foi centrifugada (400 x g, 10 minutos, 4°C) e ressuspensa em meio R20/30, composto por meio RPMI suplementado com 20% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2mM de L-glutamina e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM; MARIM, et al., 2010).

A suspensão celular foi distribuída igualmente em placas de Petri e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Quatro dias após a incubação, foi adicionado o mesmo

meio condicionado R20/30, e as placas foram mantidas na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por mais 2 dias. No sexto dia, o sobrenadante das placas de Petri foi descartado e PBS gelado estéril foi adicionado em cada placa, sendo incubados a 4°C por 5 minutos para remoção das células. Por fim, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e o pellet obtido foi ressuspensionado em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o layout experimental.

#### **4.26 Infecção por *N. caninum* em BMDMs**

1x10<sup>6</sup> BMDMs/mL foram plaqueados e tratados com LPS (1µg/mL), NaCl (100mM), KCl (100mM), IL-6 (10ng/mL), IL-4 (10ng/mL), WP1066 (inibidor de STAT3, 1µM/mL) ou não-tratados. Após 4 ou 18 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, taquizoítos parentais e geneticamente modificados foram adicionados (*Multiplicity of Infection* - MOI 0.5 ou 1). Após 18 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior análise de citocinas, e as células coletadas para detecção de caspase-1 ativa.

#### **4.27 Marcação de caspase-1 ativa**

Para avaliar a ativação da caspase-1, BMDMs foram removidos da placa com PBS gelado e transferidos para um tubo de polipropileno. A marcação da caspase-1 ativa foi feita por uma hora com o reagente carboxyfluorescein FLICA (FAM-YVAD-FMK, Immunochemistry Technologies, LLC), como recomendado pelo fabricante. Após esse período, as células foram lavadas por cinco vezes com PBS/Soro albumina bovino (BSA) 2% e a aquisição das mesmas realizada no citômetro de fluxo FACSCantoII (BD) sendo as análises realizadas por meio do software “FlowJo” (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

#### **4.28 Cultura de esplenócitos**

As suspensões celulares obtidas do baço dos animais C57BL/ 6 foram lavadas e centrifugadas (400 x g, 10 minutos, 4°C) em meio RPMI. O pellet de células resultante foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise de hemácias (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl [pH 7,5]) para cada baço, incubando-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L- glutamina (2 mM) e 2-β-mercaptoetanol (50 mM) e 10% de SFB para lavagem. O pellet final foi ressuspensionado

em meio RPMI suplementado e a viabilidade celular foi mensurada em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de Tripan. A suspensão celular obtida foi plaqueada em placas de cultura de 96 poços em quintuplicata e infectadas por parasitos parentais ou modificados (MOI 0,1). As células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 18 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior análise de citocinas.

#### 4.29 Quantificação de citocina

Sobrenadante de cultura de BMDMs e esplenócitos foram utilizados para dosagem da citocina IL-12p40 pela técnica ELISA tipo sandwich, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (BD Biosciences). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com o respectivo anticorpo de captura overnight à 4°C. Após lavagem das placas com PBS-Tween e etapa de bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras teste foram adicionados. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com o respectivo anticorpo de detecção biotinizados e conjugados com estreptavidina-peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagem, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (tetrametilbenzidina [TMB], BD Biosciences). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão.

Para quantificação de citocina em amostras de lavado peritoneal de camundongos infectados foi utilizado a técnica de *multiplex Flex Set Cytometric Bead Array* - CBA (BD Biosciences). Resumidamente, foi usado 1 µL de cada bead de captura diluído em diluente de captura em um volume total de 25 µL. Citocinas murinas recombinantes foram diluídas em diluente de ensaio e foram realizadas diluições duplas seriadas para gerar as curvas padrão apropriadas (50 – 0,5 ng/mL). As amostras foram diluídas no mesmo diluente. Os anticorpos de detecção foram preparados e diluídos em diluente de reagente de detecção. O ensaio foi realizado em tubo FACS (BD Biosciences), onde foi acrescentado 25 µL bead de captura; 25 µL curva padrão ou amostras e 25 µL anticorpo de detecção. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente foi adicionado 500 µL do tampão de lavagem e centrifugado (200 x g / 5 minutos). Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e acrescentado 300 µL do

tampão lavagem, e realizado a leitura no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences, EUA). Os dados foram processados e analisados utilizando *software* FACSDIVA™ (BD, Bioscience).

#### **4.30 Ensaio in vivo para detecção de citocina**

Camundongos C57BL/ 6 foram infectados intraperitonealmente com dose letal de  $1 \times 10^6$  taquizoítos de NcLiv $\Delta$ HPT, NcLiv\_HPT ou não infectados. Após 3 dias de infecção os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi coletado para quantificação de citocina.

#### **4.31 Desafio**

Camundongos C57BL/ 6 foram infectados intraperitonealmente com dose letal de  $1 \times 10^6$  taquizoítos de NcLiv $\Delta$ HPT, NcLiv\_Rop16, NcLiv\_Gra15, NcLiv $\Delta$ ROP9 ou não infectados (NI) sendo mantido seis camundongos por grupo. Os animais foram observados diariamente por sinais clínicos, como morbidade (alteração no peso corporal) e mortalidade. Todos os animais sobreviventes foram eutanasiados após 30 de infecção.

#### **4.32 Análise estatística**

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto após o desafio e as curvas de sobrevida foram comparadas usando os testes *log rank* e  $X^2$ . Diferenças entre os grupos na análise de dosagem de citocinas, alterações de peso corporal e carga parasitária foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA ou teste *t* de student ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn, respectivamente, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

#### **4.33 Normas de biossegurança**

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

Todos os procedimentos utilizando animais de laboratório, incluindo habitação e bem-estar foram realizados em concordância com as recomendações do guia para pesquisas biomédicas envolvendo animais do Conselho Internacional para ciência animal de laboratório (ICLAS; *International Council for Laboratory Animal Science*), e assinado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA / UFU) é credenciado pela CONCEA (CIAEP: 23 01.0105.2014) e Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio; CQB: 163/02).



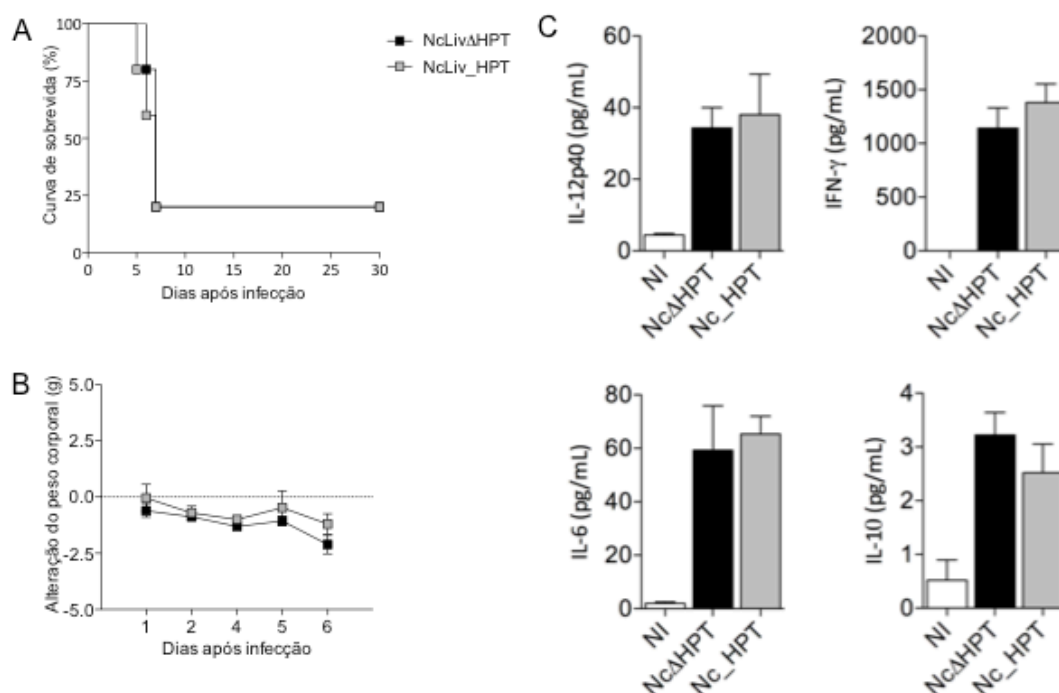
*Resultados*

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Depleção do gene HPT não altera a virulência do parasito e o perfil de resposta imune do hospedeiro

O marcador de seleção HPT foi depletado em taquizoítos de *Neospora caninum* da cepa Liverpool (NcLiv) por recombinação homóloga pelo professor Peter J. Bradley e nos foi gentilmente cedido.

Para avaliar se a depleção do gene HPT poderia influenciar na interação do parasito *N. caninum* com a resposta imune do hospedeiro, camundongos C57BL/6 foram infectados com NcLiv geneticamente depletado para HPT (NcLiv $\Delta$ HPT), bem como o NcLiv $\Delta$ HPT novamente complementado com o gene HPT (NcLiv\_HPT). Todos os camundongos infectados pela via intraperitoneal (i.p.) com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv\_HPT apresentaram padrão similar de sobrevida e perfil de produção de citocinas (Figura 6). Em ambos os grupos, aproximadamente 80% dos camundongos infectados com ambas as cepas morreram 7 dias após a infecção. E quando avaliado os níveis de síntese de citocinas IL-12p40, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-21, IFN- $\gamma$ , IL-6, e IL-10 presente no lavado peritoneal de camundongos infectados por 3 dias com NcLiv $\Delta$ HPT e NcLiv\_HPT, foi detectado apenas as citocinas IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-6, e IL-10, observando-se um perfil similar na produção de tais citocinas entre os grupos. Estes dados confirmam a hipótese de que a depleção do gene HPT não afeta a virulência do parasito e a consequente resposta imune induzida. Portanto, NcLiv $\Delta$ HPT pode ser utilizado como linhagem parental nas modificações genéticas de inserção e depleção de alvos de interesse.

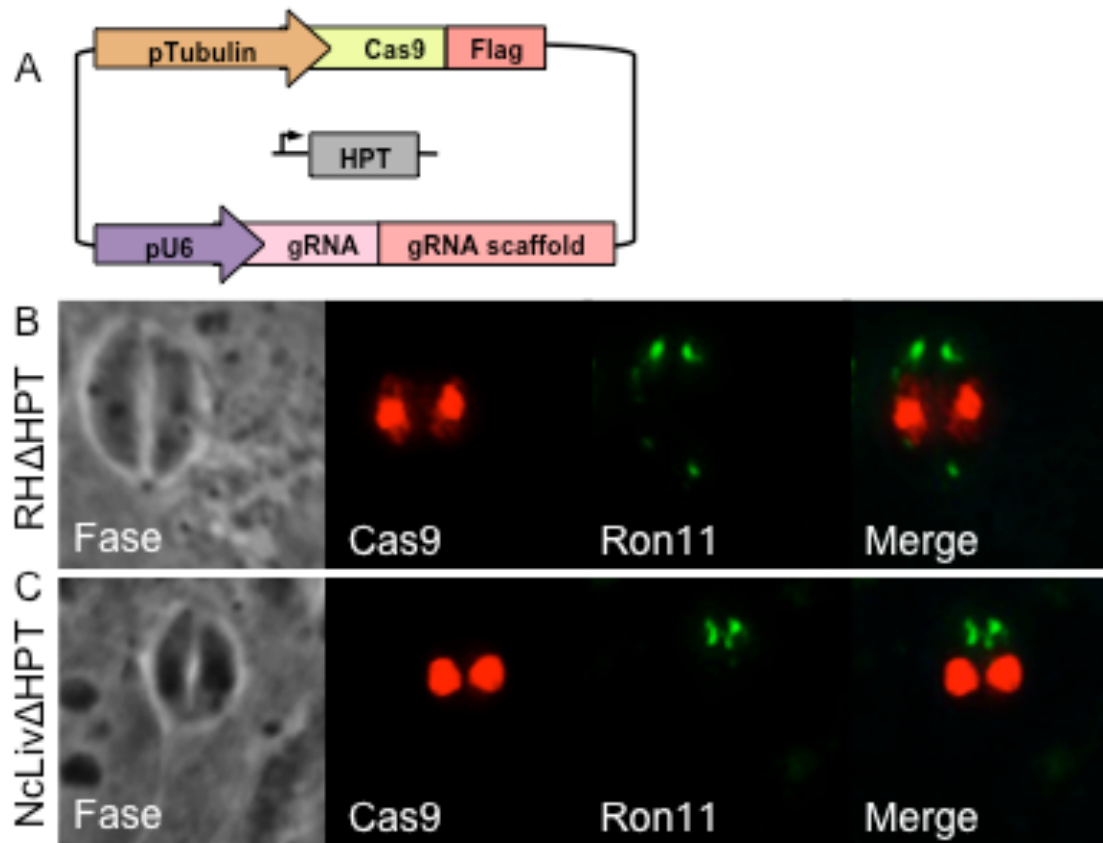


**Figura 6. Camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos de *N. caninum* geneticamente deficientes em HPT (NcLivΔHPT) e NcLivΔHPT complementados com HPT (NcLiv\_HPT) apresentaram padrões similares de virulência e perfil de produção de citocinas.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de NcLivΔHPT e NcLiv\_HPT para ensaios de sobrevivência e para detecção de citocinas presentes no lavado peritoneal. (A) Curva de sobrevivência; (B) alterações de peso corporal; (C) perfil da produção de citocinas presentes no lavado peritoneal após 3 dias de infecção, mensurado por CBA. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, com 6 animais por grupo. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM dos níveis de citocinas em relação à curva padrão ( $P < 0,05$ ; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).

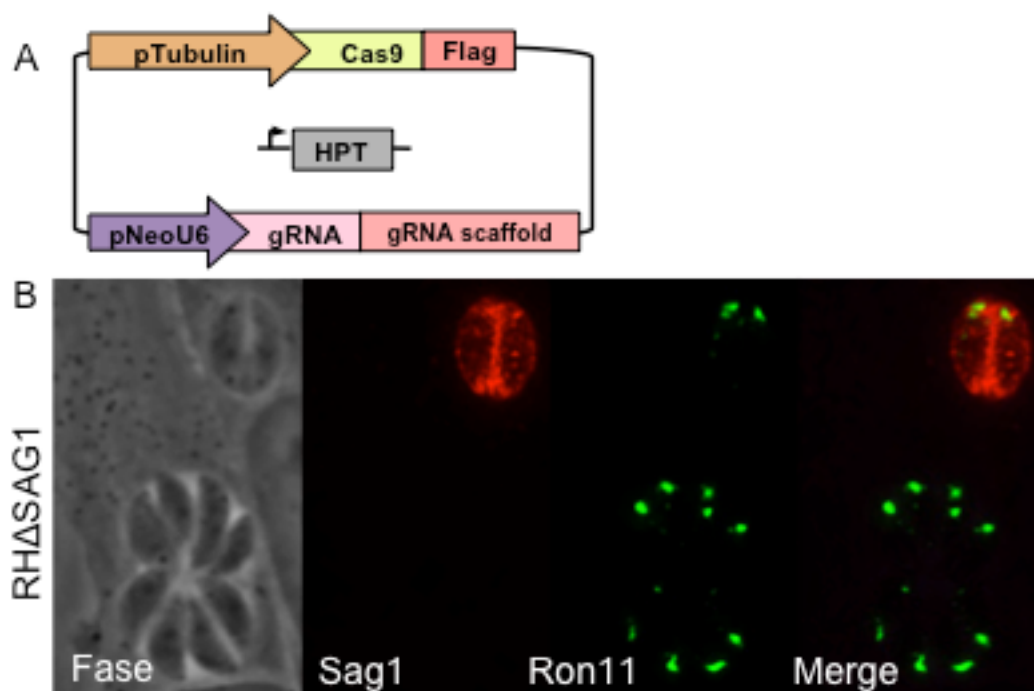
## 5.2 Desenvolvimento de parasitos *N. caninum* depletados geneticamente para a proteína Rop9 (*Knock-out*)

Para gerar os parasitos depletados geneticamente utilizamos o sistema procarioto CRISPR-Cas9. Iniciamos a adaptação das ferramentas moleculares recentemente desenvolvidas para *T. gondii* para o modelo *N. caninum*. Primeiramente, foram realizadas tentativas de depletar alguns genes de interesse utilizando o vetor pU6-Universal, originalmente desenvolvido para *T. gondii* (Figura 7A). No entanto, o mesmo não se mostrou eficiente em *N. caninum*, apesar dos parasitos NcLivΔHPT transfectados expressarem Cas9 no núcleo (Figura 7B). Neste sentido, foi desenvolvido constructos específicos com promotores de *N. caninum*, substituindo o promotor U6 de *T. gondii* (TgU6) pelo de *N. caninum* (pNeoU6), na tentativa de se obter um vetor mais eficiente no processo de depleção dos alvos de interesse (Figura 8A). Apesar de taquizoítos da linhagem NcLivΔHPT transfectados demonstrarem a translocação nuclear de Cas9 (dado não mostrado) e do processo ser altamente eficiente na depleção de SAG1 em *T. gondii* (Figura 8B), o constructo não se mostrou eficiente em *N. caninum*.

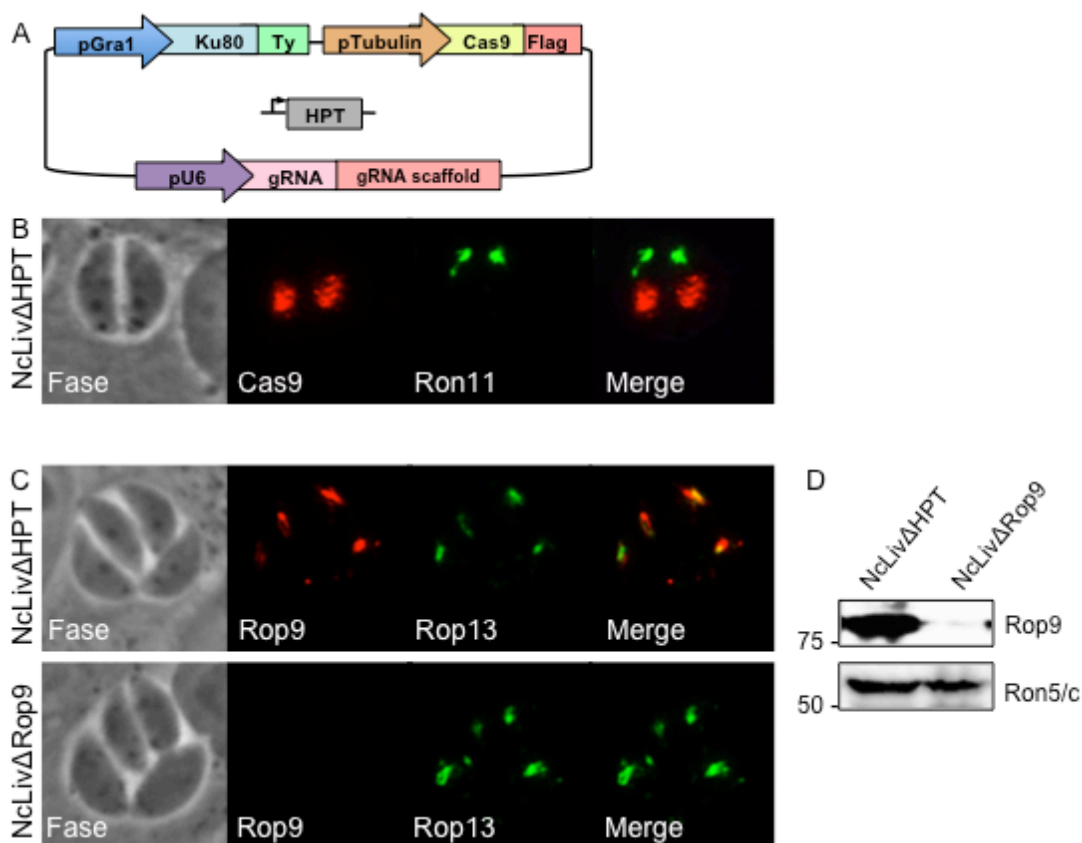
Dentro deste contexto, utilizamos um plasmídeo pU6-Universal modificado pela inserção de Ku80 direcionado pelo promotor Gra1 de *T. gondii* (Figura 9A), com a intenção de melhorar os mecanismos de reparo do DNA quando realizado a deleção do gene alvo. Utilizando esta técnica, parasitos NcLivΔHPT transfectados expressarem Cas9 no núcleo (Figura 9B), e foi obtido taquizoítos de *N. caninum* geneticamente deficientes para Rop9 (NcLivΔRop9). Para confirmar a eficiência da depleção de Rop9 em taquizoítos de *N. caninum*, foi realizado IFA e WB com anticorpos específicos anti-Rop9. Como esperado, não houve marcação de Rop9 no parasito modificado (NcLivΔRop9) por IFA, diferentemente de como observado na linhagem parental (NcLivΔHPT), que foi corretamente marcada pela co-localização com Rop13 (Figura 9C). Portanto, estes dados indicam que a proteína Rop9 foi corretamente depletada no parasito. Adicionalmente, foi realizado WB no lisado total de parasito NcLivΔHPT (parental) e NcLivΔRop9 (transgênico), e a ausência da banda de aproximadamente 36 KDa (peso molecular previsto para Rop9) em relação ao controle foi observado (Figura 9D). Estes resultados demonstram que a técnica utilizada foi efetiva na geração de taquizoítos de *N. caninum* geneticamente deficientes em Rop9.



**Figura 7. Expressão de Cas9 em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* após transfecção com plasmídeo pU6-Universal.** (A) Diagrama do plasmídeo circular pU6-Universal com o plasmídeo linear da droga de seleção (HPT) ao centro; (B) taquizoítos de *T. gondii* e (C) *N. caninum* expressando Cas9 por IFA, Cas9 foi localizado no núcleo do parasito através da marcação com anticorpo anti-Flag e localização do parasito com Ron11. Vermelho: anticorpo anti-Flag de camundongo; verde: anticorpo anti-Ron11 de rato. Ampliação do microscópio de 63x.



**Figura 8. Depleção de Sag1 em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* após transfecção com plasmídeo pU6-Universal modificado pela substituição do promotor U6 de *T. gondii* (TgU6) por U6 de *N. caninum* (NeoU6). (A) Diagrama do plasmídeo circular pNeoU6 com o plasmídeo linear da droga de seleção (HPT) ao centro; (B) população de taquizoítos de *T. gondii* transfectados com plasmídeo pU6-Universal modificado com promotor específico para *N. caninum* na presença ou ausência da expressão de Sag1 por IFA, Sag1 foi localizado na superfície do parasito por anticorpo anti-Sag1 e localização do parasito com Ron11. Vermelho: anticorpo anti-Sag1 de camundongo; verde: anticorpo anti-Ron11 de rato. Ampliação do microscópio de 63x.**



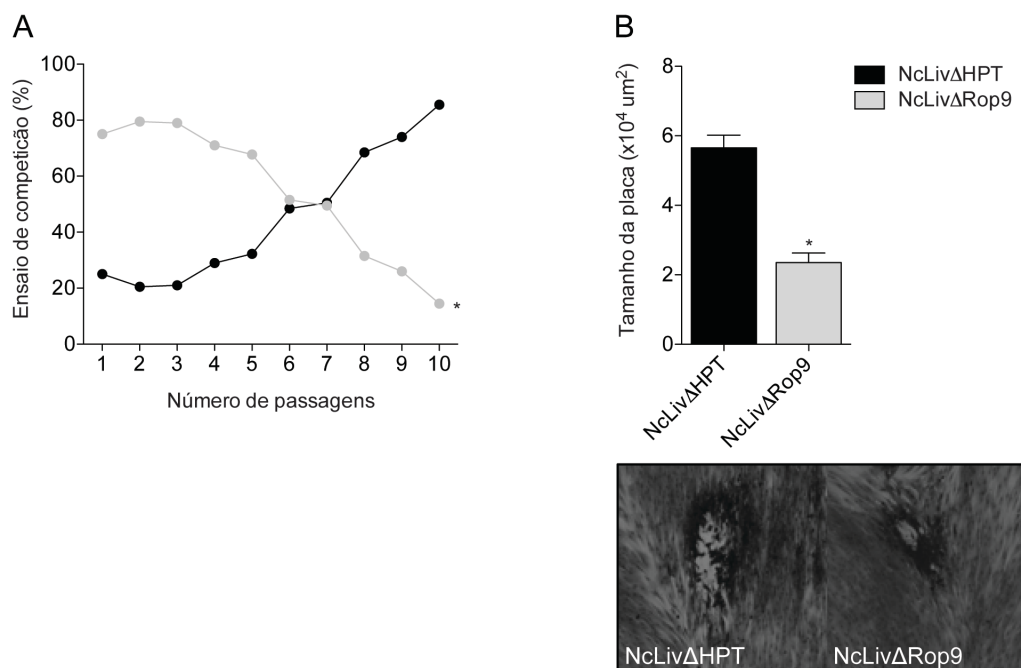
**Figura 9. Depleção de Rop9 em taquizoítos de *Neospora caninum* após transfecção com plasmídeo pU6-Universal modificado pela inserção de Ku80 direcionado pelo promotor Gra1 de *Toxoplasma gondii*.** (A) Diagrama do plasmídeo circular pU6-Universal modificado com o plasmídeo linear da droga de seleção (HPT) ao centro; (B) *N. caninum* expressando Cas9 por IFA, Cas9 foi localizado no núcleo do parasito através da marcação com anticorpo anti-Flag e localização do parasito com Ron11. Vermelho: anticorpo anti-Flag de camundongo; verde: anticorpo anti-Ron11 de rato. Ampliação do microscópio de 63x; (C) taquizoítos de *N. caninum* não expressando Rop9 por IFA, Rop9 foi localizada nas roptrias através do anticorpo específico para Rop9 e se colocou com Rop13. Vermelho: anticorpo anti-Rop9 de rato; verde: anticorpo anti-Rop13 de camundongo. Ampliação do microscópio de 63x; (D) depleção de Rop9 em taquizoítos de *N. caninum* transgênicos foi confirmada por WB. Rop9 foi marcada por anticorpo primário específico a Rop9 nos parasitos transfectados.

### 5.3 Depleção de Rop9 em *N. caninum* altera o crescimento do parasito in vitro

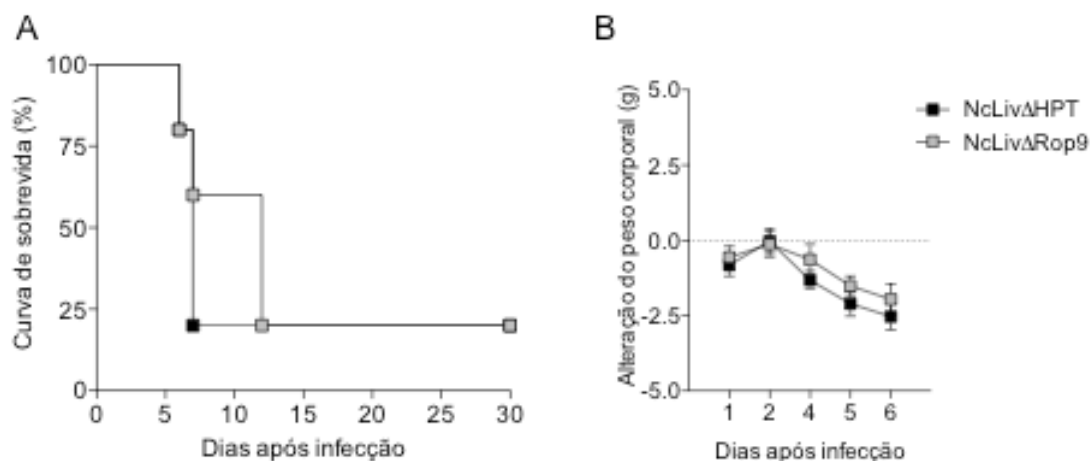
Durante a seleção dos clones de NcLiv $\Delta$ Rop9, foi observado uma redução no crescimento do parasito por meio da formação de pequenas placas. Portanto, para confirmar se a deleção de Rop9 resultou em uma alteração no crescimento do parasito, foi realizado o ensaio de competição entre NcLiv $\Delta$ HPT (parental) e NcLiv $\Delta$ Rop9 (transgênico). Com base nestes experimentos, foi observado que a depleção da proteína Rop9 compromete a taxa de crescimento dos taquizoítos transgênicos, pois neste ensaio a linhagem parental supera o crescimento da linhagem transgênica (Figura 10A). Portanto, a deleção do gene ROP9 leva a um defeito de crescimento do parasito. Adicionalmente, foi realizado um ensaio de placa para avaliar o ciclo lítico do parasito durante um período de 8 dias de infecção. Os resultados obtidos demonstraram que a deleção de Rop9 em taquizoítos de *N. caninum* altera significativamente no tamanho e no número de placas formadas, se comparado com a linhagem parental (Figura 10B). Portanto, os dados indicam que a depleção deste gene induz uma diminuição no crescimento do parasito in vitro, inferindo que esta proteína é importante para o correto desenvolvimento e replicação do parasito.

Para avaliar se a deleção de Rop9 alteraria o padrão de virulência de *N. caninum*, dado que houve uma redução no seu crescimento, foi realizado infecções com dose letal de NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv $\Delta$ Rop9 em camundongos C57BL/6. Foi observado que animais infectados com NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv $\Delta$ Rop9 não apresentaram diferenças na mortalidade e morbidade (Figura 11A e 11B). Portanto, a depleção da proteína Rop9 em *N. caninum* não altera a virulência do parasito.





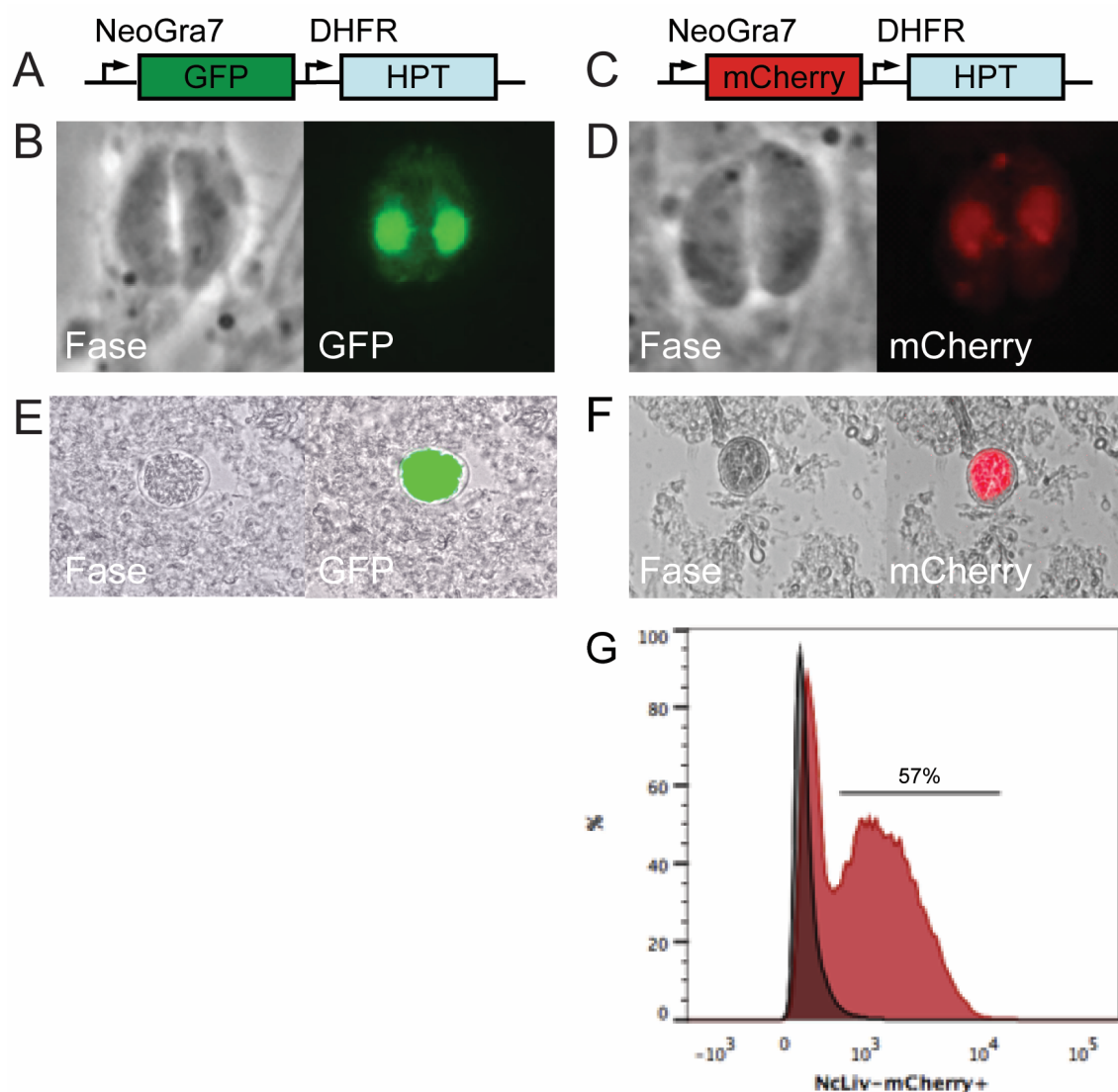
**Figura 10. Depleção de Rop9 em *N. caninum* altera o crescimento do parasito in vitro.** (A) Ensaio de competição de crescimento entre a linhagem parental (NcLivΔHPT) e transgênica (NcLivΔRop9) quando cultivadas juntas por 10 passagens; (B) mensuração da formação de placa em células infectadas por NcLivΔHPT ou NcLivΔRop9 após 8 dias de infecção. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, e indicam a média  $\pm$  SEM do tamanho da placa (\* $P < 0,05$ ; teste t de Student).



**Figura 11. Curva de sobrevida e alteração de peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos das linhagens parental e transgênica de *N. caninum*.** Camundongos foram desafiados com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de NcLivΔHPT (parental) ou NcLivΔRop9 (transgênica). \*Diferença significativa em relação ao grupo NcLivΔHPT ( $p < 0,05$ ; testes log rank e  $\chi^2$ ).

#### **5.4 Identificação de promotores específicos e eficientes para expressão de proteínas heterólogas em *Neospora caninum* (Knock-in)**

Plasmídeos específicos para *N. caninum* foram desenvolvidos utilizando como promotores genes próprios do parasito (Gra7 [NCLIV\_021640], Rop13 [NCLIV\_055850], Tubulina [NCLIV\_039100]). Para tal, foi modificado o vetor desenvolvido para *T. gondii*, substituindo-se o promotor Gra1 de *T. gondii* pelos promotores gênicos de *N. caninum* por meio de enzimas de restrição SacI 5' e NsiI 3', a fim de determinar o promotor mais eficiente para expressão estável de alvos em linhagens de *N. caninum* do isolado Liverpool. Parasitos deficientes em HPT (NcLivΔHPT) foram transfectados utilizando os plasmídeos pNeoGra7-HPT ou pNeoTubulin-HPT ou pNeoRop13-HPT, ligados as sequências gênicas codificantes para as proteínas fluorescentes GFP ou mCherry pelas enzimas de restrição NsiI 5' e PacI 3', e cultivados em meio contendo a droga de seleção MX. Após 10 dias de seleção, as populações de parasitos resistentes à droga foram clonadas para obtenção dos parasitos com expressão estável do gene em estudo. As populações de parasitos transfectados com plasmídeos contendo os promotores Gra7 (NCLIV\_021640) ou Rop13 (NCLIV\_055850) exibiram uma alta frequência de parasitos transformados, que foi analisado pela presença de taquizoítos e cistos teciduais fluorescentes (Figura 12A-F). No entanto, parasitos transfectados com o vetor utilizando o promotor de tubulina apresentaram fluorescência instável e de baixa intensidade (dados não mostrados). Adicionalmente, a obtenção de parasitos portando a expressão estável de marcadores fluorescentes mostrou-se uma ferramenta valiosa para a determinação de carga parasitária e a identificação de taquizoítos e cistos teciduais (Figuras 12E-G).

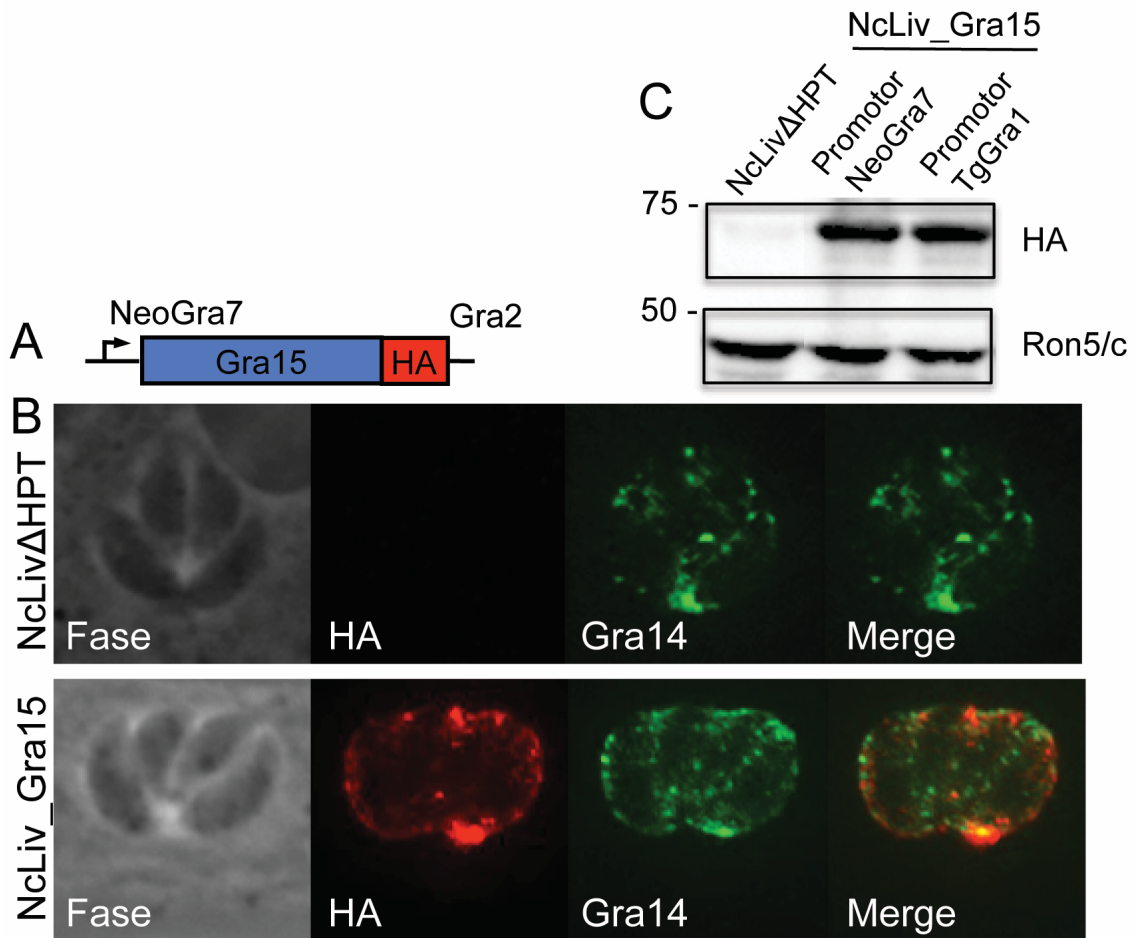


**Figura 12. Estabelecimento de Gra7 como promotor específico para *N. caninum*.** Expressão estável de GFP e mCherry em taquizoítos e cistos de *N. caninum*. (A) Diagrama do plasmídeo linear com o cassete que codifica GFP dirigido pelo promotor Gra7 de *N. caninum*; (B) taquizoítos de *N. caninum* expressando GFP, ampliação do microscópio de 63x; (C) diagrama do plasmídeo linear com o cassete que codifica mCherry dirigido pelo promotor Gra7 de *N. caninum*; (D) taquizoítos de *N. caninum* expressando mCherry, ampliação do microscópio de 63x; (E) cisto no homogenato de cérebro de camundongos infectados por 30 dias com *N. caninum* expressando GFP, ampliação do microscópio de 40x; (F) cisto no homogenato de cérebro de camundongos infectados por 30 dias com *N. caninum* expressando mCherry, ampliação do microscópio de 40x; (G) parasitismo em células HeLa após 18 horas de infecção com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* expressando mCherry foi analisado por citometria de fluxo.

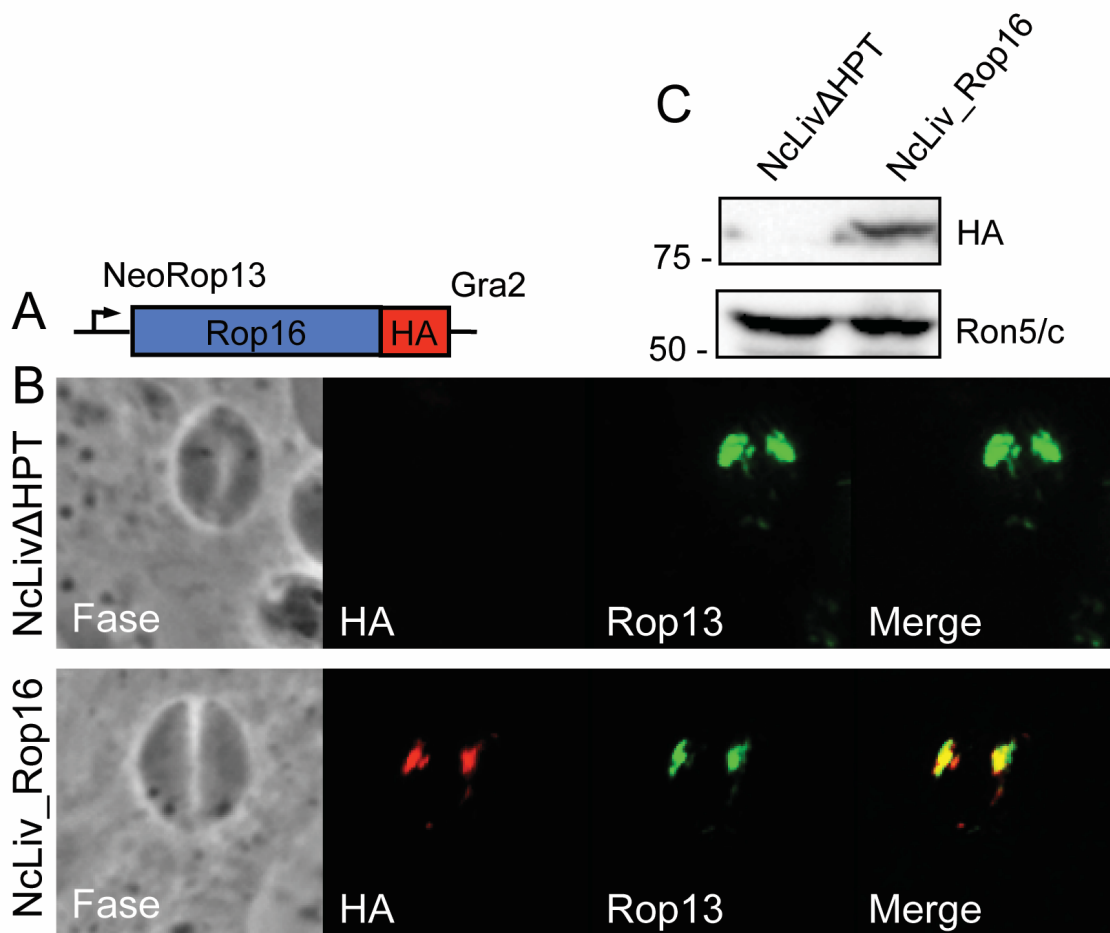
## 5.5 Estabelecimento de linhagens de *N. caninum* expressando proteínas de *T. gondii*

A fim de avaliar se *N. caninum* seria um modelo adequado para a expressão de proteínas heterólogas, foi utilizado plasmídeos com três *tags* de hemaglutinina (HA) na região carboxi-terminal direcionado pelos promotores Gra7 (NCLIV\_021640) ou Rop13 (NCLIV\_055850) (Figura 13A e 14A). Dessa forma, fatores de virulência de *T. gondii* (Gra15 [TGME49\_275470], Rop16 [TGGT1\_262730], e Rop18 [TGGT1\_205250]) foram inseridos entre os sítios de restrição NsiI 5' e NotI 3' do plasmídeo pNeoGra7\_3xHA-HPT ou pNeoRop13\_3xHA\_HPT, direcionados pelo promotor adequado, conforme o seu perfil de expressão no ciclo celular, ou seja, se o gene alvo inserido é expresso de forma estável durante todo o ciclo celular do parasito, foi utilizado o vetor que contém o promotor Gra7, e se apresenta expressão cíclica, foi utilizado o promotor Rop13. A expressão e localização dos insertos gênicos foi avaliado por WB e IFA, respectivamente. Como esperado, a IFA mostrou que Gra15 foi corretamente marcada como grânulo denso, co-localizando com o marcador Gra14 (Figura 13B), enquanto que Rop16 e Rop18 foram corretamente marcadas como roptrias (Figura 14B e 15B), confirmados pela co-localização com Rop13. Adicionalmente, a expressão das proteínas heterólogas no *N. caninum* foi confirmada por meio da detecção do tag de HA por WB em taquizoítos lisados, diferentemente do observado em parasitos NcLivΔHPT, que não apresentaram a marcação (Figura 13C, 14C, 15C). Portanto, estes dados indicam que as proteínas expressas no parasito foram corretamente inseridas e localizadas. Adicionalmente, taquizoítos de *N. caninum* transfectados para expressão de Gra15, utilizando um plasmídeo cujo promotor era o gene Gra1 de *T. gondii* (pTgGra1-3xHA-HPT), apresentaram níveis similares de expressão da proteína heteróloga, comparado com o resultado obtido com parasitos transfectados com o plasmídeo *N. caninum*-específico (pNeoGra7-3xHA-HPT). No entanto, foi perceptível a redução na frequência de populações de parasitos positivos para o gene de interesse quando transfectados com plasmídeo contendo o promotor de *T. gondii* (dado não mostrado).

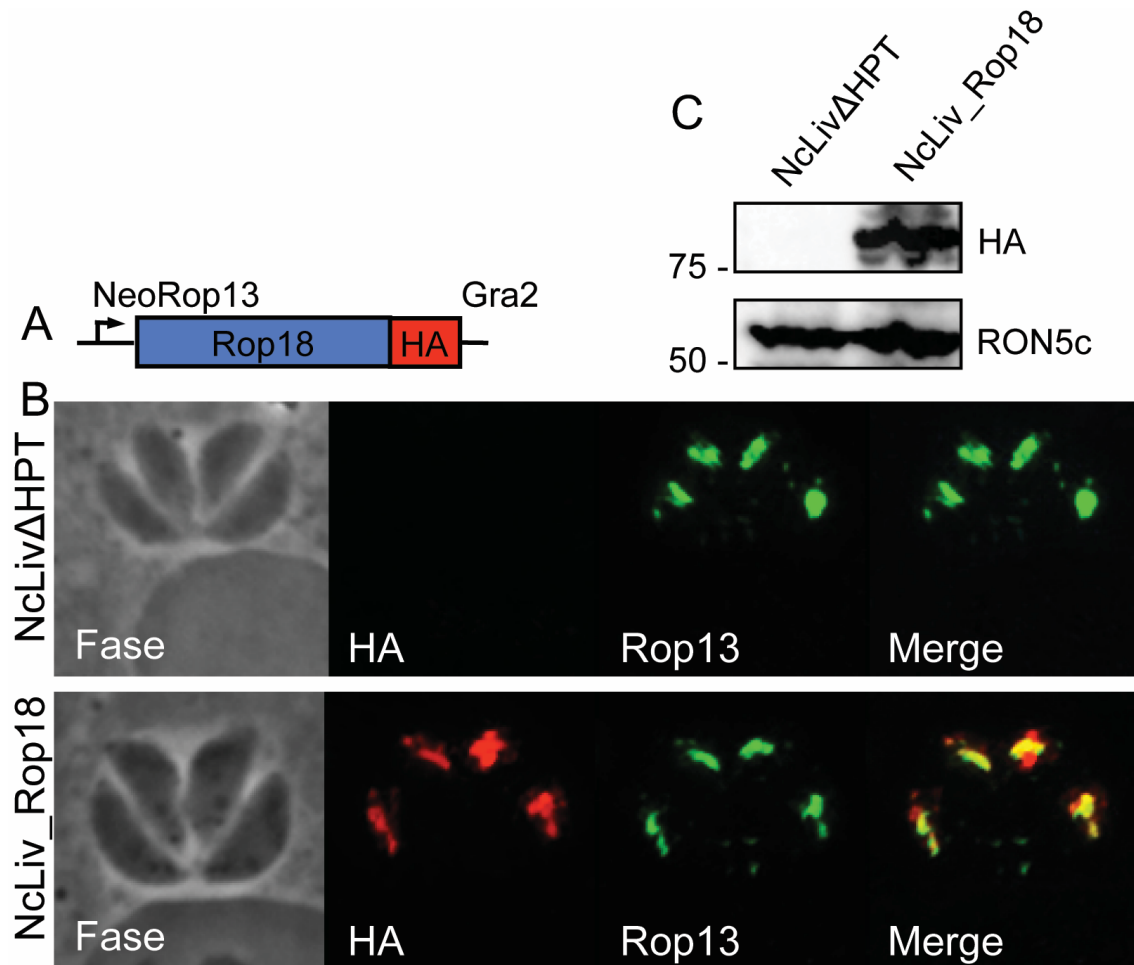
Dessa forma, os plasmídeos utilizados na transfecção para expressão de proteínas heterólogas em *N. caninum* mostraram-se eficientes e estáveis. Pois, mesmo com a retirada da droga de seleção (MX) os taquizoítos se mantiveram estáveis expressando os alvos inseridos.



**Figura 13. Expressão de Gra15 de *T. gondii* do tipo II em *N. caninum*.** (A) Diagrama do plasmídeo linear com o cassete que codifica Gra15 ligado ao tag de HA na região carboxi-terminal, dirigido pelo promotor Gra7 de *N. caninum*; (B) taquizoítos de *N. caninum* expressando Gra15 por IFA, localizado no vacúolo parasitóforo através do tag de HA, colocalizado com Gra14. Vermelho: anticorpo anti-HA de coelho; verde: anticorpo anti-GRA14 de camundongo. Ampliação da imagem: 63x; (C) expressão de Gra15 em taquizoítos de *N. caninum* modificados foi confirmada por WB. Gra15 foi detectado por anticorpo primário específico ao tag de HA nos taquizoítos de *N. caninum* transfectados.



**Figura 14. Expressão de Rop16 de *T. gondii* do tipo I em *N. caninum*.** (A) Diagrama do plasmídeo linear com o cassete que codifica Rop16 ligado ao tag de HA na região carboxi-terminal, dirigido pelo promotor Rop13 de *N. caninum*; (B) taquizoítos de *N. caninum* expressando Rop16 por IFA, Rop16 foi localizado nas roptrias através do tag de HA, colocalizado com Rop13. Vermelho: anticorpo anti-HA de coelho; verde: anticorpo anti-Rop13 de camundongo. Ampliação da imagem: 63x; (C) expressão de Rop16 em taquizoítos de *N. caninum* modificados foi confirmada por WB. Rop16 foi marcado por anticorpo primário específico ao tag de HA nos taquizoítos de *N. caninum* transfectados.



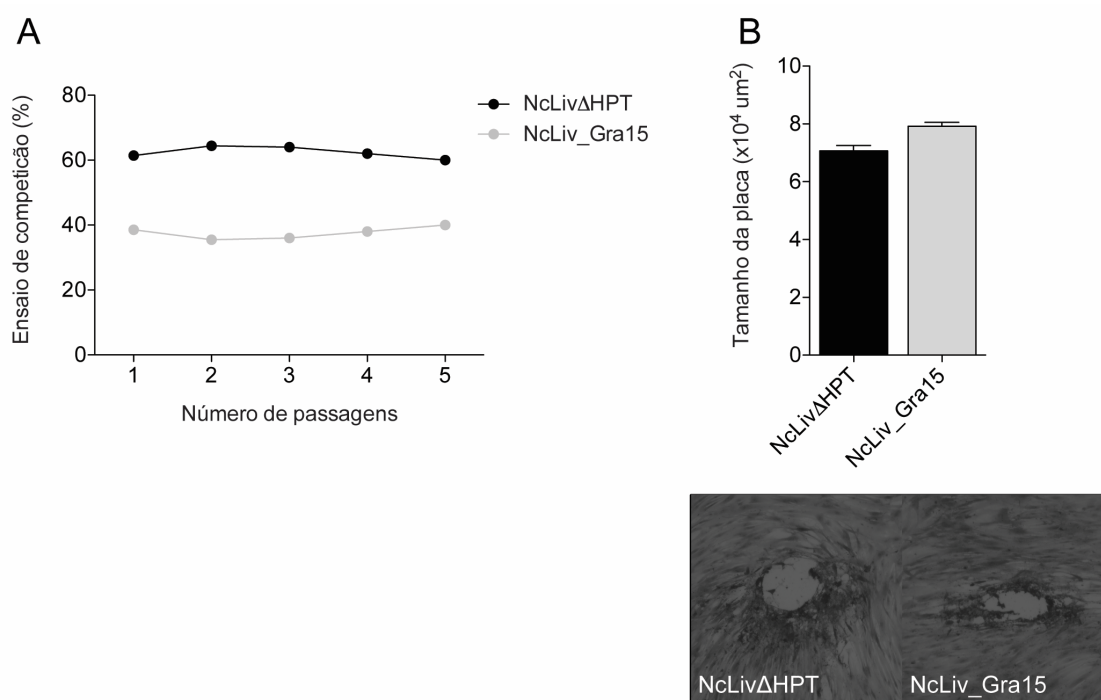
**Figura 15. Expressão de Rop18 de *T. gondii* do tipo I em *N. caninum*.** (A) Diagrama do plasmídeo linear com o cassete que codifica Rop18 ligado ao tag de HA na região carboxi-terminal, dirigido pelo promotor Rop13 de *N. caninum*; (B) taquizoítos de *N. caninum* expressando Rop18 por IFA, Rop18 foi localizado nas roptrias através do tag de HA, colocalizado com Rop13. Vermelho: anticorpo anti-HA de coelho; verde: anticorpo anti-Rop13 de camundongo. Ampliação da imagem: 63x; (C) expressão de Rop18 em taquizoítos de *N. caninum* modificados foi confirmada por WB. Rop18 foi marcado por anticorpo primário específico ao tag de HA nos taquizoítos de *N. caninum* transfectados.

## **5.6 Inserção de Gra15 ou Rop16 de *T. gondii* em *N. caninum* não altera o crescimento do parasito in vitro e Rop16 reduz a virulência do parasito**

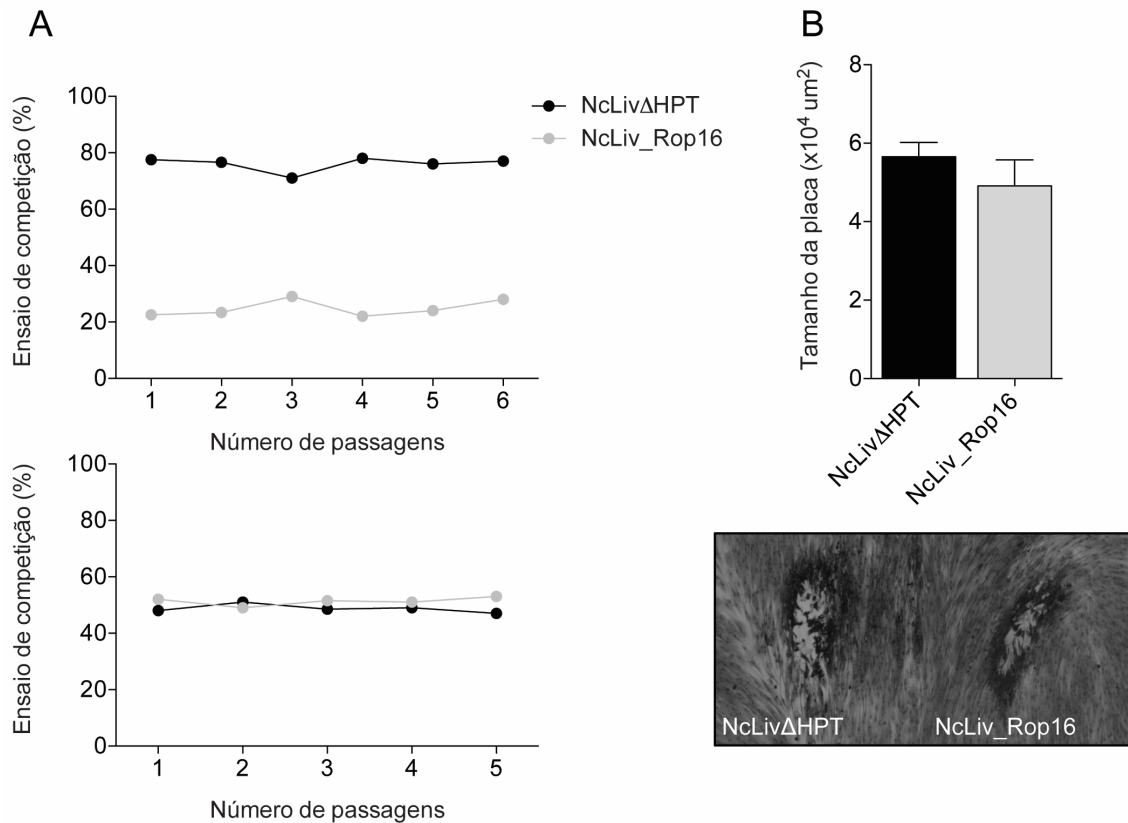
Em sequência, foi selecionado dois alvos em estudo aleatoriamente para se avaliar se a inserção de genes heterólogos em *N. caninum* poderia induzir alterações nos padrões de crescimento e replicação dos taquizoítos transgênicos. Para tal, foram selecionadas duas linhagens transgênicas (NcLiv\_Gra15 e NcLiv\_Rop16) para uma comparação com a linhagem parental (NcLiv $\Delta$ HPT), através de ensaios de competição entre NcLiv $\Delta$ HPT e NcLiv\_Gra15 ou NcLiv $\Delta$ HPT e NcLiv\_Rop16. Com base neste experimento, foi observado que a adição dos genes Gra15 ou Rop16 de *T. gondii* em taquizoítos de *N. caninum* não comprometeram a taxa de crescimento dos taquizoítos (Figura 16A e 17A). Adicionalmente, foi realizado um ensaio de placa para avaliar o ciclo lítico das linhagens em questão durante um período de 8 dias de infecção. Os resultados obtidos demonstraram que NcLiv\_Gra15 ou NcLiv\_Rop16 não alteraram significativamente o tamanho e o número de placas formadas, se comparado com a linhagem parental (Figura 16B e 17B). Portanto, este conjunto de resultados indicaram que a inserção de genes heterólogos, como Gra15 e Rop16, não alteram o desenvolvimento de taquizoítos de *N. caninum* in vitro, e sugerem que *N. caninum* pode ser utilizado como uma abordagem alternativa para a análise biológica de proteínas de *T. gondii*.

Complementarmente, para avaliar se os insertos heterólogos não alteraria a virulência do parasito, dado que não alterou o seu crescimento, foi realizado infecções com dose letal de NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv\_Gra15 ou NcLiv\_Rop16 em camundongos C57BL/6. Foi observado que animais infectados com NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv\_Gra15 não apresentaram diferença na mortalidade, portanto a inserção de Gra15 não alterou a virulência do parasito (Figura 18). Em contraste, a inserção de Rop16 em *N. caninum* resulta em redução da virulência in vivo, pois animais desafiados com NcLiv\_Rop16 tem um aumento na sobrevida quando comparados com NcLiv $\Delta$ HPT. Estes dados mostraram que Gra15 não altera a virulência do parasito in vivo, porém Rop16 afeta sua virulência reduzindo-a. Portanto, a inserção do gene codificador de Rop16 de *T. gondii* do tipo I em taquizoítos de *N. caninum* reduz a virulência induzida pela infecção in vivo.

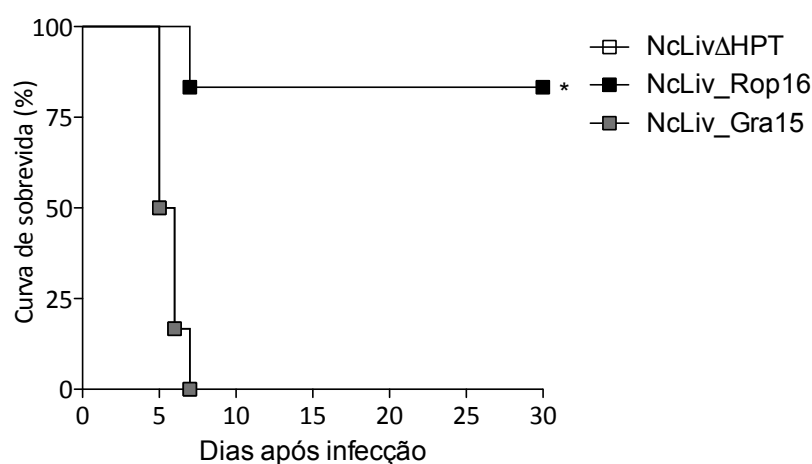




**Figura 16. Inserção de Gra15 de *T. gondii* em *N. caninum* não altera o crescimento do parasito in vitro.** (A) Ensaio de competição de crescimento entre a linhagem parental (NcLivΔHPT) e transgênica (NcLiv\_Gra15) quando cultivadas juntas por 5 passagens; (B) mensuração da formação de placa em células infectadas por NcLivΔHPT ou NcLiv\_Gra15 após 8 dias de infecção. Imagem representativa do tamanho da placa formada no ensaio de placa. Ampliação da imagem: 10x. Os valores são representativos de dois experimentos independentes e indicam a média  $\pm$  SEM do tamanho da placa (\* $P < 0,05$ ; teste t de Student).



**Figura 17. Inserção de Rop16 de *T. gondii* em *N. caninum* não altera o crescimento do parasito in vitro.** (A) Ensaio de competição de crescimento entre a linhagem parental (NcLivΔHPT) e transgênica (NcLiv\_Rop16) quando cultivadas juntas por 5 a 6 passagens; (B) mensuração da formação de placa em células infectadas por NcLivΔHPT ou NcLiv\_Rop16 após 8 dias de infecção. Imagem representativa do tamanho da placa formada no ensaio de placa. Ampliação da imagem: 10x. Os valores são representativos de dois experimentos independentes e indicam a média  $\pm$  SEM do tamanho da placa (\* $P < 0,05$ ; teste t de Student).



**Figura 18. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos das linhagens parental e transgênica de *N. caninum*.** Camundongos foram desafiados com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de NcLivΔHPT (parental), NcLiv\_Rop16 ou NcLiv\_Gra15. \*Diferença significativa em relação ao grupo NcLivΔHPT ( $p < 0,05$ ; testes log rank e  $\chi^2$ ).

### 5.7 *N. caninum* expressando proteínas de *T. gondii* do tipo II (Gra15 e Gra24) ou tipo I (Rop16) mantêm o fenótipo imunológico

Para verificar a utilidade do sistema de inserção gênico aqui proposto, optamos por identificar as proteínas do hospedeiro que interagem com Gra15 (TGME49\_275470) e Gra24 (TGME49\_230180), ambas originalmente expressas em taquizoítos de *T. gondii* do tipo II, por meio da tecnologia de BioID (ROUX et al., 2012; NADIPURAM et al., 2016). Primeiramente, foi desenvolvido plasmídeos contendo Gra15 ou Gra24 ligados a BirA\* e com tag de HA, direcionados pelo promotor de Gra7 (NCLIV\_021640) de *N. caninum* (Figura 19A e 20A). Gra15-BirA\* ou Gra24-BirA\* foi integrado no genoma de taquizoítos da linhagem NcLivΔHPT (parental), e a sua expressão foi avaliada por IFA e WB (Figura 19 e 20). Mediante a execução do protocolo proposto, foi observado a correta marcação da expressão dos insertos no vacúolo parasitóforo (Figura 19A e 20A), um padrão consistente com proteínas de grânulos densos. E com a intenção de determinar se Gra15-BirA\* ou Gra24-BirA\* estariam se ligando à proteínas próximas ao VP, parasitos foram crescidos em meio suplementado com biotina e marcados para detecção de proteínas biotiniladas, por meio de estreptavidina conjugada com fluoróforo para IFA. Parasitos parentais possuem proteínas biotiniladas endogenamente no apicoplasto que são marcadas por estreptavidina, representando um *background* deste método em *Neospora*, como também ocorre no modelo de *Toxoplasma* (CHEN et al., 2015; NADIPURAM et al., 2016) (Figura 19B e 20B, painéis superiores). No entanto, parasitos expressando Gra15-BirA\* ou Gra24-BirA\* apresentaram uma robusta marcação com estreptavidina no vacúolo parasitóforo, o que indica a interação da biotina com as proteínas marcadas pelo BirA\* e presentes no VP (Figura 19B e 20B, painéis superiores). Em seguida, essa interação foi também avaliada por WB no lisado total de parasitos que expressam Gra15-BirA\* ou Gra24-BirA\* utilizando estreptavidina-HRP. Embora o *background* das proteínas biotiniladas foram detectadas nos lisados com parasitos parentais, houve um aumento significativo destas proteínas no lisado dos parasitos transgênicos, mediante a suplementação do meio com biotina (Figura 19C e 20C). As proteínas marcadas foram únicas para os parasitos que expressam Gra15-BirA\* ou Gra24-BirA\*, e não correspondem ao *background* observado na linhagem parental.

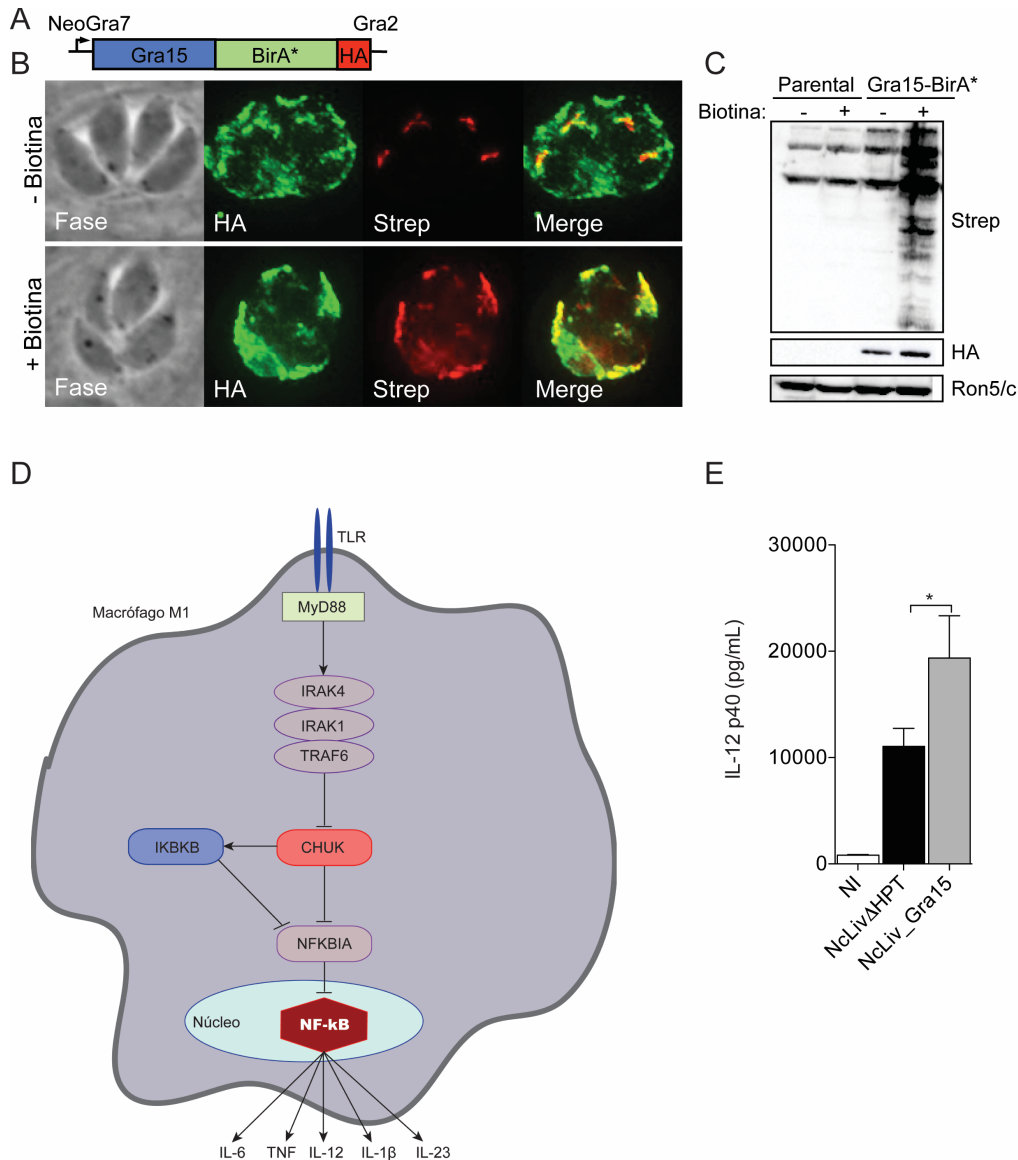
Dessa forma, foi avaliado se a inserção de fatores de virulência de *T. gondii* em taquizoítos de *N. caninum* seriam capazes de reproduzir os mesmos fenótipos imunológicos observados no parasito de origem, foram então selecionadas linhagens

transgênicas portando os genes Gra15 (TGME49\_275470), Gra24 (TGME49\_230180), e Rop16 (TGGT1\_262730), uma vez que estes genes já foram melhores explorados e caracterizados. Para tal, utilizamos inicialmente taquizoítos de *N. caninum* expressando Gra15 ou Gra24 ligado a BirA\* para identificar as proteínas do hospedeiro com potencial de ligação com a proteína analisada. Dessa forma, células HFF infectadas com NcLivΔHPT ou NcLiv-Gra15-BirA\* ou NcLiv-Gra24-BirA\* e tratadas com biotina por 48 horas foram lisadas, e as proteínas biotiniladas foram purificadas por *beads* magnéticas com streptavidina e analisadas por espectrometria de massas. Com tal abordagem, foi identificado um enriquecimento da expressão do fator de transcrição NF-κB, bem como de moléculas relacionadas a esta via de sinalização, em células infectadas por NcLiv-Gra15-BirA\*, quando comparadas com aquelas infectadas por NcLivΔHPT (Figura 19D). De modo complementar, foi avaliado se a inserção de Gra15 em *N. caninum* comprometeria a produção de IL-12p40 em macrófagos infectados. Para isso, BMDMs foram infectados com NcLivΔHPT ou NcLiv-Gra15-BirA\*, e após 18 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado para quantificação dos níveis IL-12p40. Foi observado um aumento significativo na produção de IL-12p40 em células infectadas pelo parasito transgênico, quando comparado com a linhagem parental (Figura 19E). Enquanto, que células infectadas por NcLiv-Gra24-BirA\* apresentaram um aumento na expressão da MAPK p38-α, quando comparadas com aquelas infectadas por NcLivΔHPT (Figura 20D-E). Estes dados foram confirmados pela detecção da fosforilação de p38 por CBA em BMDMs infectados durante 30 minutos e 18 horas por parasitos da linhagem parental (NcLivΔHPT), *N. caninum* expressando Gra24 (NcLiv\_GRA24) ou por *T. gondii* da cepa tipo II (PRU), foi observado que taquizoítos de NcLiv\_GRA24 induziu um aumento significante da ativação da MAPK/p38 como visto pelo parasito PRU quando comparados com NcLivΔHPT, independentemente do tempo de infecção (Figura 20E). No entanto, esse aumento na fosforilação de p38 não interferiu na síntese da citocina IL-12p40 em macrófagos infectados por 18 horas (Figura 20F). Portanto, a expressão de Gra15 ou Gra24 em *N. caninum* foi biologicamente funcional nos taquizoítos de *N. caninum* transgênicos gerados, e mantêm o seu fenótipo imunológico, como já descrito na literatura (ROSOWSKI et al., 2011; BRAUN et al., 2013).

Quanto ao gene Rop16, foi observado que sua inserção em *N. caninum* foi capaz de reproduzir perfil semelhante de modulação da célula hospedeira, conforme previamente descrito mediante a infecção de células hospedeiras por taquizoítos de *T.*

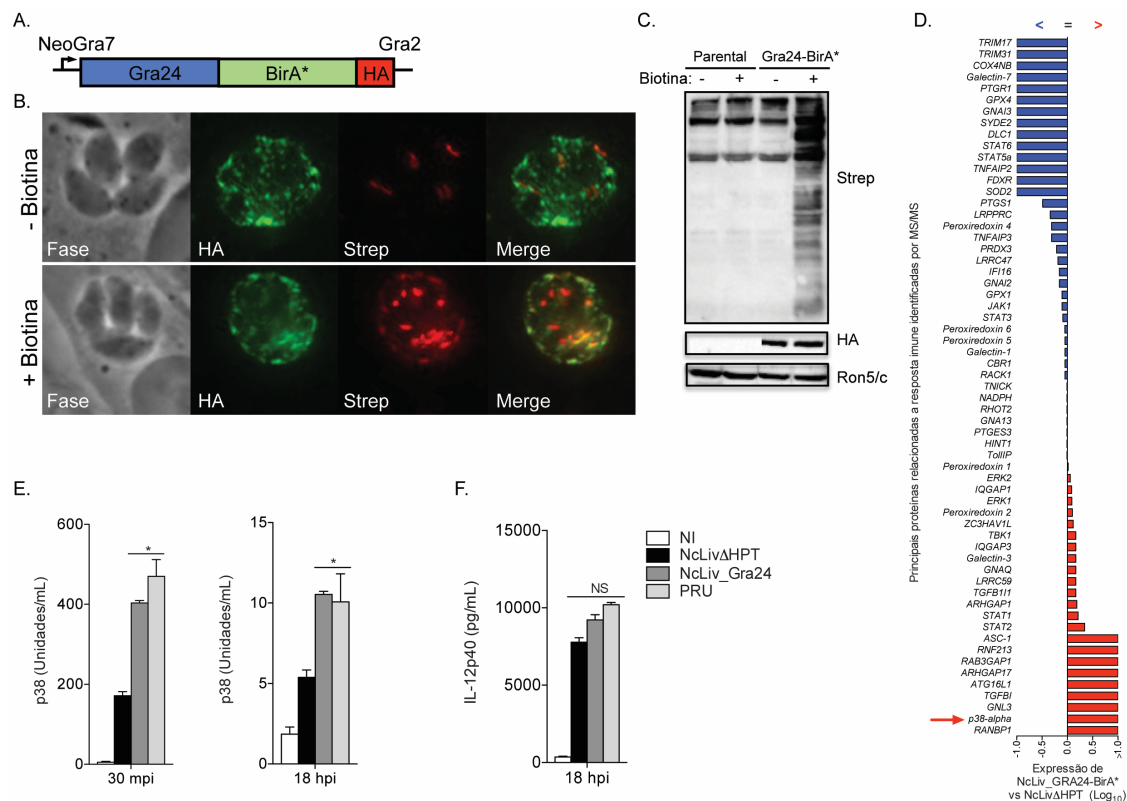
*gondii* das cepas tipo I e III. Especificamente, foi analisado se NcLiv $\Delta$ HPT e NcLiv-Rop16 seriam capazes de induzir a fosforilação de STAT3 em fibroblastos. Para tal, foram utilizados anticorpos específicos para as formas fosforilada de STAT3 (forma ativa) em ensaios de IFA e WB. Ambos os métodos revelaram que, após 18 horas de infecção, há a ativação de STAT3 em células HFF infectadas com RH $\Delta$ HPT e NcLiv\_Rop16. Entretanto, a fosforilação de STAT3 não foi detectada por ambos os métodos nas células infectadas por NcLiv $\Delta$ HPT (Figura 21A e 21B). Uma vez que a função biológica primária de Rop16 foi preservada no parasito *N. caninum* transgênico, em seguida, foram conduzidos experimentos com a intenção de se observar se a ativação da via de STAT3 comprometeria a produção de IL-12p40 em BMDMs infectados, conforme descrição prévia em *T. gondii* (BUTCHER et al., 2011). Após 18 horas de infecção, observou-se que taquizoítos de *N. caninum* expressando Rop16 induzem uma redução significativa dos níveis de IL-12p40, em comparação com os macrófagos infectados com a linhagem parental (NcLiv $\Delta$ HPT). A fim de se eliminar possíveis ressalvas sobre a diferenciação da medula óssea, foi realizado o mesmo layout experimental com células de baço de camundongo naïve. Novamente, foi observado uma diminuição acentuada na produção de IL-12p40 em células infectadas com NcLiv\_Rop16 (Figura 21C). Portanto, os fenótipos biológicos induzidos pelas proteínas heterólogas expressas em *N. caninum* foram preservados, levando-nos assim a concluir que *N. caninum* pode ser utilizado como uma plataforma para estudo de possíveis fatores de virulência de parasitos Apicomplexa.

Dado que *N. caninum* expressando Rop16 induz a ativação de STAT3 e modula a produção de IL-12p40, foi investigado o papel deste fator de virulência na via do inflamassoma, uma vez que tem sido reportado a participação de STAT3 na ativação do receptor NLRP3 e na produção da citocina IL-1 $\beta$  (SAMAVATI et al., 2009; ZUURBIER et al., 2012).

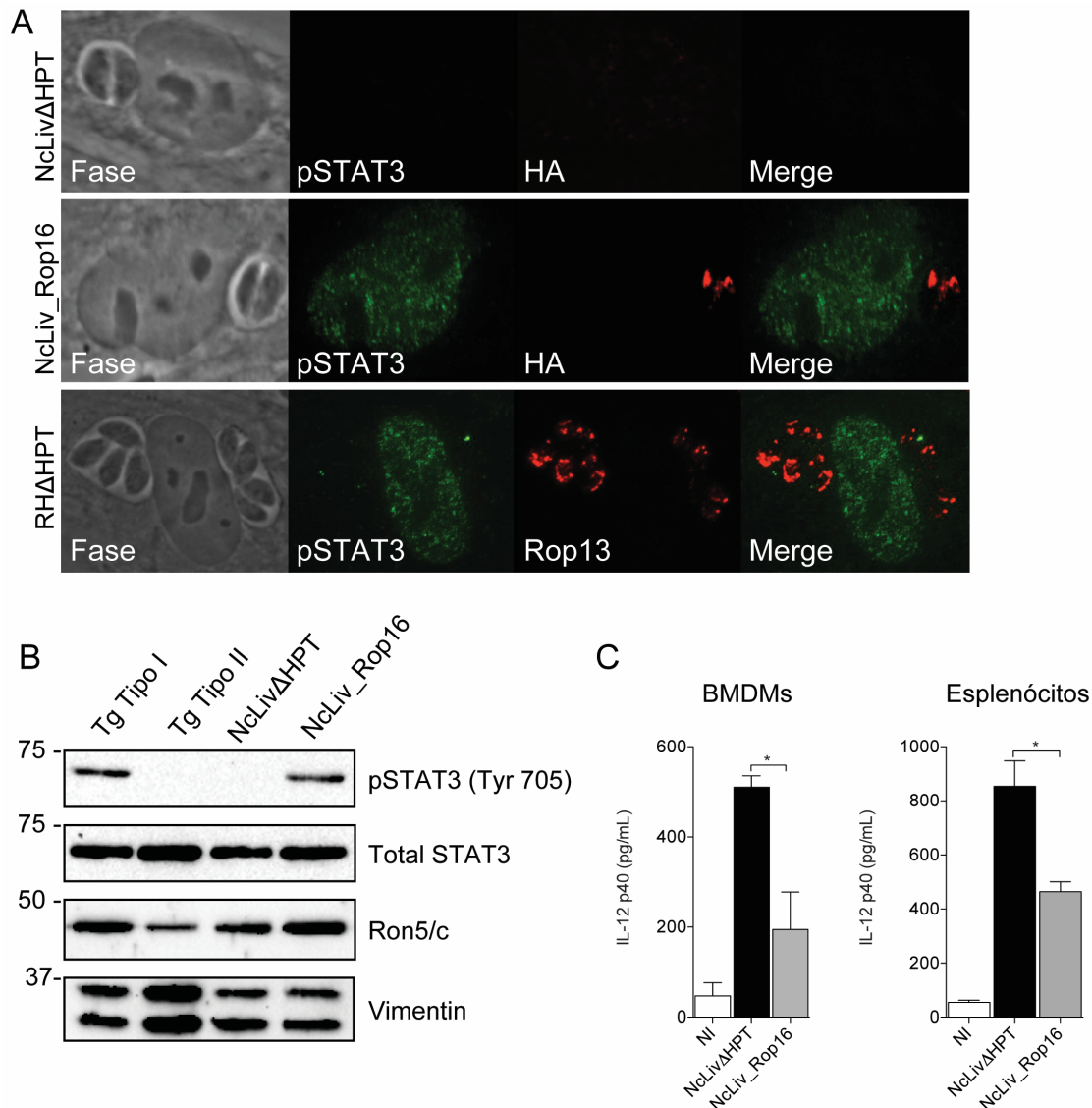


**Figura 19. Expressão de Gra15-BirA\* em *N. caninum* induz a ativação específica do fator de transcrição NF-κB e um aumento na produção de IL-12p40.** (A) Diagrama do plasmídeo linear com o cassette que codifica Gra15-BirA\* ligado ao tag de HA na região carboxi-terminal, dirigido pelo promotor Gra7 de *N. caninum*; (B) IFA de *N. caninum* expressando Gra15-BirA\*, cultivado por 48 horas com ou sem biotina. Gra15-BirA\* se localiza no vacúolo parasitóforo e torna biotiniladas as proteínas próximas ou de interação direta. Proteínas biotiniladas endogenamente no apicoplasto são detectáveis como um *background*, mesmo na ausência de biotina. Verde: anticorpo anti- HA de camundongo, vermelho: estreptavidina-Alexa 488. Ampliação da imagem: 63x; (C) WB revelado com estreptoavidina-HRPO, comparando o perfil de proteínas biotiniladas a partir do lisado total de parasitos parentais e Gra15-BirA\*, na presença ou ausência de meio de cultura enriquecido com biotina; (D) figura representativa mostrando o envolvimento de proteínas da via NF-κB mediante a infecção por NcLiv\_Gra15-BirA\*, em comparação com NcLivΔHPT, elaborado por meio de espectrometria de massa de proteínas biotiniladas, analisados por software dedicado (Pathway Studio, Elsevier, <https://www.elsevier.com/solutions/pathway-studio-biological-research>). Escala de intensidade: azul: redução da expressão da proteína, vermelho: maior expressão da proteína; (E) Produção diferencial de IL-12p40 em

BMDMs infectados com NcLiv\_Gra15. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM dos níveis de citocinas em relação à curva padrão (\*P < 0,05; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).



**Figura 20. Expressão de Gra24-BirA\* em *N. caninum* induz a ativação da MAPK p38.** (A) Diagrama do plasmídeo linear com o cassete que codifica Gra24-BirA\* ligado ao tag de HA na região carboxi-terminal, dirigido pelo promotor Gra7 de *N. caninum*; (B) IFA de *N. caninum* expressando Gra24-BirA\*, cultivado por 48 horas com ou sem biotina. Gra24-BirA\* se localiza no vacúolo parasitífero e torna biotiniladas as proteínas próximas ou de interação direta. Proteínas biotiniladas endogenamente no apicoplasto são detectáveis como um *background*, mesmo na ausência de biotina. Verde: anticorpo anti- HA de camundongo, vermelho: estreptavidina-Alexa 488. Ampliação da imagem: 63x; (C) WB revelado com estreptoavidina-HRPO, comparando o perfil de proteínas biotiniladas a partir do lisado total de parasitos parentais e Gra24-BirA\*, na presença ou ausência de meio de cultura enriquecido com biotina; (D) proteínas biotiniladas foram identificadas por espectrometria de massa, e as principais proteínas relacionados as vias de sinalização conhecidas foram apresentadas como NcLiv\_GRA24-BirA\* em relação a linhagem parental (NcLivΔHPT). Escala de intensidade: azul: redução da expressão da proteína, vermelho: maior expressão da proteína; (E) BMDMs foram infectados com taquizoítos *N. caninum* e *T. gondii* (NcLivΔHPT, NcLiv\_GRA24, PRU; MOI 1). Após 30 minutos ou 18 horas de infecção, as células foram lisadas e submetidas a análise da fosforilação de p38 por CBA. Os resultados foram expressos em unidades / mL, em relação a curva padrão; \* Indica diferença estatística significativa entre células infectadas por NcLiv\_GRA24 ou PRU, e NcLivΔHPT; (F) Produção diferencial de IL-12p40 em BMDMs infectados. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM dos níveis de citocinas em relação à curva padrão (\*P < 0,05; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).

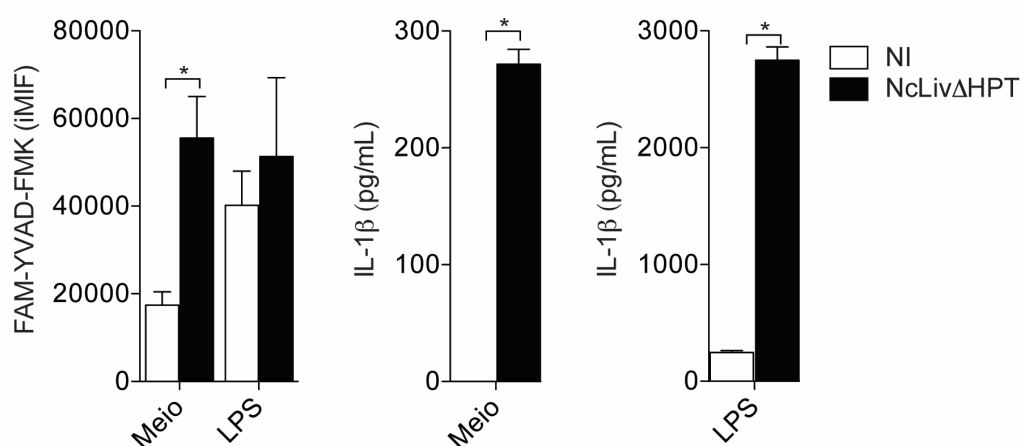


**Figura 21. Rop16 induz a ativação específica de STAT3 e uma redução na produção de IL-12p40.** (A) Análise por imunofluorescência da fosforilação de STAT3 dependente de Rop16. HFFs foram infectados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* (tipo I), NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv\_Rop16 (MOI 1) durante 18 horas, fixadas e incubadas com anticorpos anti-HA, Rop13 ou as formas fosforiladas de STAT3 (Tyr 705). Verde: anticorpo anti-STAT3 de camundongo; vermelho: anticorpo anti-Rop13 ou anti-HA de coelho. Ampliação da imagem: 63x; (B) análise por Western blotting da fosforilação de STAT3 dependente de Rop16. HFFs foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* tipo I, tipo II, NcLiv $\Delta$ HPT ou NcLiv\_Rop16. Após 18 horas de infecção, as células foram lisadas e analisadas por WB. Vimentina (específico da célula do hospedeiro) e Ron5/c (específico do parasito) são mostrados como controles; (C) sobrenadante de BMDMs e esplenócitos infectados com NcLiv $\Delta$ HPT ou *N. caninum* expressando Rop16 de *T. gondii* tipo I (MOI 1) por 18 horas foi coletado para quantificação dos níveis de IL-12p40 por ELISA. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM dos níveis de citocinas em relação à curva padrão (\* $P < 0,05$ ; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).



### 5.8 *N. caninum* é capaz de induzir ativação do inflamassoma

A habilidade de parasitos do gênero *Neospora* em ativar o complexo do inflamassoma permanece desconhecida até o momento. Neste contexto, primeiramente foi avaliado se *N. caninum* seria capaz de ativar as vias de sinalização que culminam na ativação endógena da enzima caspase-1 em macrófagos. Com tal intenção, BMDMs naïve e primados com lipopolissacarídeo (LPS) foram infectados com taquizoítos da linhagem NcLivΔHPT, sendo a ativação de caspase-1 mensurado com uma sonda fluorescente (FAM-YVAD-FMK) que se liga com alta afinidade à forma ativa da caspase-1 (SMOLEWSKI et al., 2001; ZAMBONI et al., 2006). Foi observado que *N. caninum*, induz a ativação de caspase-1 em macrófagos de camundongos C57BL/6 mesmo quando as células não foram previamente primadas com LPS (Figura 22A). Em sequência, foi avaliado a secreção da forma ativa da citocina IL-1 $\beta$ , processo esse dependente da ativação de caspase-1. Foi visto que ambos BMDMs pré-tratados com LPS ou naïve produziram quantidades significantes de IL-1 $\beta$  em resposta à infecção por *N. caninum* de forma dose dependente (Figura 22B). Portanto, *N. caninum* induz a ativação do inflamassoma, não sendo necessário primar a célula antes da infecção, como um estímulo para o primeiro sinal de ativação desta via.



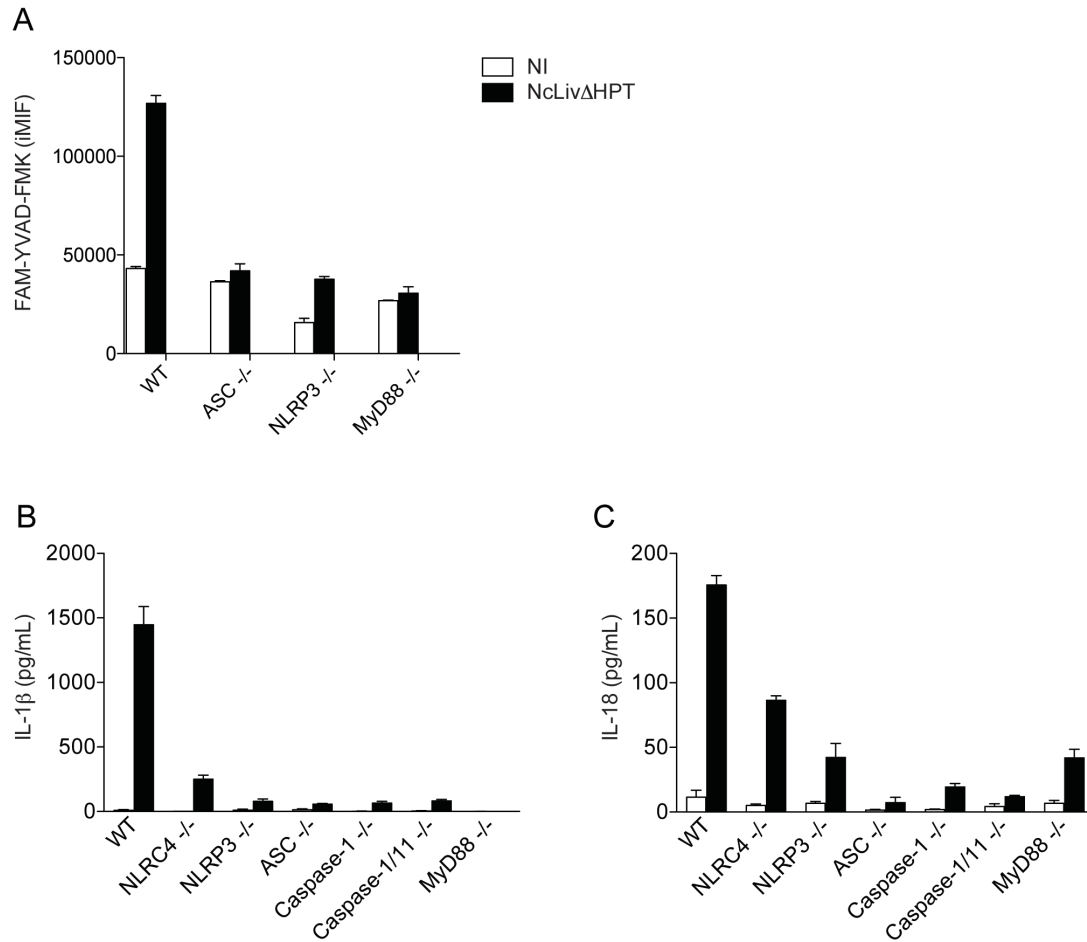
**Figura 22. *N. caninum* induz ativação de caspase-1 e produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos.** BMDMs naïve ou previamente estimulados com LPS (1 $\mu$ g/mL) por 4 horas, e infectados por 18 horas com taquizoítos de *N. caninum* (NcLivΔHPT, MOI 0,5:1). (A) BMDMs infectados foram incubados com a sonda flurescente FAM-YVAD-FMK por 30 minutos, e a atividade de caspase-1 mensurada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como iMIF (% de células positivas X a intensidade média de fluorescência da população); (B) sobrenadante de macrófagos infectados foram coletados para quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$  por ELISA. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM (\*P < 0,05; teste *t* de student).

### 5.9 A ativação do inflamassoma em resposta à infecção por *N. caninum* é dependente de MyD88, NLRP3, ASC e Caspase-1

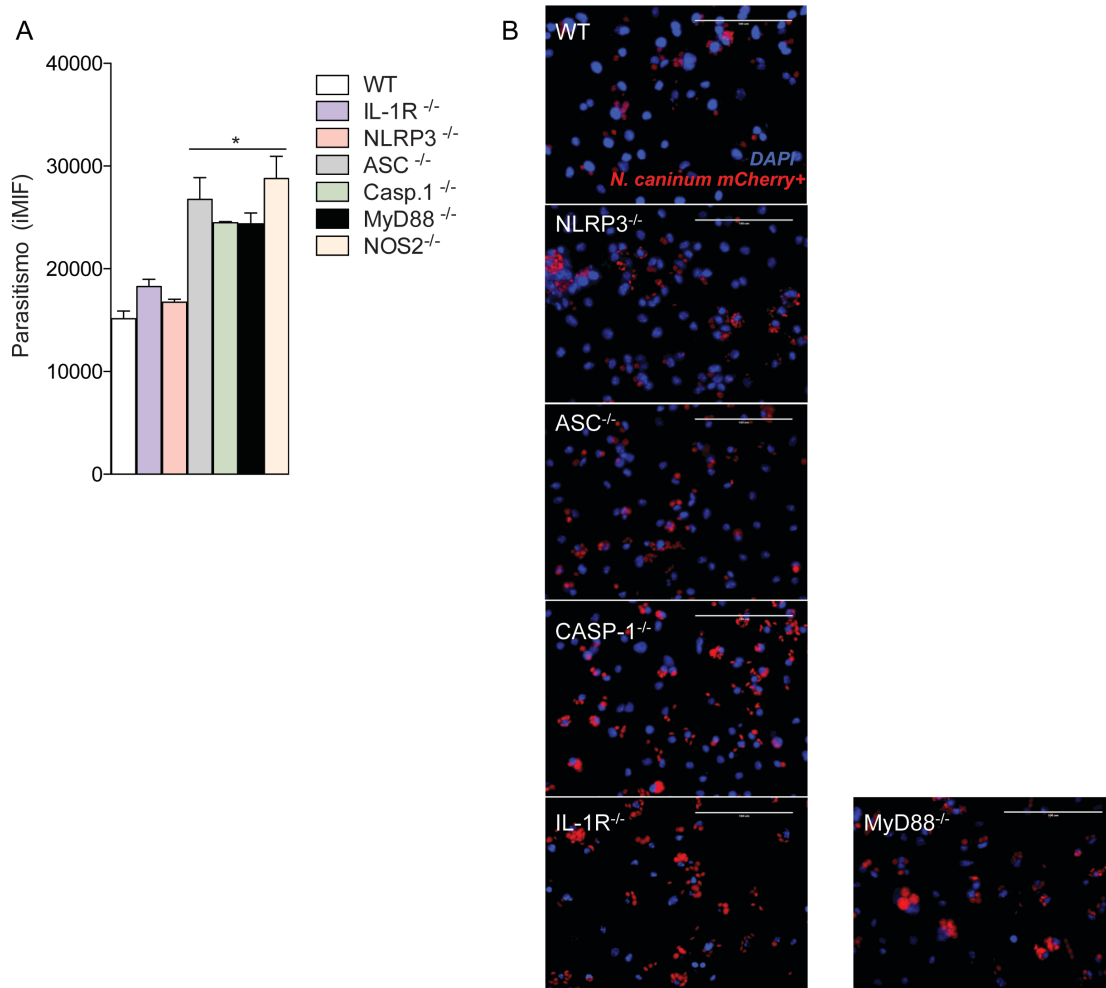
A ativação do inflamassoma pode ocorrer por diversas vias. Assim, para determinar qual via central é responsável pela ativação do inflamassoma em resposta à *N. caninum*, foi realizado experimentos com BMDMs deficientes em importantes componentes do inflamassoma. Através da incorporação da sonda FAM-YVAD, foi demonstrado que BMDMs deficientes para NLRP3 e NLRC4 ou para proteínas adaptadoras MyD88, ASC, caspase-1 e caspase1/11, falharam em induzir a ativação de caspase-1 (Figura 23A) e secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 após infecção com NcLiv $\Delta$ HPT (Figura 23B).

O próximo objetivo foi avaliar se estas moléculas desempenham um papel no controle da replicação de *N. caninum* in vitro. Para isso, foi avaliado a replicação de taquizoítos de *N. caninum* em macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 ou deficientes para componentes do inflamassoma. Além disso, utilizamos BMDMs de camundongos Nos2<sup>-/-</sup>, uma vez que a óxido nítrico sintase induzível (NOS2) é a principal enzima responsável pela produção de NO e é essencial para a restrição do crescimento de parasitos do filo Apicomplexa, sendo que este mostrou-se essencial no controle da infecção por *Neospora* (Figura 24A). A replicação do parasito in vitro foi avaliado por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência em BMDMs infectados com *N. caninum* expressando constitutivamente mCherry (NcLiv-mCherry), MOI 0,5, por 18 horas de infecção, sendo determinada a média da intensidade de fluorescência integrada (iMIF) de BMDMs com Nc-mCherry+. Analisando os resultados, foi observado um aumento significativo da carga parasitária nos BMDMs MyD88<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e Caspase-1<sup>-/-</sup>, quando comparadas àquelas encontradas em BMDMs de WT (*wild type*), sendo este incremento no parasitismo similar àquele observado em BMDMs de camundongos NOS2<sup>-/-</sup>, como demonstrado em iMIFs de BMDMs mCherry+ por citometria de fluxo (Figura 24A). A análise de microscopia de fluorescência confirmou os resultados observados anteriormente, onde BMDMs de camundongos MyD88<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e Casp-1<sup>-/-</sup> apresentaram maior quantidade de parasitos intracelulares, quando comparados com BMDMs de WT. No entanto, diferentemente do observado pelo ensaio de citometria, foi possível observar que macrófagos deficientes para NLRP3<sup>-/-</sup> e IL-1R<sup>-/-</sup> também apresentaram um aumento do parasitismo, acompanhado de intensa lise celular (Figura 24B). Portanto, o inflamassoma é ativado em resposta à infecção por

*Neospora*, e as proteínas inatas MyD88, NLRP3, ASC, Caspase-1 e IL-1R são cruciais na restrição da multiplicação do parasito *N. caninum* em macrófagos.



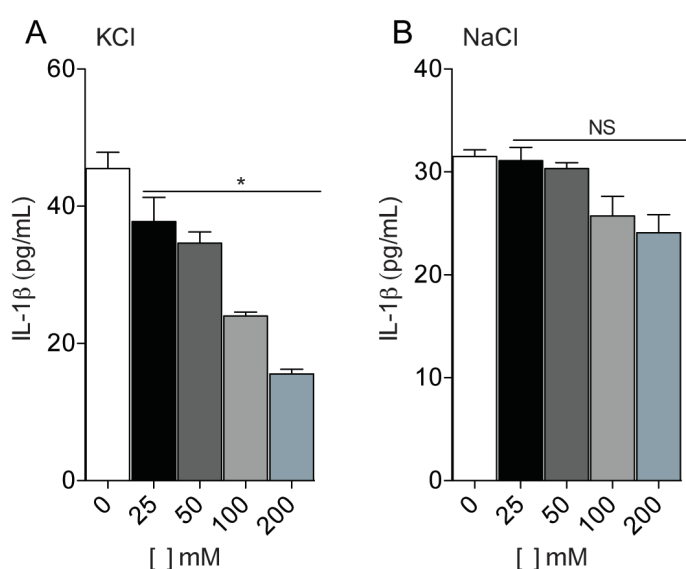
**Figura 23. NLRP3, ASC, Caspase-1 e MyD88 são requeridos para ativação do inflamassoma em resposta à infecção por *N. caninum*.** A atividade de caspase-1 foi mensurada em BMDMs naïve de camundongos WT (*Wild type*) e deficientes para NLRC4, NLRP3, ASC, Caspase-1, Caspase-1/11 e MyD88 foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* (NcLivΔHPT; MOI 0,5:1) por 18 horas. (A) BMDMs infectados por 18 horas foram incubados com a sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK por 30 minutos, e a atividade de caspase-1 mensurada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como iMIF (% de células positivas X a intensidade média de fluorescência da população); (B) sobrenadante de macrófagos infectados em diferentes MOIs foram coletados para quantificação dos níveis de IL-1β e IL-18 (C) por ELISA. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média ± SEM (\*P < 0,05; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).



**Figura 24. NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1R e MyD88 são requeridos para restrição da replicação de *N. caninum*.** O parasitismo celular foi quantificado e detectado em BMDMs naïve de camundongos WT (*Wild type*) e deficientes para NLRP3, ASC, Caspase-1, Caspase-1/11, IL-1R, MyD88 ou NOS2 infectados com taquizoítos de *N. caninum* expressando mCherry (NcLiv\_mCherry; MOI 0,5:1) por 18 horas por meio de (A) citometria de fluxo e (B) microscópio de fluorescência. Ampliação do microscópio de 40x. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM (\* $P < 0,05$  em relação ao grupo WT; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).

### 5.10 A ativação do inflamassoma por *N. caninum* é dependente do efluxo de potássio

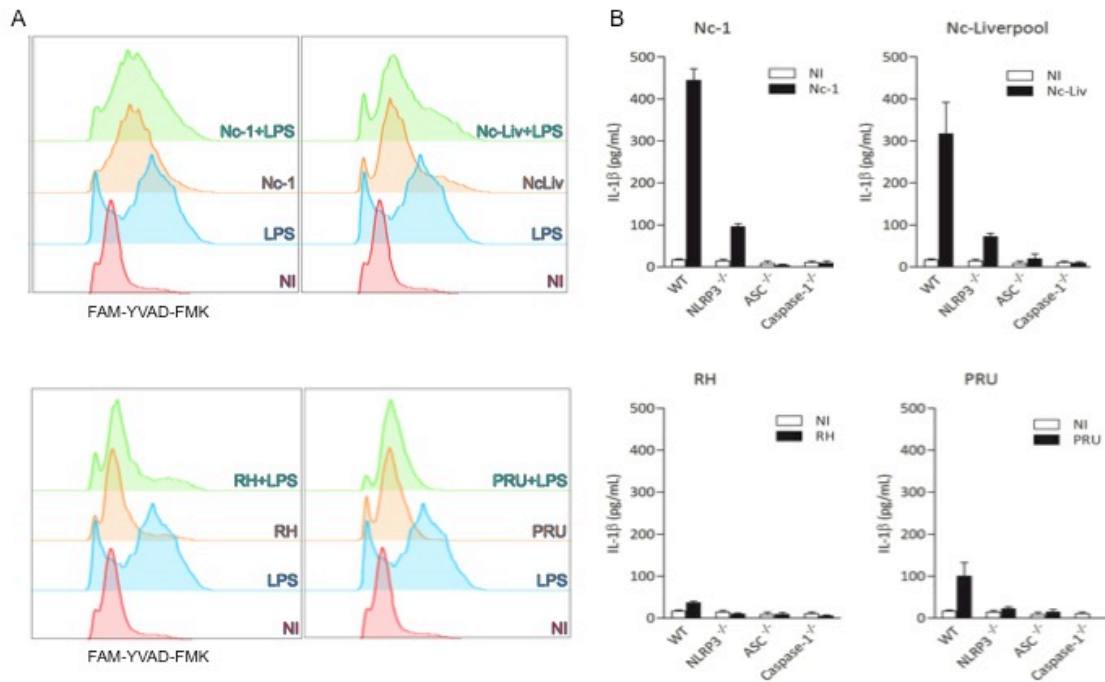
Conforme anteriormente descrito, o desbalanço iônico (efluxo de K<sup>+</sup>) é crítico para a ativação do inflamassoma NLRP3. Para elucidar os mecanismos responsáveis pela ativação do inflamassoma em resposta à infecção por *N. caninum*, foi inicialmente investigado se a saturação extracelular de potássio ou sódio interferiria na ativação de caspase-1 durante a infecção de macrófagos com *N. caninum*. Através da detecção da secreção de IL-1 $\beta$  como medida indireta da ativação de caspase-1, observamos que ativação de caspase-1 induzida por *N. caninum* foi inibida pela adição de KCl, de forma dose dependente (Figura 25A). No entanto, a adição de NaCl não alterou os níveis IL-1 $\beta$ , conseqüentemente não interfere na ativação da caspase-1 (Figura 25B).



**Figura 25. Efluxo de potássio é requerido para ativação do inflamassoma por *N. caninum*.** A atividade de caspase-1 foi mensurada em BMDMs naïve tratados por 2 horas com diferentes concentrações de KCl (A) e NaCl (B) e posteriormente infectados com taquizoítos de *N. caninum* (NcLiv $\Delta$ HPT, MOI 0,5:1). Após 18 h de infecção, a liberação de IL-1 $\beta$  foi analisada no sobrenadante por ELISA. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 (ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo) comparado com não tratado.

### **5.11 *T. gondii* não possui capacidade semelhante à de *N. caninum* em ativar o inflamassoma**

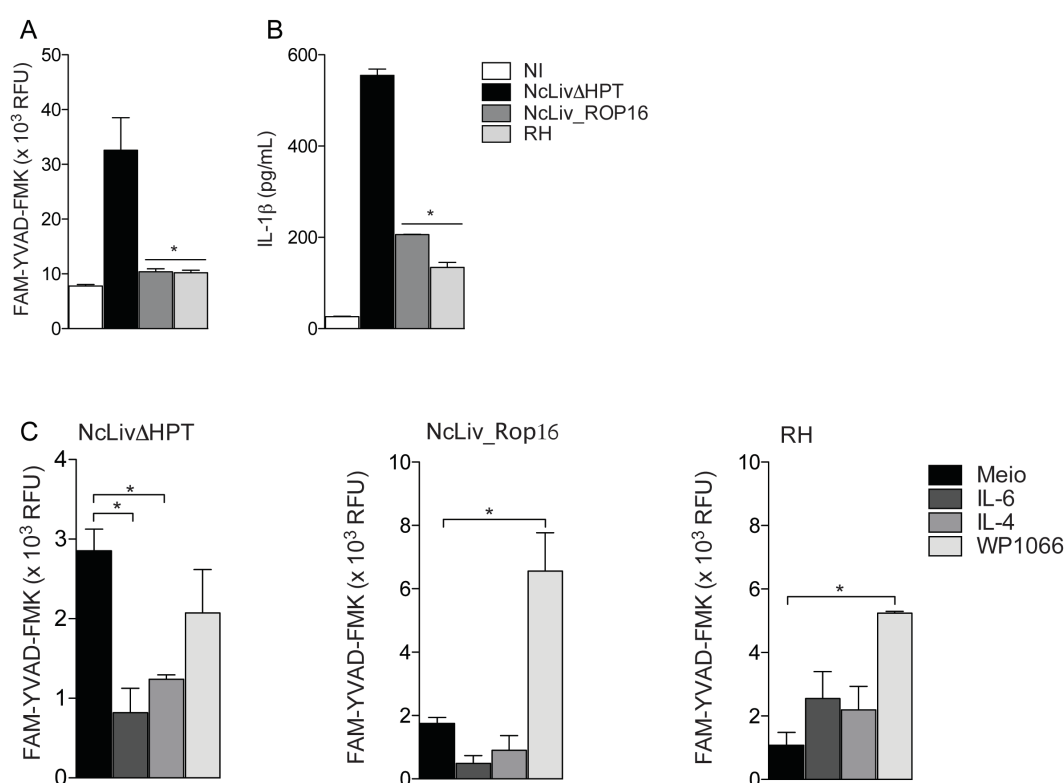
Visto que a infecção por *N. caninum* da cepa NcLiv não necessita de um primeiro sinal exógeno para ativação do inflamassoma, ou seja, primeiro induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias inativas (pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18), e em segundo ativando caspase-1 para atuar na formação de citocinas ativas (IL-1 $\beta$  e IL-18), foi verificado a capacidade de diferentes cepas de *T. gondii* e *N. caninum* em ativar o inflamassoma. Para isso, BMDMs primados ou não com LPS foram infectados com taquizoítos da cepa tipo I (RH), tipo II (PRU) de *T. gondii* e com a cepa Nc-1 ou NcLiv de *N. caninum*, e então a ativação de caspase-1 e os níveis IL-1 $\beta$  foram mensurados por FAM-YVAD e ELISA, respectivamente. Foi observado que Nc-1 teve o mesmo perfil de resposta observado para NcLiv (Figura 26A). No entanto, diferentemente do observado pelas cepas de *Neospora*, *T. gondii* foi incapaz de ativar o inflamassoma em BMDMs não primados. Como observado no histograma representativo, cepas RH e PRU de *T. gondii* somente ativam caspase-1 em macrófagos primados com LPS (Figura 26A), e consequentemente apresentaram uma diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  em BMDMs naïve, em relação com os infectados com as cepas de *Neospora* (Figura 26B). Adicionalmente, confirmou-se que a via NLRP3-ASC-Caspase-1 como uma via crucial para ativação do inflamassoma em resposta à *N. caninum*.



**Figura 26.** Ativação diferencial do inflamassoma induzido por *N. caninum* e *T. gondii*. (A) Atividade de caspase-1 mensurada em BMDMs incubados com a sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK, durante 30 minutos, por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos por histogramas verde, rosa, azul e vermelho que representam a marcação de macrófagos primados e infectados (LPS e Nc-1, NcLiv, RH ou PRU), só infectados (Nc-1, NcLiv, RH ou PRU), primados (LPS) e não infectados (NI), respectivamente; (B) sobrenadante de BMDMs naïve infectados com cepas Nc-1 ou NcLiv de *N. caninum* e cepas de *T. gondii* tipo I (RH) ou tipo II (PRU), MOI 0,5:1, incubados por 18 horas, foram coletados para quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$  por ELISA. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM (\*P < 0,05; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).

### 5.12 *N. caninum* expressando proteínas de *T. gondii* tipo I (Rop16) inibe a ativação do inflamassoma

Para determinar se Rop16 seria uma das proteínas de *T. gondii* responsável pelo bloqueio da ativação do inflamassoma, através da ativação de STAT3 sabidamente induzido por este fator de virulência, foram realizados experimentos com BMDMs naïve infectados com NcLiv $\Delta$ HPT, NcLiv\_Rop16 ou RH, para detecção da ativação de caspase-1 e produção de IL-1 $\beta$ . Analisando os resultados, foi observado que *N. caninum* expressando Rop16 (NcLiv\_Rop16) apresentou fenótipo semelhante àquele induzido por RH, falhando em induzir a ativação de caspase-1 (Figura 27A) e comprometendo a secreção de IL-1 $\beta$  (Figura 27B). Adicionalmente, observamos que efeitos similares na inibição da ativação de caspase-1 ocorreram em BMDMs tratados com agonistas de STAT3 (IL-6) e/ou STAT6 (IL-4), por 18 horas, e infectados com NcLiv $\Delta$ HPT (Figura 27C). Em contrapartida, o efeito da inativação de caspase-1 induzida por NcLiv\_Rop16 e RH foi revertido em células tratadas com antagonista de STAT3 (WP1066) (Figura 27C). Neste sentido, Rop16 é um dos fatores de virulência de *T. gondii* responsável pelo bloqueio da ativação do inflamassoma, de modo dependente a ativação de STAT3.



**Figura 27. Rop16 de *T. gondii* tipo I reduz a ativação do inflamassoma de modo STAT3/6-dependente.** A atividade de caspase-1 foi mensurada em BMDMs naïve de camundongos WT (*Wild type*) infectados com MOI 0,5:1 de taquizoítos de



NcLiv $\Delta$ HPT, NcLiv\_Rop16, RH ou não infectados (NI) por 18 horas. (A) BMDMs infectados por 18 horas foram incubados com a sonda flurescente FAM-YVAD-FMK por 30 minutos e a atividade de caspase-1 mensurada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como iMIF (% de células positivas X a intensidade média de fluorescência da população); (B) sobrenadante de macrófagos infectados foram coletados para quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$  por ELISA; (C) BMDMs tratados com 10ng/mL do agonistas de STAT3 (IL-6) e/ou STAT6 (IL-4), ou com 1 $\mu$ M do antagonista de STAT3 (WP1066) ou não tratados (meio) por 18 horas foram infectados com diferentes parasitos (NcLiv $\Delta$ HPT, NcLiv\_Rop16, RH ou NI) por 18 horas e marcados com a sonda FAM-YVAD-FMK para quantificação de caspase-1. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, indicam média  $\pm$  SEM (\*P < 0,05; ANOVA e comparação de Bonferroni pós-teste múltiplo).



## 6 DISCUSSÃO

*N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, estreitamente relacionado ao protozoário *Toxoplasma gondii*, e é reconhecido como importante causador de doenças neuromusculares em cães e aborto em bovinos em todo o mundo, o que representa perdas econômicas significativas nas indústrias de corte e de leite (CRAEYE et al., 2011; GOODSWEN et al., 2015). O uso de *N. caninum* como um sistema heterólogo para a expressão de proteínas de *T. gondii* foi aqui explorado, e pode revelar-se uma ferramenta valiosa para a identificação de fatores diferenciais de virulência, e como um possível vetor de vacina viva para ambos os parasitos. O presente estudo proporciona técnicas simples e rápidas para manipulação gênica em *N. caninum* com base em um sistema específico para *Neospora*, que foi capaz de inserir genes alvo com eficiência, pela alta frequência de parasitos transgênicos estáveis que facilitam a clonagem e sua manipulação. Atualmente, há poucos trabalhos de edição de genoma em *N. caninum* com uma prevalência de métodos de engenharia genética para *N. caninum* utilizando vetores específicos para *T. gondii*, ou seja, plasmídeos com promotores de *T. gondii* para direcionar o alvo de interesse (HOWE e SIBLEY, 1997; ZHANG et al., 2010; LEI et al., 2014; PEREIRA e YATSUDA, 2014, PEREIRA e BARONI, YATSUDA, 2014).

Para obtenção de taquizoítos de *N. caninum* transgênicos, expressando proteínas heterólogas ou depletados geneticamente para Rop9, foi utilizado como linhagem parental o parasito depletado para o marcador de seleção HPT. Taquizoítos de *Neospora* deficientes na atividade de HPT podem ser selecionados negativamente na presença da droga 6-tioxantina (6-TX), enquanto as linhagens que expressam a atividade do marcador de seleção podem ser selecionadas positivamente com ácido micofenólico e xantina (DONALD et al., 1996). Este método de seleção é comumente utilizado em *T. gondii*, pois a inserção do marcador tem se mostrado seguro, confiável e de baixo custo para selecionar alvos após modificações genéticas, facilitando a manipulação da população transfectada (DONALD et al., 1996; HOWE e SIBLEY, 1997; ZHANG et al., 2010).

Dessa forma, a depleção do gene HPT fornece um marcador de seleção eficiente para estudos de genética molecular em parasitos do filo Apicomplexa. Outros estudos utilizaram diferentes drogas de resistência em *N. caninum* da cepa Nc-1, como o uso de piretamina quando deletado o gene Diidrofolato redutase - Timidilato sintase (DHFR-TS) para obter taquizoítos de *N. caninum* expressando a proteína Rop18 de *T. gondii* tipo I ou Lac-Z - marcador de diversos modelos celulares, que pode atuar como

indicativo de expressão gênica e localização de células, pela ação da enzima  $\beta$ -galactosidase que cliva o seu substrato e pode ser mensurado por ensaios colorimétricos (LEI et al., 2014; PEREIRA, BARONI e YATSUDA, 2014), bem como o uso de clorofenicol, mediante depletação do gene cloranfenicol acetiltransferase (CAT) para expressão de Lac-Z (PEREIRA e YATSUDA, 2014). Entretanto, o uso do HPT como marcador de seleção negativa indica uma vantagem no delineamento experimental para modificações genéticas, quando comparados com vetores baseados em CAT e DHFR (DONALD et al., 1996). Com base nisso, antes de utilizar o parasito NcLiv $\Delta$ HPT como linhagem parental para futuras modificações genéticas em *N. caninum*, verificamos se a deleção do gene HPT no parasito interferiria na sua virulência e na resposta imune do hospedeiro. Mediante a ausência de fenótipos derivados da deleção do gene HPT, ou seja, não foram detectadas diferenças no perfil de produção de citocinas e mortalidade de camundongos desafiados com as linhagens de *N. caninum* deficientes em HPT e complementada pelo gene, os experimentos foram continuados para consequentes manipulações gênicas do parasito.

O presente trabalho buscou desenvolver *N. caninum* depletado geneticamente para Rop9, visto que os antígenos de ROP são possíveis moléculas-chave na modificação do nicho intracelular, um dos principais fatores de virulência (DLUGONSKA, 2008), e por Rop9 ter sido identificada como uma possível proteína efetora, que tem como alvo a célula hospedeira podendo ser uma determinante de virulência (REICHMANN et al., 2002; CHEN et al., 2014).

A inativação do gene de interesse através de recombinação homóloga ainda é dificultada por diversos fatores, como a necessidade de muitos clones devido a baixa eficiência e a necessidade de uma seleção demorada e trabalhosa (CAPECCHI, 2005, GAJ et al., 2013; ANDENMATTEN et al., 2013). No entanto, uma nova abordagem tem surgido, que permite manipular qualquer gene de uma variada gama de tipos de células e organismos, que se baseia na edição do genoma utilizando uma endonuclease. O sistema CRISPR-Cas surgiu recentemente como uma alternativa fácil e eficiente para induzir alteração no gene alvo (GAJ et al., 2013; SIDIK et al., 2014; SHEN et al., 2014).

Neste contexto, foi utilizado o vetor CRISPR-Cas9 na deleção de Rop9 em *N. caninum*. Os parasitos transfectados com o plasmídeo CRISPR-Cas9 de *T. gondii* (pU6-Universal) apesar de expressarem Cas9 no núcleo não apresentaram deleção do alvo. Ainda que os dois protozoários apresentem semelhanças morfológicas e

biológicas, um estudo comparativo entre o genoma de *T. gondii* e *N. caninum* mostraram que os dois parasitos possuem alguns genes drasticamente alterados em sua expressão e funcionalidade (REID et al., 2012). Portanto, o próximo passo foi substituir o promotor U6 de *T. gondii* pelo de *N. caninum* na tentativa de melhor direcionar o alvo a ser depletado. Contudo, não houve diferença no resultado obtido com relação ao experimento anterior, apesar que o plasmídeo específico para *N. caninum* foi eficiente na depleção de SAG1 em *T. gondii*. Em seguida, o vetor pU6-Universal foi modificado inserindo Ku80, que tem como papel primário a reparação do DNA, mas também têm sido implicado numa variedade de outras atividades celulares, tais como manutenção do telômero, supressão tumoral, regulação na transcrição de genes, e apoptose (HUYNH e CARRUTHERS, 2009). Surpreendentemente, diferente dos dados reportados com *T. gondii*, que a deleção de Ku80 contribui na melhora da sua manipulação gênica (FOX et al., 2009; ROMMEREIM et al., 2013), quando Ku80 foi inserido em *N. caninum* para a depleção de Rop9, se obteve os parasitos transgênicos com uma frequência de 30% da população transfectada. Vários estudos têm mostrado que a ausência de Ku80 contribuiu para um aumento da taxa de mutação, instabilidade cromossômica, e aumento da carcinogênese, enquanto outros observaram uma diminuição na frequência de mutação e rearranjos cromossômicos. Portanto, *N. caninum* diferencialmente à *T. gondii* necessita da presença de Ku80 para obtenção de parasitos depletados geneticamente pelo método CRISPR-Cas9. Questões fundamentais ainda precisam ser respondidas a respeito de como e a razão deste parasito necessitar de Ku80 para direcionar de forma eficiente a deleção da proteína alvo.

Os avanços genéticos na tentativa de desvendar a biologia do parasito mais rapidamente levam ao desenvolvimento de novos tratamentos para doenças parasitárias (GOODSWEN, et al., 2013, 2015; DE KONING-WARD et al. 2015). Dessa forma, foi avaliado se a deleção de Rop9 em *N. caninum* alteraria os mecanismos de invasão e replicação do parasito quando comparado com a linhagem parental. Nossos resultados mostraram que a depleção de Rop9 em *N. caninum* alterou o crescimento do parasito in vitro. No entanto, não proporcionou uma redução de sua virulência in vivo, em camundongos desafiados por via intraperitoneal. Consequentemente, a roptria Rop9 mostrou-se importante durante a fase inicial de invasão e replicação do parasito, entretanto não se caracterizou como um potencial fator de virulência para *Neospora*.

Para desenvolver *N. caninum* expressando proteínas heterólogas, foi construído plasmídeos com promotores específicos para *Neospora* de forma que estivessem

associados ao perfil de expressão do ciclo celular do inserto. Portanto, foi proposto a utilização de três tipos de proteínas de *N. caninum* para direcionar a inserção do alvo de interesse, sendo a tubulina (NCLIV\_039100) e Gra7 (NCLIV\_021640) presentes durante todo o ciclo celular do parasito, e Rop13 (NCLIV\_055850) transientemente. Para selecionar o plasmídeo mais eficiente para a inserção do alvo, foi realizado a expressão de proteínas fluorescentes GFP e mCherry utilizando plasmídeos contendo promotores específicos do parasito. A transfecção com plasmídeo contendo Rop13 e Gra7 mostraram-se mais eficientes do que a Tubulina, por apresentarem uma alta frequência de parasitos positivos que expressavam GFP ou mCherry, o que contribuiu para uma rápida clonagem da população transfectada. A obtenção destes parasitos fluorescentes demonstraram ser uma ferramenta valiosa na quantificação e detecção de parasitos tanto na fase aguda da infecção (taquizoítos), quanto na fase crônica (cisto). Existem outras formas para detectar e quantificar o parasito, como por marcação com sondas fluorescentes (MOTA et al., 2014) ou por parasitos expressando lac-Z (PEREIRA e YATSUDA et al., 2014, PEREIRA e BARONI, YATSUDA, 2014). No entanto, estes métodos são demorados, há uma perda considerável de taquizoítos viáveis e é detectado somente na forma de taquizoítos.

Devido a eficiência e a estabilidade da utilização de Gra7 e Rop13 como promotores específicos de *N. caninum*, foi proposto a utilização dos mesmos para construção de plasmídeos contendo tag de HA, para facilitar a detecção de proteínas heterólogas expressas em *Neospora*, por meio apenas da utilização de anticorpo específico anti-HA. Proteínas de *Toxoplasma* têm sido apresentadas como componentes chave nas relações parasito-hospedeiro. Um conjunto destas proteínas secretadas e excretadas pelo parasito estão sendo caracterizadas como potentes fatores de virulência que modulam as funções da célula hospedeira como mecanismo de evasão (BUXTON, McALLISTER e DUBBEY, 2002; DONAHOE et al., 2015). As roptrias se destacam por compor a maioria destas proteínas que modulam a resposta imune do hospedeiro a seu favor. Além das roptrias, os grânulos densos também fazem parte destes componentes que são secretados e tem impacto nas funções da célula hospedeira (DUBREMETZ, 2007; ANDENMATTEN et al., 2012). Deste modo, foi sugerido a utilização de *N. caninum* como sistema heterólogo para expressão de proteínas de *T. gondii*, pois o uso de modificações genéticas tem sido um método de escolha para análise genômica funcional e para se obter informações mais detalhadas da função dos genes e o seu fenótipo (s).

Proteínas de *T. gondii* tipo II (Gra15 e Gra24) e do tipo I (Rop16 e Rop18) foram expressas em *N. caninum*. A eficácia dos vetores desenvolvidos para inserção dessas proteínas em *Neospora* foi avaliada pela correta expressão e marcação dos insertos no parasito por IFA e WB. Os resultados obtidos demonstraram que os alvos foram corretamente processados e orientados, sendo então os constructos uma ferramenta eficiente para clonagem e obtenção de parasitos transgênicos estáveis, por manterem a sua expressão após várias passagens in vitro e in vivo sem seleção de drogas. Portanto, os plasmídeos desenvolvidos para *N. caninum* podem ser utilizados na sua manipulação gênica para geração de parasitos *knock-in*.

Braun et al. (2013) identificaram Gra24 de *T. gondii* da cepa tipo II como um potente agonista da MAPk p38 no hospedeiro, que esta envolvido na produção da citocina IL-12. Portanto, foi avaliado se *N. caninum* expressando Gra24 seria capaz de manter o mesmo perfil de resposta. Os resultados mostraram que o *N. caninum* expressando Gra24 induziu um aumento na ativação da subunidade p38-alfa, quando comparado com a linhagem parental, porém o aumento na indução da fosforilação de p38 não interferiu no nível de síntese da citocina IL-12. Estudos anteriores relataram a presença de alguns genes de superfície e proteínas secretadas que são conhecidos por controlar a virulência e as interações com o hospedeiro na infecção pelo *T. gondii*, que são alterados no genoma do *Neospora*, com diferenças na expressão e funcionalidade. Dessa forma, houve outro fator presente no *Neospora* que esta envolvido na produção de tal citocina (REID et al, 2012; SILMON e WEISS, 2015; RAMAPRASAD et al, 2015). Portanto, a busca por alvos antigênicos com potencial de ativação p38 em *Neospora* devem ser melhor investigados.

Diversos trabalhos têm também explorado as funções de Gra15 e Rop16, por serem um dos principais fatores de virulência de *T. gondii*, cuja a presença é fundamental na diferença de virulência entre as suas cepas (JENSEN et al., 2013). Estas proteínas efetoras do parasito agem na modulação de vias que regulam a inflamação. Rop16 foi caracterizada por interagir com a via de sinalização STAT do hospedeiro, onde estudos in vitro têm determinado que cepas de *T. gondii* tipo I e III, mas não do tipo II, mantêm a ativação constitutiva de STAT3 e STAT6 que esta intimamente ligado ao nível de síntese da citocina IL-12, que é central para a resposta imune protetora do hospedeiro à infecção por *T. gondii* (YAMAMOTO et al., 2009; BUTCHER et al., 2011; YUAN et al., 2011; JENSEN et al., 2013). Em contraste, Gra15 de cepas do tipo II, mas não do tipo I ou III, ativam o fator de transcrição NF-κB que é composto por

cinco membros: p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB, e c-Rel, e isto foi correlacionado a produção de IL-12 (ROSOWSKI et al., 2011; JENSEN et al., 2013). Jensen et al. (2013) têm mostrado que a expressão de Rop16 juntamente com Gra15 em *T. gondii* promove resistência in vivo, pois infecções por via oral com parasitos transgênicos apresentaram uma redução no número de parasitos intestinais, que por sua vez reduziram a patologia intestinal. No entanto, a expressão de apenas uma das proteínas não conferiu proteção ao hospedeiro. Dessa forma, Rop16 e Gra15 devem atuar diretamente nos mecanismos do hospedeiro que regulam a sobrevivência ou replicação do parasito nas células infectadas. Visto a importância na resposta imune do hospedeiro e o fenótipo marcante destes fatores de virulência, o presente trabalho buscou também avaliar se *N. caninum* expressando Gra15 ou Rop16 são capazes de manter o mesmo fenótipo biológico induzido por estas proteínas.

Primeiramente, foi observado se a expressão destas proteínas em *Neospora* alteraria os mecanismos de invasão e replicação do parasito quando comparado com a linhagem parental. Nossos resultados mostraram que a inserção de Gra15 ou Rop16 em *N. caninum* não alterou o crescimento do parasito in vitro. Adicionalmente, foi verificado que *N. caninum* expressando Gra15 modula alguns membros da via NF- $\kappa$ B, com destaque para a ativação de NF- $\kappa$ B1, e que esta está associada com a produção de IL-12p40. Em relação a Rop16, foi observado que houve fosforilação de STAT3 apenas quando o parasito expressava Rop16, e que esta está ligada a baixa produção de IL-12p40 in vitro. Portanto, os resultados obtidos corroboram com os dados descritos na literatura, e têm confirmado a utilização do *N. caninum* como um sistema heterólogo para se estudar proteínas de *T. gondii* ou estendidos para outros parasitos do filo Apicomplexa, uma vez que as características biológicas primárias das proteínas-alvo em estudo foram preservadas quando expressas em *Neospora*. Além disso, a expressão de Rop16 no parasito proporcionou uma redução de sua virulência in vivo em camundongos desafiados por via intraperitoneal. Davoli-Ferreira et al. (2016) demonstraram que animais deficientes no receptor inato Nod2 em resposta a infecção por *N. caninum* apresentaram uma diminuição da patogênese e uma maior sobrevivência quando comparados com animais WT, pela diminuição da resposta inflamatória. Portanto, acredita-se que o parasito *N. caninum* induz uma exacerbação da resposta inflamatória levando a morte do hospedeiro. Desse modo, Rop16 poderia estar intervindo na síntese de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para um ambiente menos inflamatório levando um aumento da curva de sobrevivência, no entanto, os mecanismos desencadeados



por esta rota devem ser melhor investigados. Além disso, estes parasitos transgênicos poderiam ser estudados como possíveis vetores no desenvolvimento de vacinas vivas.

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm demonstrado a importância da ativação do inflamassoma em resposta a diferentes patógenos, como *T. gondii* (RATHINAM e FITZGERALD, 2016; VANAJA, RATHINAM e FITZGERALD, 2015; CLAY, SUTTERWALA e WILSON, 2014; CIRELLI et al., 2014). Sabe-se que a infecção por *Toxoplasma* modula a resposta desta via que interfere na carga parasitária e na disseminação do parasito, sendo então uma via importante para desencadear uma resposta imune protetora ao parasito (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015; CIRELLI et al., 2014; GORFU et al., 2014). O inflamassoma é usualmente composto por um receptor, adaptador e uma caspase inflamatória. Dentre os receptores envolvidos na ativação desta via, destaca-se o receptor NLRP3 que, através de vias dependentes da molécula adaptadora ASC, ativa caspase-1 levando à produção de mediadores inflamatórios que participam diretamente no controle da infecção provocada por diversos patógenos (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015; KIM, SHIN e NAHM, 2016; STEWART e COOKSON, 2016). Trabalhos têm reportado a participação de STAT3 na ativação do receptor NLRP3 e na produção da citocina IL-1 $\beta$  em resposta a patógenos intracelulares e no desencadeamento de doenças (SAMAVATI et al., 2009; ZUURBIER et al., 2012). Dado que *N. caninum* expressando Rop16 induz a ativação de STAT3, foi, portanto, investigado o papel deste fator de virulência na via do inflamassoma. No entanto, a habilidade de parasitos do gênero *Neospora* em ativar o inflamassoma é desconhecida. Sendo assim, foi necessário elucidar a ativação do inflamassoma em resposta à infecção por parasitos do gênero *Neospora* in vitro, para então compará-los com *Toxoplasma*.

Os resultados mostraram que *N. caninum* é capaz de ativar caspase-1 endógena e induzir secreção de IL-1 $\beta$  em BMDMs naïve, sugerindo a participação dos componentes do inflamassoma na resposta imune inata induzida por este patógeno. A ativação dos NLRs em resposta à *Neospora* foi então confirmada pela ausência da ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$  em BMDMs deficientes para NLRP3, ASC e Caspase-1 e da proteína adaptadora MyD88. Além disso, esse fenômeno foi ainda evidenciado pelo aumento da carga parasitária nestes macrófagos deficientes infectados por *N. caninum*. Portanto, o presente estudo identificou que a ativação do receptor NLRP3 e posterior ativação de caspase-1 é crucial para a secreção de IL-1 $\beta$  durante a infecção por *Neospora*, e uma vez secretada, a citocina IL-1 $\beta$  sinaliza via IL-1R/MyD88 induzindo a

ativação de NF- $\kappa$ B e assim aumentando a expressão de genes pró-inflamatórios, dentre eles NOS2. Esses dados mostram o papel indireto de IL-1R/MyD88 no controle da infecção por *N. caninum* (LIMA-JUNIOR et al., 2013; MORAVEJ et al., 2012). Corroborando com esses achados, foi demonstrado recentemente que a ativação de NLRP3 em resposta à infecção por diferentes parasitos intracelulares também contribui para a produção de IL-1 $\beta$ , de forma dependente à ativação de caspase-1 (LEFEVRE et al., 2013; GOV et al., 2013; GORFU et al., 2014; ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015; STEWART e COOKSON, 2016). Visto que, processos que dependem de uma participação ativa do parasito, tais como desbalanço iônico (efluxo de K<sup>+</sup>) e indução de stress oxidativo são críticos para a ativação do inflamassoma NLRP3 (LIMA-JUNIOR et al., 2013) foi verificado se o fluxo de íons tais como Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> são mecanismos que estariam envolvidos na ativação do inflamassoma em resposta ao *Neospora*. A liberação de IL-1 $\beta$  após a infecção com *N. caninum* foi dependente do efluxo de potássio, demonstrando que a saída de K<sup>+</sup> do interior das células é um mecanismo importante na ativação do inflamassoma induzido por *Neospora*. Estudos adicionais serão necessários para melhor caracterização dessa resposta.

Para que o processo de ativação do inflamassoma ocorra de forma completa, dois sinais são necessários: o primeiro sinal é proveniente da sinalização por PRRs que promove a transcrição de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 (MEYLAN, TSCHOPP e KARIN, 2006), e o segundo sinal consiste no processamento proteolítico desses precursores em suas formas biologicamente ativas via caspase-1, a qual é ativada pelo inflamassoma (KELLER et al., 2008), os sinais são decorrentes do reconhecimento de moléculas microbianas introduzidas por patógenos e/ou fatores endógenos liberados de tecidos em destruição (BROZ e DIXIT, 2016; STEWART e COOKSON, 2016). Nossos resultados mostraram que cepas Nc-1 e NcLiv de *N. caninum* possuem um perfil similar de resposta de ativação dos NLRs em BMDMs naïve, sendo capazes de induzir o primeiro e o segundo sinal para ativação do inflamassoma, no entanto, parasitos das cepas tipo I e tipo II de *Toxoplasma* possuem um perfil de resposta distinto, pois necessitam de estímulo prévio para uma ativação eficiente do inflamassoma em BMDMs. Diferentes trabalhos já haviam demonstrado a necessidade de se primar BMDMs antes da infecção por parasitos apicomplexas para detecção de IL-1 $\beta$  e IL-18 pelo método ELISA, para então se avaliar ativação do inflamassoma em resposta a estes parasitos (GOV et al., 2013; GORFU et al., 2014; CUNHA et al., 2015; LIMA-JUNIOR et al., 2013; CIRELLI

et al., 2014). Adicionalmente, o presente trabalho demonstrou que ambas cepas de *N. caninum* são dependentes de NLRP3, ASC e caspase-1 para induzir a produção IL-1 $\beta$ .

No presente trabalho foi apresentado que Rop16 seria uma das proteínas de *T. gondii* responsável por esse bloqueio na ativação do inflamassoma, dado que *N. caninum* expressando Rop16 tem um perfil de ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$  em BMDMs naïve similar a cepa RH de *T. gondii*. Complementarmente, quando estes macrófagos foram pré-tratados com inibidor de STAT3 (WP1066) houve um aumento significativo da ativação da caspase-1 por estes parasitos. E quando incubados com agonistas de STAT3 e infectados com *N. caninum* estas células apresentaram uma redução considerável dos níveis de caspase-1 ativa. Portanto, a ativação de STAT3 por Rop16 esta intimamente relacionada ao bloqueio da ativação dos NLRs. Dados publicados ressaltam que STAT3 é um dos principais fatores de transcrição de vias inflamatórias, e sua fosforilação modula a ativação de NLRP3 e secreção de citocinas pró-inflamatórias (SAMAVATI et al., 2003; ZUURBIER et al., 2012).

De forma geral, os resultados presentes nesse trabalho evidenciaram que a capacidade de manipulação genética do parasito (por deleção ou inserção de genes) para avaliar a função do gene é central para os avanços de melhor compreensão do patógeno, da interface parasito-hospedeiro, e podem beneficiar-se da riqueza de dados obtidos por genomas, transcriptomas e proteomas, auxiliando na descoberta de possíveis alvos de vacinas e drogas.

*Conclusão*

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo indica que os vetores específicos desenvolvidos para a manipulação do protozoário *N. caninum* melhora a eficiência com que estas manipulações genéticas são realizadas e podem ser aplicadas para se obter linhagens de *N. caninum* transgênico de forma estável e segura. Além disso, o desenvolvimento de ferramentas de genética molecular para *N. caninum* também permitem um melhor conhecimento sobre as diferenças biológicas com outros protozoários. Visto que, *Neospora* pode ser aplicado como um sistema de expressão heteróloga para estudar o processamento e função das proteínas de *T. gondii*, e que pode ser útil para identificar e caracterizar genes envolvidos na patogênese associada com toxoplasmose, contribuiria assim no desenvolvimento de drogas terapêuticas e profiláticas que atuam no controle da toxoplasmose ou neosporose. Através da obtenção de parasitos *N. caninum* transgênicos foi demonstrado que a presença da roptria Rop16 expressos por cepas de *T. gondii* do tipo I implica na inibição do inflamassoma, e a deleção de Rop9 em *N. caninum* leva a uma redução do potencial de replicação parasitária. Por fim, a engenharia genética fornece valiosas abordagens de investigação que podem engrandecer a compreensão sobre patógenos intracelulares e suas interações com a célula hospedeira.

## *Referências Bibliográficas*

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, C.; TANAKA, S.; NISHIMURA, M.; IHARA, F.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y. Role of the chemokine receptor CCR5-dependent host defense system in *Neospora caninum* infections. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 5, 2015.
- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; BASTO, A. P.; MÜLLER, J.; BALMER, V.; MANSER, V.; LEITÃO, A.; HEMPHILL A. N-terminal fusion of a toll-like receptor 2-ligand to a *Neospora caninum* chimeric antigen efficiently modifies the properties of the specific immune response. **Parasitology**, v. 143, p. 606-16, 2016.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Review Immunology**, v. 4, p. 499–511, 2004.
- ALAGANAN, A.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; WANG, Q.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* GRA7 effector increases turnover of immunity-related GTPases and contributes to acute virulence in the mouse. **PNAS**, v. 111, p. 1126-31, 2014.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 162-70, 2005.
- ANDENMATTEN, N.; EGARTER, S.; JACKSON, A. J.; JULLIEN, N.; HERMAN, J. P.; MEISSNER, M. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. **Nature methods**, v. 10, p. 125-7, 2013.
- ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, p. 232-237, 2003.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the non human primate. **Laboratory Investigation**, v. 71, p. 236-242, 1994.
- BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, p. 1709-1712, 2007.
- BEITING, D. P.; PEIXOTO, L.; AKOPYANTS, N. S.; BEVERLEY, S. M.; WHERRY, E. J.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A.; BRODSKY, I. E.; ROOS, D. S. Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species. **PLoS One**, v. 9, p. e88398, 2014.
- BEVERLEY, S. M. Parasitology: CRISPR for *Cryptosporidium*. **Nature**, v. 523, p. 413-414, 2015.
- BJÄRKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.

- BOUGDOUR, A.; DURANDAU, E.; BRENIER-PINCHART, M. P.; ORTET, P.; BARAKAT, M.; KIEFFER, S.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R. L.; BASTIEN, O.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; HAKIMI, M. A. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. **Cell Host Microbe**, v. 13, p. 489-500, 2013.
- BOUGDOUR, A.; TARDIEUX, I.; HAKIMI, M. A. *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. **Cellular Microbiology**, v. 16, p. 334-43, 2014.
- BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M. P.; YOGAVEL, M.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R. L.; HUSSAIN, T.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; TARDIEUX, I.; SHARMA, A.; BELRHALLI, H.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M. A. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, p. 2071-86, 2013.
- BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Review Immunology**, v. 16, p. 407-20, 2016.
- BUTCHER, B.; FOX, B. A.; ROMMEREIM, L. M.; KIM, S. G.; MAURER, K. J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D. R.; BZIK, D. J.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLoS Pathogens**, v. 7, p. e1002236, 2011.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 546-552, 2002.
- CANTÓN, G. J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; BENAVIDES-SILVÁN, 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. **Veterinary research**, v. 45, p. 11, 2014.
- CAPECCHI, M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. **Nature Reviews. Genetics**, v. 6, p. 507-12,
- CHEN, A. L.; KIM, E. W.; TOH, J. Y.; VASHISHT, A. A.; RASHOFF, A. Q.; VAN, C.; HUANG, A. S.; MOON, A. S.; BELL, H. N.; BENTOLILA, L. A.; WOHLSCHEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J. Novel components of the *Toxoplasma* inner membrane complex revealed by BioID. **MBio**, v. 6, p. e02357-14, 2015.
- CHEN, G.; SHAW, M. H.; KIM, Y. G.; NUNEZ, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annual Review of Pathology**, v. 4, p. 365-398, 2009.



- CHEN, J.; ZHOU, D. H.; LI, Z. Y.; PETERSEN, E.; HUANG, S. Y.; SONG, H. Q.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii*: protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. **Experimental parasitology**, v. 139, p. 42-48, 2014.
- CIRELLI, K. M.; GORFU, G.; HASSAN, M. A.; PRINTZ, M.; CROWN, D.; LEPLA, S. H.; GRIGG, M. E.; SAEIJ, J. P.; MOAYERI, M. Inflammasome sensor NLRP1 controls rat macrophage susceptibility to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1003927, 2014.
- CLAY, G. M.; SUTTERWALA, F. S.; WILSON, M. E. NLR proteins and parasitic disease. **Immunologic Research**, v. 59, p. 142-52, 2014.
- COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLANGBURN, B. L.; SORJONRN, D. C.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora* in dogs. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 208-211, 1995.
- CRAEYE, S.; SPEYBROECK, N.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; TAVERNIER, P.; GUCHT, S. V.; DORNY, P.; DIERICK, K.; COLLINET, F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 64–69, 2011.
- CUNHA, L. D.; RIBEIRO, J. M.; FERNANDES, T. D.; MASSIS, L. M.; KHOO, C. A.; MOFFATT, J. H.; NEWTON, H. J.; ROY, C. R.; ZAMBONI, D. S. Inhibition of inflammasome activation by *Coxiella burnetii* type IV secretion system effector IcaA. **Nature Communications**, v. 6, p. 10205, 2015.
- DAVOLI-FERREIRA, M.; FONSECA, D. M.; MOTA, C. M.; DIAS, M. S.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DA SILVA, M. V.; QUIRINO, G. F.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S.; MINEO, T. W. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29289, 2016.
- DE KONING-WARD, T. F.; GILSON, P. R.; CRABB, B. S. Advances in molecular genetic systems in malaria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, p. 373-387, 2015.
- DE NARDO D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, p. 181-9, 2015.
- DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 35-41, 2005.
- DION, S.; GERMON, S.; GUITON, R.; DUCOURNAU, C.; DIMIER-POISSON, I. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 685–695, 2011.

- DLUGONSKA, H. *Toxoplasma* rhoptries unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2008, p. 632424, 2008.
- DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology**, v. 4, p. 216-238, 2015.
- DONALD, R. G.; CARTER, D.; ULLMAN, B.; ROOS, D. S. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 14010-9, 1996.
- DOSTERT, C., GUARDA, G., ROMERO, J. F., MENU, P., GROSS, O., TARDIVEL, A., SUVA, M. L., STEHLE, J. C., KOPF, M., STAMENKOVIC, I., CORRADIN, G., TSCHOPP, J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. **PLoS One**, v. 4, p. e6510, 2009.
- DUBEY, J. P. Review of *N.caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 41, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 2002.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and the experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, p. 452-458, 1993.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992.

- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p.90-108, 2011.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M; Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323–367, 2007.
- DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 841–8, 2007.
- DUTRA, M. S., BÉLA, S. R., PEIXOTO-RANGEL, A. L., FAKIOLA, M., CRUZ, A. G., GAZZINELLI, A., QUITES, H. F., BAHIA-OLIVEIRA, L. M., PEIXE, R. G., CAMPOS, W. R., HIGINO-ROCHA, A. C., MILLER, N. E., BLACKWELL, J. M., ANTONELLI, L. R., GAZZINELLI, R. T. Association of a NOD2 Gene Polymorphism and T-Helper 17 Cells With Presumed Ocular Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, p. 152-63, 2013.
- ELLIS, J.; SINCLAIR, D.; MORRISON, D.; AL-QASSAB, S.; SPRINGETT, K.; IVENS, A. Microarray analyses of mouse responses to infection by *Neospora caninum* identifies disease associated cellular pathways in the host response. **Molecular and biochemical parasitology**, v.174, p.117–27, 2010.
- FERNANDES, B. C.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L.; CARVALHO, J. M.; OLIVEIRA, W. G.; CURY, M. C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais-Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.
- FOX, B. A.; RISTUCCIA, J. G.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. **Eukaryotic Cell**, v. 8, p. 520-9, 2009.
- GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 397-405, 2013.
- GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A.; ANTIGNAC, A.; JEHANNO, M.; VIALA, J.; TEDIN, K.; TAHA, M. K.; LABIGNE, A.; ZAHNINGER, U.; COYLE, A. J.; DISTEFANO, P. S.; BERTIN, J.; SANSONETTI, P. J.; PHILPOTT, D. J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science**, v. 300, p. 1584-1587, 2003a.
- GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; VIALA, J.; CHAMAILLARD, M.; LABIGNE, A.; THOMAS, G.; PHILPOTT, D. J.; SANSONETTI, P. J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 8869-8872, 2003b.
- GOLD, D. A.; KAPLAN, A. D.; LIS, A.; BETT, G. C.; ROSOWSKI, E. E.; CIRELLI, K. M.; BOUGDOUR, A.; SIDIK, S. M.; BECK, J. R.; LOURIDO, S.; EGEA, P. F.; BRADLEY, P. J.; HAKIMI, M. A.; RASMUSSEN, R. L.; SAEIJ, J. P. The

- Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. **Cell Host and Microbe**, v. 17, p. 642-52, 2015.
- GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMPLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.159–161, 2004.
- GOODSWEN, S. J.; BARRATT, J. L.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Improving the gene structure annotation of the apicomplexan parasite *Neospora caninum* fulfils a vital requirement towards an in silico-derived vaccine. **International journal for parasitology**, v. 45, p. 305-318, 2015.
- GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133–150, 2013.
- GORFU, G.; CIRELLI, K. M.; MELO, M. B.; MAYER-BARBER, K.; CROWN, D.; KOLLER, B. H.; MASTERS, S.; SHER, A.; LEPLA, S. H.; MOAYERI, M.; SAEIJ, J. P.; GRIGG, M. E. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **MBio**, v. 5, p. e01117-13, 2014.
- GOV, L.; KARIMZADEH, A.; UENO, N.; LODOEN, M. B. Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. **MBio**, v. 4, p. e00255-13, 2013.
- GRIFFITH, J. W., SUN, T., MCINTOSH, M. T., BUCALA, R. Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 5208-20, 2009.
- GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors. **Cellular and molecular life science**, v. 73, p. 3035-51, 2016.
- HAKIMI, M. A.; BOUGDOUR, A. *Toxoplasma*'s ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 24-31, 2015.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH S. Signaling to NF-kappaB. **Genes and Development**, v. 18, p. 2195–2224, 2004.
- HECKER, Y. P.; CANTÓN, G.; REGIDOR-CERRILLO, J.; CHIANINI, F.; MORRELL, E.; LISCHINSKY, L.; ORTEGA-MORA, L. M.; INNES, E. A.; ODEÓN, A.; CAMPERO, C. M.; MOORE, D. P. Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 214, p. 247-54, 2015.

- HEMPHILL, A.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; MÜLLER, J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**, v. 143, p. 245-59, 2016.
- HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 133, p. 261–278, 2006.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. **Methods**, v. 13, p. 123-33, 1997.
- HSU, L. C.; ALI, S. R.; MCGILLIVRAY, S.; TSENG, P. H.; MARIATHASAN, S.; HUMKE, E. W.; ECKMANN, L.; POWELL, J. J.; NIZET, V.; DIXIT, V. M.; KARIN, M. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. **PNAS**, v. 105, p. 7803-7808, 2008.
- HUYNH, M. H.; CARRUTHERS, V. B. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. **Eukaryotic Cell**, v. 8, p. 530-9, 2009.
- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitology**, v. 18, p. 497-504, 2002.
- JANSEN, R., EMBDEN, J. D., GAASTRA, W., SCHOULS, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1565-1575, 2002.
- JENSEN, K. D.; HU, K.; WHITMARSH, R. J.; HASSAN, M. A.; JULIEN, L.; LU, D.; CHEN, L.; HUNTER, C. A.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* rhoptry 16 kinase promotes host resistance to oral infection and intestinal inflammation only in the context of the dense granule protein GRA15. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 2156-2167, 2013.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends in molecular medicine**, v. 13, p. 460-9, 2007.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity Review**, v. 34, p. 637-50, 2011.
- KELLER, M.; RUEGG, A.; WERNER, S.; BEER, H. D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v. 132, p. 818-831, 2008.
- KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ, M.; BJÖRKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPILL, A. Identification of a *Neospora caninum* Microneme Protein (NcMIC1) Which Interacts with Sulfated Host Cell Surface Glycosaminoglycans. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3187–3198, 2002

- KIM, Y. K.; SHIN, J. S.; NAHM, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei medical journal**, v. 57, p. 5-14, 2016.
- KING, J. S.; BROWN, G. K.; JENKINS, D. J.; ELLIS, J. T.; FLEMING, P. J.; WINDSOR, P. A.; SLAPETA, J. Oocysts and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 85–92, 2012.
- KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 945–950, 2010.
- KRISHNA, R. X. D.; SANDERSON, S.; SHANMUGASUNDRAM, A.; VERMONT, S.; BERNAL, A.; DANIEL-NAGUIB, G.; GHALI, F.; BRUNK, B. P.; ROOS, D. S.; WASTLING, J. M.; JONES, A. R. A large-scale proteogenomics study of apicomplexan Pathogens-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **Proteomics**, v. 15, p. 2618-2628, 2015.
- LASRI, S.; De MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 25-32, 2004.
- 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**, v. 9, p. e99744, 2014.
- LI, W.; LIU, J.; WANG, J.; FU, Y.; NAN, H.; LIU, Q. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2893-2902, 2015.
- LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L.; MINEO, T. W.; GUTIERREZ, F. R.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, p. 909-15, 2013.
- MANN, T. R.; CADORE, G. C.; CAMILLO, G.; VOGEL, F. S.; SCHMIDT, C.; ANDRADE, C. M. Canine cutaneous neosporosis in Brazil. **Veterinary dermatology**, v. 27, p. 195-97, 2016.
- MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 7, p. 31-40, 2007.
- MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S.; ZAMBONI, D. S. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLoS ONE**, v. 5, p. e15263, 2010.

- McALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, p. 443-63, 2016.
- McALLISTER, M. M.; WALLACE, D. Reduce your herd's risk of *Neospora* abortions. The keys are controlling dogs and protecting our feed supplies. **Hoard's Dairyman**, v. 7, p. 438, 1999.
- MCDONALD, C.; INOHARA, N.; NUNEZ, G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20177–20180, 2005.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Review Immunology**, v. 1, p. 135-45, 2001.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, p. 39-44, 2006.
- MINEO, J. R.; SLIVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**, Uberlândia, EDUFU, 273p., 2005.
- MINEO, T. W. P.; OLIVEIRA, C. J. F.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA, J. S. Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**, v. 0, p. 1–9, 2010.
- MINEO, T. W.; ALENIUS, S.; NASLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 188-192, 2006.
- MINEO, T. W.; BENEVIDES, L.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, p. 32- 44, 2009.
- MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 352-355, 2011.
- MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 52-70, 2014.
- MORAVEJ, A.; RASOULI, M.; KALANI, M.; ASAEI, S.; KIANI, S.; NAJAFIPOUR, S.; KOOHPAYEH, A.; ABDOLLAHI, A. IL-1beta (-511T/C) gene polymorphism not IL-1beta (+3953T/C) and LT-alpha (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 6907-14, 2012.

- MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v.100, p.633-636, 2007.
- MOTA, C. M.; FERREIRA, M. D.; COSTA, L. F.; BARROS, P. S.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Fluorescent ester dye-based assays for the in vitro measurement of *Neospora caninum* proliferation. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 14-19, 2014.
- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 269–285, 2011.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 89, p. 557-563, 2011.
- NADIPURAM, S. M.; KIM, E. W.; VASHISHT, A. A.; LIN, A. H.; BELL, H. N.; COPPENS, I.; WOHLSCHEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J. In Vivo Biotinylation of the *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Reveals Novel Dense Granule Proteins Important for Parasite Growth and Pathogenesis. **MBio**, v. 7, pii: e00808-16, 2016.
- NIEDELMAN, W.; GOLD, D. A.; ROSOWSKI, E. E.; SPROKHOLT, J. K.; LIM, D.; ARENAS, A. F.; MELO, M. B.; SPOONER, E.; YAFFE, M. B.; SAEIJ, J. P. J. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. E1002784, 2012.
- OGURA, Y.; INOHARA, N.; BENITO, A.; CHEN, F. F.; YAMAOKA, S.; NUNEZ, G. NLR2, a NLR1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- kappaB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4812-4818, 2000.
- OGURA, Y.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. **Cell**, v. 126, p. 659-662, 2006.
- OKADA, T.; MARMANSARI, D.; LI, Z. M.; ADILBISH, A.; CANKO, S.; UENO, A.; SHONO, H.; FURUOKA, H.; IGARASHI, M. A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 189, p. 5-13, 2013.
- ORDEIX, L.; LLORET, A.; FONDEVILA, D.; DUBEY, J. P.; FERRER, L.; FONDATI, A. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 415-419, 2002.
- ORTEGA-MORA; L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; FERNANDEZ, E. C.; CERRILLO, J. R.; GARAGALZA, C. U.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.



- PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; PAZ, A.; DÍAZ, P.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; FERNÁNDEZ, G.; LAGO, N.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONGO, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 111-115, 2010.
- PATITUCCI, A. N.; PHIL, M.; PÉREZ, M. J.; ROZAS, M. A.; ISRAEL, K. F. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 252-255, 2001.
- PATRA, M. C.; CHOI, S. Recent progress in the development of Toll-like receptor (TLR) antagonists. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 26, p. 719-30 2016.
- PEREIRA, L. M.; BARONI, L.; YATSUDA, A. P. A transgenic *Neospora caninum* strain based on mutations of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. **Experimental Parasitology**, v. 138, p. 40-47, 2014.
- PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P. The chloramphenicol acetyltransferase vector as a tool for stable tagging of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 196, p. 75-81, 2014.
- PERLÉ, K. D. M.; DEL PIERO, F.; CARR, R. F.; HARRIS, C.; STROMBERG, P. C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 252-255, 2001.
- RAMAPRASAD, A.; MOURIER, T.; NAEEM, R.; MALAS, T. B.; MOUSSA, E.; PANIGRAHI, A.; VERMONT, S. J.; OTTO, T. D.; WASTLING, J.; PAIN, A. Comprehensive evaluation of *Toxoplasma gondii* VEG and *Neospora caninum* LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features. **PLoS One**, v. 10, p. e0124473, 2015.
- RATHINAM, V. A.; FITZGERALD, K. A. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. **Cell**, v. 165, p. 792-800. 2016.
- REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, A. M.; GONDIM, L. F.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013.
- REICHMANN, G.; DLUGONSHA, H.; FISCHER, H. G. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 199, p. 43-54, 2002.
- REID, A. J.; VERMONT, S. J.; COTTON, J. A.; HARRIS, D. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*:

- coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. e1002567, 2012.
- RIBEIRO, D. P.; FREITAS, M. M. P.; CARDOSO, M. R. D.; PAJUABA, A. C. A. M.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. CpGODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 2570-2579, 2009.
- ROMMEREIM, L. M.; HORTUA-TRIANA, M. A.; FALLA, A.; SANDERS, K. L.; GUEVARA, R. B.; BZIK, D. J.; FOX, B. A. Genetic manipulation in  $\Delta ku80$  strains for functional genomic analysis of *Toxoplasma gondii*. **JoVE**, v. (77), p. e50598, 2013.
- ROSOWSKI, E. E.; LU, D.; JULIEN, L.; RODDA, L.; GAISER, R. A.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, p. 195-212, 2011.
- ROUX, K. J., KIM, D., RAID, M., BURKE, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 196, p. 801-10, 2012.
- SAMAVATI, L.; RASTOGI, R.; DU, W.; HÜTTEMANN, M.; FITE, A.; FRANCHI, L. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 1867-77, 2009.
- SHAW, M. H.; REIMER, T.; SÁNCHEZ-VALDEPEÑAS, C.; WARNER, N.; KIM, Y.; FRESNO, M.; NUÑEZ, G. T cell intrinsic role of Nod2 in promoting type I immunity against *Toxoplasma gondii*. **Nature Immunology**, v.10, n. 12, p. 1267–1274, 2009.
- SHEN, B.; BROWN, K. M.; LEE, T. D.; SIBLEY, L. D. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. **MBio**, v. 5, p. e01114-14, 2014.
- SHIO, M. T., EISENBARTH, S. C., SAVARIA, M., VINET, A. F., BELLEMARE, M. J., HARDER, K. W., SUTTERWALA, F. S., BOHLE, D. S., DESCOTEAUX, A., FLAVELL, R. A., OLIVIER, M. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000559, 2009.
- SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 141-6, 2016.

- SIDIK, S. M.; HACKETT, C. G.; TRAN, F.; WESTWOOD, N. J.; LOURIDO, S. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. **PLoS One**, v. 29, p. e100450, 2014.
- SILMON N. C., WEISS, L. M. Integration of RNA-seq and proteomics data with genomics for improved genome annotation in Apicomplexan parasites. **Proteomics**, v. 15, p. 2557-9, 2015.
- SILVA, G. K., COSTA, R. S., SILVEIRA, T. N., CAETANO, B. C., HORTA, C. V., GUTIERREZ, F. R., GUEDES, P. M., ANDRADE, W. A., DE NIZ, M., GAZZINELLI, R. T., ZAMBONI, D. S., SILVA, J. S. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 $\beta$  response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 3373-83, 2013.
- SPILOVSKÁ, S.; REITEROVÁ, K.; KOVÁCOVÁ, D.; BOBÁKOVÁ, M.; DUBINSKÝ, P. The first finding of *Neospora caninum* and the occurrence of other abortifacient agents in sheep in Slovakia. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 320-323, 2009.
- STEINFELDT, T.; KÖNEN-WAISMAN, S.; TONG, L.; PAWLOWSKI, N.; LAMKEMEYER, T.; SIBLEY, L. D.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS Biology**, v. 8, p. e1000576, 2010.
- STEWART, M. K.; COOKSON, B. T. Evasion and interference: intracellular pathogens modulate caspase-dependent inflammatory responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 346-59, 2016.
- SUNG, Y. H.; KIM, J. M.; KIM, H. T.; LEE, J.; JEON, J.; JIN, Y.; CHOI, J. H.; BAN, Y. H.; HA, S. J.; KIM, C. H.; LEE, H. W.; KIM, J. S. Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. **Genome Research**, v. 24, p. 125-131, 2014.
- TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review Immunology**, v. 23, p. 901-44, 2005.
- THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis – like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p. 205-209, 1989.
- UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; JAKUBEK, E. B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1467-1472, 1998.
- VANAJA, S. K.; RATHINAM, V. A.; FITZGERALD, K. A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends in cell biology**, v. 25, p. 308-15, 2015

- WANG, J. L.; HUANG, S. Y.; LI, T. T.; CHEN, K.; NING, H. R.; ZHU, X. Q. Evaluation of the basic functions of six calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii* using CRISPR-Cas9 system. **Parasitology Research**, v. 115, p. 697-702, 2015.
- YAMAMOTO, M.; STANDLEY, D. M.; TAKASHIMA, S.; SAIGA, H.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; KUBO, E.; ITO, H.; TAKAURA, M.; MATSUDA, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, p. 2747-60, 2009.
- YU, X.; CHEN, N.; HU, D.; ZHANG, W.; LI, X.; WANG, B.; KANG, L.; LI, X.; LIU, O.; TIAN, K. Detection of *Neospora caninum* from Farm-Bred Young Blue Foxes (*Alopex lagopus*) in China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, p. 113–115, 2009.
- YUAN, Z. G.; ZHANG, X. X.; HE, X. H.; PETERSEN, E.; ZHOU, D. H.; HE, Y.; LIN, R. Q.; LI, X. Z.; CHEN, X. L.; SHI, X. R.; ZHONG, X. L.; ZHANG, B.; ZHU, X. Q. Protective immunity induced by *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 16 against toxoplasmosis in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 119-124, 2011.
- ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Review**, v. 265, p. 156-71, 2015.
- ZHANG, G.; HUANG, X.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, B.; ZHANG, H.; YU, L.; LI, Y.; LUO, Y.; CAO, S.; GOO, Y. K.; YAMAGISHI, J.; ZHOU, J.; ZHANG, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Construction of *Neospora caninum* stably expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Vaccine**, v. 28, p. 7243-7247, 2010.
- ZHAO, Y.; YAP, G. S. *Toxoplasma*'s arms race with the host interferon response: a ménage à trois of ROPs. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 517-8, 2014.
- ZHU, X.; XU, Y.; YU, S.; LU, L.; DING, M.; CHENG, J.; SONG, G.; GAO, X.; YAO, L.; FAN D.; MENG, S.; ZHANG, X.; HU, S.; TIAN, Y. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. **Scientific reports**, v. 4, p. 6420, 2014.
- ZUURBIER, C. J.; JONG, W. M.; EERBEEK, O.; KOEMAN, A.; PULSKENS, W. P.; BUTTER, L. M.; LEEMANS, J. C.; HOLLMANN, M. W. Deletion of the innate immune NLRP3 receptor abolishes cardiac ischemic preconditioning and is associated with decreased Il-6/STAT3 signaling. **PLoS One**, v. 7, p. e40643, 2012.

*Apéndice*

## 9 APÊNDICE

### 9.1 Apêndice I: Lista de primers utilizados neste estudo

Nome	Alvo	Sequência do Primer
P1	Rop9.F	AAG TTG TTG TTC ACC GAG GAG ACG AG
P2	Rop9.R	AAA ACT CGT CTC CTC GGT GAA CAA CA
P3	GFP.F	ATG CAT AAA GGA GAA GAA CTT TTC AC
P4	GFP.R	TTA ATT AAT TAT TTG TAT AGT TCA TCC AT
P5	mCherry.F	ATG CAT GTG AGC AAG GGC GAG GAG GA
P6	mCherry.R	TTA ATT AAC TAC TTG TAC AGC TCG TCC AT
P7	Gra15.F	ATG CAT GTG ACA ACA ACC ACG CCA AC
P8	Gra15.R	GCG GCC GCT GGA GTT ACC GCT GAT TGT GT
P9	Rop16.F	ATG CAT ATG AAA GTG ACC ACG AAA GGG
P10	Rop16.R	GCG GCC GCC ATC CGA TGT GAA GAA AGT TCG GTA GT
P11	Rop18.F	ATG CAT TTT TCG GTA CAG CGG CCA C
P12	Rop18.R	GCG GCC GCT TCT GTG TGG AGA TGT TCC TG
P13	BirA*-3xHA.F	GCG GCC GCC GAC AAG GAC AAC ACC GTG C
P14	BirA*-3xHA.R	TTA ATT AAT TAG GCA TAA TCT GGA ACA TCG T
P15	Gra24.F	ATG CAT ATG CTC CAG ATG GCA CGA TAT A
P16	Gra24.R	GCG GCC GCA TTA CCC TTA GTG GGT GGT

10.

*Anexo*

## 10 ANEXO

### 10.1 Anexo I: Comprovante da aprovação do Comitê de Ética e Utilização Animal institucional



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

#### ANÁLISE FINAL Nº 087/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 052/12

Projeto Pesquisa: “Padronização de modelo de infecção por *Neospora caninum* pela via oral utilizando mecanismos de indução de interconversão de estágio in vitro”

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTA ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 26 de Setembro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista  
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU