



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**Caracterização genética e de virulência de Nc-UDI4, isolado de
Neospora caninum, obtido em galinha**

Mariana Ferreira Silva

Uberlândia – MG

Junho/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**Caracterização genética e de virulência de Nc-UDI4, isolado de
Neospora caninum, obtido em galinha**

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

Mariana Ferreira Silva

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

Uberlândia – MG

Junho /2021

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

S586 2021	<p>Silva, Mariana Ferreira, 1993- Caracterização genética e de virulência de Nc-UDI4, isolado de Neospora caninum, obtido em galinha [recurso eletrônico] / Mariana Ferreira Silva. - 2021.</p> <p>Orientador: Tiago Mineo. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.296 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Imunologia. I. Mineo, Tiago, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 139 do PPIPA				
Data:	oito de junho de dois mil e vinte e um	Hora de início:	13h30min	Hora de encerramento:	17h40min
Matrícula do Discente:	11713IPA002				
Nome do Discente:	Mariana Ferreira Silva				
Título do Trabalho:	Caracterização genética e de virulência de Nc-UDI4, isolado de <i>Neospora caninum</i> , obtido em galinha				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de patógenos causadores de doenças infecciosas e parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos mecanismos de reconhecimento imunes frente a infecção pelos protozoários <i>neospora caninum</i> e <i>toxoplasma gondii</i>				

Reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Luis Fernando Pita Gondim - UFBA; Érica dos Santos Martins Duarte - UFMG; Marcos Rogério André- UNESP; Carlos Ueira Vieira - IBTEC/UFU; Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - ICBIM/UFU - (Presidente) orientador da candidata.

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

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

APROVADO(A)

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por Marcos Rogério André, Usuário Externo, em 09/06/2021, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Erica dos Santos Martins Duarte, Usuário Externo, em 09/06/2021, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Luís Fernando Pita Gondim, Usuário Externo, em 09/06/2021, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior, em 09/06/2021, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior, em 10/06/2021, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2824043 e o código CRC B3907E30.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Tiago Wilson pela oportunidade em desenvolver este trabalho, pelo auxílio e paciência nos momentos mais complicados, que contribuíram muito para o meu crescimento profissional.

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

Aos meus pais, Gilda e Olímpio, por sempre colocarem os meus estudos como prioridade. Obrigada pelo apoio e incentivo incansável nestes anos de doutorado. Agradeço muito por valorizarem a carreira acadêmica.

Às minhas irmãs, Camila e Luiza, por nunca duvidarem da minha capacidade e por me incentivarem a sonhar cada vez mais alto.

À toda a minha família que sempre valorizou muito a ciência e o meu trabalho. O apoio de vocês foi fundamental.

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

Às minhas colegas de trabalho Flávia, Vanessa Miranda e Vanessa Resende pelo apoio nos experimentos e por serem amigas que tornaram o trabalho muito fácil.

Aos colegas do laboratório Cristina, Caroline, Eliézer, Héber, Patrício, Júlio, Tamires, David e Fernando muito obrigada pelo ótimo convívio, pelos momentos engraçados e pela ajuda no trabalho.

Ao Matheus de Souza Gomes e à Tamires Alves pelo auxílio com os experimentos de bioinformática, pela paciência e persistência até a obtenção dos resultados.

Aos meus amigos Ana Luisa, Bruno Luiz, Áurea, Ingrid, Danielle, Samuel, Igor, Victor Hugo, Lara e Nicollas muito obrigada por nunca me deixarem desistir, pelas palavras amigas, por ouvirem minhas reclamações, pelo consolo e companheirismo.

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

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

Às secretárias do Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela disponibilidade em sempre nos ajudar.

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

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário que pertence ao filo Apicomplexa, possui ampla distribuição mundial e é o causador da neosporose. Essa doença possui grande importância econômica pois causa abortamentos em bovinos. Atualmente não há tratamento e nem vacinas e, por isso, o estudo do parasito e das suas relações com o meio ambiente é de suma importância. Sabe-se que aves são reservatórios de *N. caninum*, porém o papel da neosporose nestes hospedeiros ainda não está claro. O presente trabalho busca caracterizar o genótipo de uma nova cepa de *N. caninum*, descrita como Nc-UDI4, isolada do cérebro de uma galinha da região de Uberlândia/MG. Buscou-se ainda compreender o comportamento biológico desta cepa comparando-a com outras duas cepas de *N. caninum*, Nc-1 e Nc-Liverpool (Nc-Liv). Análises sorológicas mostraram que este novo isolado induz anticorpos específicos anti- *N. caninum* em camundongos e, através da reação de cadeia em polimerase (PCR), identificou-se que Nc-UDI4 possui o gene Nc5 específico de *N. caninum*. Além disso, Nc-UDI4 teve uma taxa de alinhamento de 99,8% com o genoma de referência Nc-Liv, conforme as análises de sequenciamento de nova geração (NGS). Foram identificados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), inserções e deleções (InDels) entre Nc-UDI4 e Nc-Liv. Os principais genes que tiveram mutações foram os responsáveis pela adesão, invasão e sobrevivência do parasito e, conforme mostrado no ensaio de placa, Nc-UDI4 conseguiu invadir e se replicar menos que Nc-Liv. Foram feitas análises de microssatélites que dividiram os isolados de *N. caninum* em 2 *clusters* principais, sendo o genótipo de Nc-UDI4 mais próximo de cepas Argentinas e de Nc-1. Nc-UDI4 demonstrou ser menos virulento que Nc-Liv, pois induziu menor mortalidade de camundongos e perfil de citocinas diferente. Portanto, camundongos C57BL/6 infectados com Nc-UDI4 e Nc-1 conseguem ser mais resistentes a infecção por equilibrarem a resposta imune pró e anti-inflamatória, enquanto Nc-Liv modula essa resposta favorecendo a infecção do parasito no hospedeiro.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, ave, NGS, parasitismo

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan that belongs to the Apicomplexan phylum, has worldwide distribution and causes neosporosis. This disease induces abortions in cattle and has a significant economic impact. There are no treatment nor vaccines against the parasite so, it is important to study the parasite and its relationship with the environment. It is known that birds are reservoirs for *N. caninum*, but the actual relevance of neosporosis in birds it is not clear yet. In the present work we aimed to characterize the genotype of a new strain of *N. caninum* isolated from the brain of a chicken in the city of Uberlandia/MG, Brazil, and compare its biological features with Nc-1 and Nc-Liv. Serological analysis showed that this new strain induces anti-*N. caninum* antibodies in mice and, using polymerase chain-reaction (PCR), we amplified the Nc5 sequence in its genomic DNA. Furthermore, Nc-UD4 genome aligned 99,8% to the reference genome, Nc-Liv, according to new generation sequencing (NGS) analysis. We identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions/deletions (InDels) between Nc-UDI4 and Nc-Liv. Genes related to adhesion, invasion and survival of the parasite were altered and, as we showed in plaque assay, Nc-UDI4 had lower invasion/replication rates compared to Nc-Liv. Microsatellite analysis shared *N. caninum* in two clusters and revealed that the genotype of Nc-UDI4 is closely related to the Argentinian strains and Nc-1. Nc-UDI4 and Nc-1 are less virulent than Nc-Liv, as it induced low mortality of C57BL/6 mice and also a different cytokine profile. In that sense, mice infected with Nc-UDI4 and Nc-1 are more resistant to the infection, allied to a more favourable balance of pro- and anti-inflammatory immune responses against *N. caninum*, while Nc-Liv modulated this response in its favor, contributing to a worst outcome to its host.

Keywords: *Neospora caninum*, bird, NGS, parasitism

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	<i>Neospora caninum</i>	12
1.1.1	Identificação e classificação taxonômica	12
1.1.2	Hospedeiros.....	13
1.1.3	Morfologia e ultraestrutura básica	13
1.1.4	Ciclo biológico e vias de transmissão	16
1.1.5	Patogênese da neosporose	18
1.1.6	Epidemiologia	19
1.1.7	Controle e prevenção	20
1.1.8	Diversidade de isolados do parasito e seus hospedeiros	21
1.1.9	<i>N. caninum</i> em aves.....	24
1.1.10	Caracterização de novas cepas de <i>N. caninum</i>	25
1.2	Resposta imune contra <i>N. caninum</i>	27
2	Justificativa	31
3	Objetivos.....	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	Materiais e métodos	33
4.1	Obtenção do isolado Nc-UDI4	33
4.2	Delineamento experimental.....	33
4.3	Cultivo de parasitos	34
4.4	Animais	35
4.5	Preparação do antígeno solúvel de <i>N. caninum</i> (NLA) e antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> (STAg).....	35
4.6	Quantificação de anticorpos IgG anti- <i>N. caninum</i> por ELISA indireto	35
4.7	Imunofluorescência indireta	36
4.8	PCR convencional	36
4.9	Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	37
4.12	Identificação e anotação das variantes	39
4.13	Ensaio de placa.....	40
4.14	Análise da sobrevivência e morbidade	41
4.15	Quantificação da carga parasitária por qPCR	41
4.16	Análise histológica e imuno-histoquímica.....	42
4.17	Quantificação de citocinas.....	43
4.18	Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	43

4.19	Infecção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)	44
4.20	Análise estatística	44
5	Resultados	45
5.1	Caracterização da cepa Nc-UDI4 através da produção de anticorpos específicos para <i>N. caninum</i> e amplificação de Nc5 por PCR	45
5.2	Sequenciamento de nova geração do genoma de Nc-UDI4 utilizando Illumina HiSeq – Avaliação da qualidade das <i>reads</i>	47
5.3	Mapeamento do genoma de Nc-UDI4 com genomas de referência	48
5.4	Análise filogenética da região ITS1 entre espécies do filo Apicomplexa	50
5.5	Comparação dos SNPs e InDels entre Nc-UDI4 e o Nc-Liv.....	52
5.6	Identificação e anotação de mutações não sinônimas	54
5.7	Comparação do alinhamento de marcadores de microssatélites de cepas de <i>N. caninum</i>	57
5.8	Ensaio de placa.....	59
5.9	Camundongos são mais susceptíveis à infecção por Nc-Liv quando comparados à infecção por Nc-1 e Nc-UDI4	60
5.10	Camundongos infectados com Nc-Liv apresentaram maior carga parasitária no fígado e cérebro comparados à Nc-UDI4 e Nc-1.....	61
5.11	Produção de anticorpos específicos da classe IgG e suas subclasses em animais infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4.....	63
5.12	Nc-Liv induz uma maior produção de IL-10 comparados a Nc-1 e Nc-UDI4 durante a fase aguda da infecção.....	64
5.13	BMDMs infectados com Nc-Liv induzem maior produção de IL-10	66
6	Discussão	67
7	Conclusão.....	74
8	Referências Bibliográficas	75
	Apêndice A - Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados no trabalho	97
	Apêndice B – Padrões de repetição dos microssatélites em 159 isolados de <i>N. caninum</i>	98
	Apêndice C - Identificação das regiões que tiveram maior quantidade de SNPs.....	102
	Apêndice D - Identificação das regiões que tiveram maior quantidade de InDels.....	106
	Apêndice E - Identificação e classificação das mutações não sinônimas.....	108
	ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa de Animais (CBEA)	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum*

1.1.1 Identificação e classificação taxonômica

O parasito *Neospora caninum* foi primeiramente identificado em 1984 em cães na Noruega por Bjerkas e colaboradores. Amostras de tecido desses animais infectados foram coletadas e constatou-se que este parasito induzia a formação de cistos teciduais, lesões no sistema nervoso central (SNC), e paralisia dos músculos esqueléticos, mas a sorologia dos animais eram negativas para *Toxoplasma gondii*, apesar da semelhança morfológica dos parasitos (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Após 4 anos dessa primeira identificação, em 1988, *N. caninum* foi caracterizado e classificado como sendo um novo coccídeo intracelular obrigatório, causador da neosporose (DUBEY et al., 1988b). Quanto a classificação taxonômica, este parasito pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidiasina e família Sarcocystidae (Figura 1).

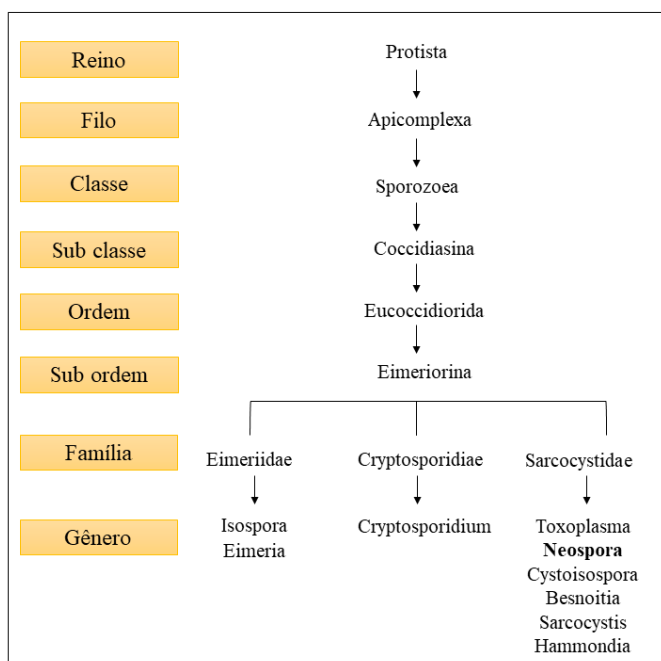


Figura 1 – Taxonomia biológica de *Neospora caninum* (Adaptado de GOODSWEN et al. 2013)

1.1.2 Hospedeiros

N. caninum possui dois tipos de hospedeiros: definitivo e intermediário. Os hospedeiros definitivos são membros do gênero *Canis*, que albergam a reprodução sexuada do parasito em seus intestinos, com consequente eliminação de oocistos nas fezes (MCALLISTER et al., 1998). Além de cães domésticos (*Canis familiaris*), os únicos hospedeiros definitivos de *N. caninum* já identificados foram coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), lobos (*Canis lupus lupus*) (DUBEY; SCHARES, 2011) e dingos australianos (*Canis lupus dingos*) (KING et al., 2010)

Os hospedeiros intermediários são aqueles em que o parasito se replica de modo assexuado, por meio de um processo chamado endodiogenia (SPEER; DUBEY, 1989). Há uma vasta gama de animais vertebrados de sangue quente que podem servir como hospedeiros intermediários do parasito, sendo as infecções em bovino as de maior relevância econômica (ALMERIA; LOPEZ-GATIUS, 2013; DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007). Isolados já foram identificados em diferentes espécies animais como bovinos (*Bos taurus*), cães, ovelhas (*Ovis aries*), búfalo-asiático (*Bubalus bubalis*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus vaginalis*), cabras (*Capra aegracus hircus*), dentre outras (DONAHOE et al., 2015; DUBEY et al., 2017). Vale ressaltar que DNA genômico de *N. caninum* já foi identificado em tecidos de ursos, coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), aves silvestres, raposa do campo (*Lycalopex vetulus*), capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) dentre outros. Até o momento não se tem muitos relatos de infecções naturais do *N. caninum* em humanos e primatas. Recentemente foram identificados DNA do parasito em amostras de cordão umbilical humano (DUARTE et al., 2020). Já foram relatadas transmissão congênita do parasito em macacos rhesus infectados experimentalmente (DUBEY et al., 2017). Além disso, imunoglobulinas específicas anti – *N. caninum* já foram identificadas em diversos grupos de pacientes, principalmente indivíduos HIV positivos e com desordens neurológicas, porém com baixas taxas de soropositividade em indivíduos saudáveis (LOBATO et al., 2006).

1.1.3 Morfologia e ultraestrutura básica

Existem três formas evolutivas do *N. caninum* sendo estas taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos (taqui = rápido em Grego) correspondem ao estágio de multiplicação rápida do *N. caninum*, possuem tamanho de 6 x 2 µm e se desenvolvem dentro de uma estrutura denominada vacúolo parasitóforo (VP) (LINDSAY; DUBEY,

2020). A ultraestrutura do *N. caninum* é bem descrita em taquizoítos e, como mostrado na figura 2, possuem complexo apical, conoide, apicoplasto, micronemas, roptrias e grânulos densos que são componentes específicos do filo Apicomplexa (DUBEY et al., 1988a, 1988b, 2017). A invasão do parasito nas células do hospedeiro ocorre a partir do contato de moléculas de adesão da região apical do parasito, bem como moléculas secretórias que atuam junto a superfície celular. A partir dessa associação, entram no interior das células até formarem VP no citoplasma. É importante destacar que esse processo independe de energia do hospedeiro, sendo esta dispendida pelo próprio parasito (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

O complexo apical é formado por dois anéis apicais na parte mais anterior do parasito e dois anéis polares que circundam o conóide. Essa estrutura tem formato de cone e é formado por tubulinas que facilitam o processo de invasão celular do parasito. Uma das classes de proteínas envolvidas nesse processo de invasão são as proteínas de superfície imunodominantes (NcSAG1 e NcSRS2) que se ligam a glicosaminoglicanos (GAGs) das células hospedeiras. Após o contato inicial com as células hospedeiras, o parasito projeta o seu conoide e ocorre a invaginação da membrana do hospedeiro e formação do vacúolo parasitóforo.

Sabe-se que as micronemas estão envolvidas no processo de movimentação do parasito, ligação e invasão das células do hospedeiro. As micronemas funcionam como adesinas e auxiliam no processo de entrada do parasito para dentro do VP (DUBEY et al., 2017; HEMPHILL; GOTTSSTEIN; KAUFMANN, 1996). As principais micronemas já descritas são aquelas que atuam em forma de complexos, interagindo com receptores celulares como: NcMIC1, NcMIC2, NcMIC3, NcMIC4 e NcMIC6. As roptrias e os grânulos densos criam um ambiente favorável para o crescimento e sobrevivência do parasito intracelularmente, sendo parte destas proteínas relevantes fatores de virulência do parasito. Os principais grupos de ROPs já descrito são NcROP2 e NcROP40 e juntos são os principais alvos na produção de vacinas (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2016). O processo de invasão do parasito é crucial para a sua manutenção no hospedeiro, porém a sobrevivência destes no meio intracelular também é muito importante e por isso na terceira etapa os grânulos densos são liberados no interior do VP para coordenar processos metabólicos do parasito e favorecer a sua replicação. Outra função importante dos grânulos densos é evitar a fusão do VP parasitário com o lisossomo do hospedeiro e conseqüentemente a sua degradação (MERCIER; CESBRON-DELAUW, 2015). As

principais proteínas de grânulos densos descritas são NcGRA7 e NcGRA6 e ambas estão localizadas abundantemente no interior do VP (HEMPHILL et al., 1998).

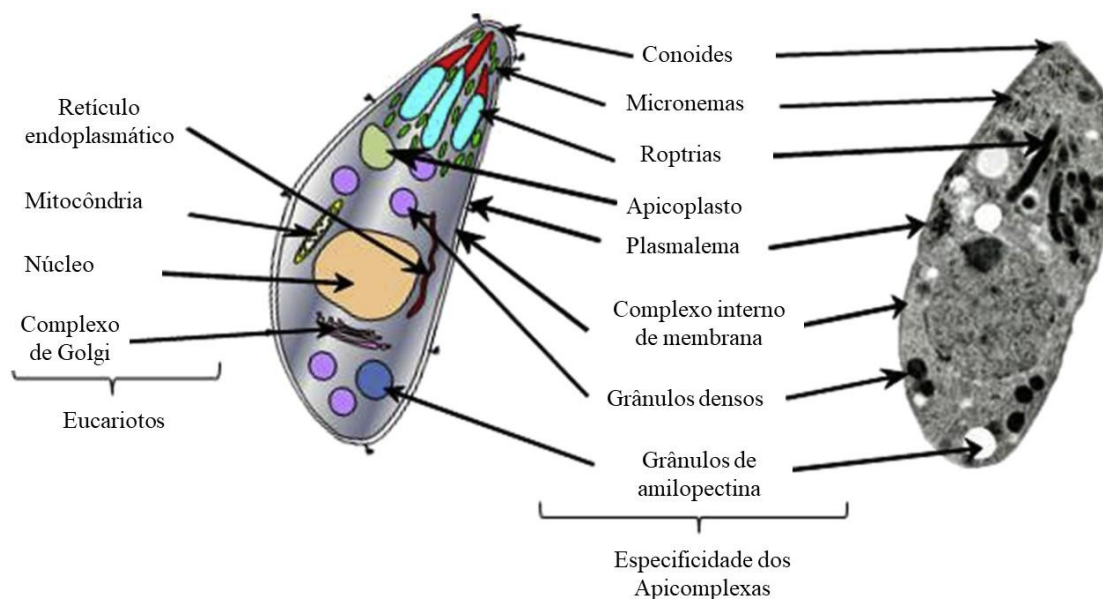


Figura 2 – Principais organelas e estruturas de *N. caninum* (Adaptado de MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2017)

Vale destacar que a membrana interna constituída pelo complexo interno de membrana (IMC) é constituída por 3 películas, sendo duas internas e a mais externa denominadas plasmalema. Os taquizoítos conseguem invadir diferentes tipos celulares do hospedeiro e se multiplicam pelo processo de divisão celular assexuada denominado endodiogenia (DUBEY et al., 2017; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). A mobilidade dos taquizoítos é guiada por um complexo proteico de actina e miosina denominado glideossomo que se ancora ao IMC. Este complexo coordena os movimentos do parasito que podem ser ondulados, arredondados e rotacionais, mais conhecido como movimento de gliding (FRÉNAL et al., 2017).

Após pressão imunológica do hospedeiro, os taquizoítos são convertidos em bradizoítos, tem cerca de 6 - 8 μm , dividem-se por endodiogenia e localizam-se dentro dos cistos teciduais. De acordo com o tempo de incubação no hospedeiro, os cistos teciduais variam quanto ao tamanho (30 – 107 μm) e quantidade de bradizoítos, podendo chegar a mais de 200 bradizoítos por cisto. Essa forma parasitária se desenvolve tanto no SNC (possuem formato mais arredondado e parede celular espessa de 4 μm) quanto nos músculos esqueléticos (formato mais alongado e parede celular mais fina) (LINDSAY; DUBEY, 2020; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).

Por fim, no intestino dos hospedeiros definitivos, os bradizoítos invadem as células intestinais e através da reprodução sexuada são convertidos em esporozoítos que se esporulam dentro dos oocistos. Os oocistos possuem formato oval, tamanho que varia de 10 a 12 μm e espessura da parede de 0.6 - 0.8 μm . Vale ressaltar que os oocistos são liberados não – esporulados no ambiente e, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade são esporulados com dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada, um processo denominado esporogonia. Os oocistos são a forma mais resistente do parasito, podendo sobreviver a diferentes temperaturas, condições e longos períodos no ambiente (LINDSAY; DUBEY, 2020; MCALLISTER et al., 1998).

1.1.4 Ciclo biológico e vias de transmissão

Os hospedeiros definitivos eliminam, através das fezes oocistos não esporulados que se tornam potencialmente infecciosos após esporogonia (Figura 3A). Quando ingeridos, os esporozoítos se convertem em taquizoítos, invadem e se multiplicam intracelularmente nas células do hospedeiro intermediário, infectando múltiplos órgãos (Figura 3B). A resposta imune protetora induz a conversão dos taquizoítos em bradizoítos e, dentro de cistos teciduais, se estabelecem nas células do tecido nervoso e músculos esqueléticos em estado latente (Figura 3C). Tais cistos podem ser ingeridos pelos hospedeiros definitivos e, no intestino desses animais, invadem e se proliferam nos enterócitos (Figura 3D). Através de reprodução assexuada (esquizogonia) e sexuada (gamogonia) dão origem aos oocistos não esporulados, que após algum tempo são liberados nas fezes dos hospedeiros definitivos (Figura 3E) (DUBEY et al., 2017; LINDSAY; DUBEY, 2020).

A forma de transmissão mais comum do *N. caninum* se dá a partir da ingestão de oocistos esporulados, por hospedeiros intermediários, na água e alimentos contaminados, a chamada transmissão horizontal. Além da transmissão horizontal tem-se também a transmissão vertical (ou congênita, Figura 3F) em que os cistos teciduais, antes em estado latente, são reativados e transmitidos ao feto, sendo denominada transmissão placentária endógena. Outra forma de infecção congênita do feto ocorre quando vacas prenhas, durante a gestação, se infectam e o parasito atravessa a barreira transplacentária, caracterizando a transmissão placentária exógena (DUBEY et al., 2017; TREES; WILLIAMS, 2005; WILLIAMS et al., 2009).

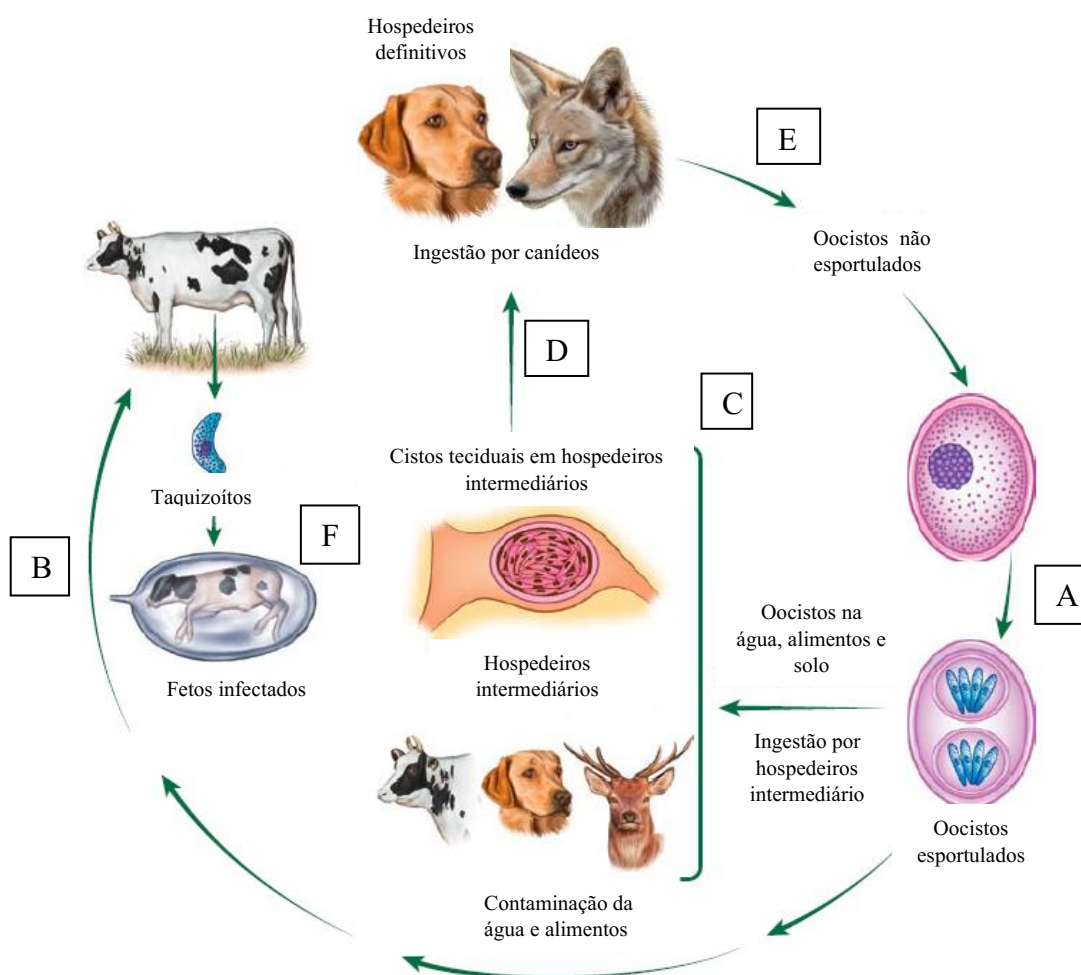


Figura 3 – Ciclo biológico de *N. caninum*: A: Esporulação de oocistos; B: Ingestão de oocistos por bovinos e conversão de oocistos em taquizoítos; C: Contaminação do ambiente com oocistos e conversão de taquizoítos em bradizoítos que se localizam dentro de cistos teciduais; D: Ingestão de cistos teciduais por hospedeiros definitivos; E: liberação de oocistos não esporulados no ambiente; F: Transmissão vertical de taquizoítos. (Adaptado de LINDSAY; DUBEY, 2020)

1.1.5 Patogênese da neosporose

As infecções por *N. caninum* em ruminantes adultos não causam sintomas clínicos aparentes. As principais manifestações clínicas da neosporose são abortamentos, mumificação e reabsorção fetal, natimortos e nascimento de fetos com complicações clínicas ou persistentemente infectados (BARBER et al., 1995; JARDINE; LAST, 1995). Outra característica comum de bovinos infectados por *N. caninum* são as repetições de cio. Bovinos jovens infectados congenitamente podem desenvolver problemas nos membros posteriores e anteriores, ataxia, hidrocefalia, perda de reflexos patelares, perda da consciência de propriocepção e estreitamento da medula espinhal (DONAHOE et al., 2015; DUBEY et al., 2017; REICHEL et al., 2014).

Em geral, os abortamentos relacionados a neosporose ocorrem entre o 5º e o 6º mês da gestação, o feto é mumificado, retido no útero e eliminado meses depois. Quando o abortamento ocorre antes dos 3 primeiros meses de gestação, o feto é reabsorvido no útero (DUBEY et al., 2017; DUBEY; SCHARES, 2011). Análises macroscópicas de fetos que foram abortados não revelam sinais claros que caracterizam a neosporose, mas possuem em comum focos de necrose no coração, pulmões, fígado e placenta. Análises microscópicas de tecidos demonstraram que quando o abortamento ocorre antes do 5º mês de gestação há lesões necróticas, enquanto que após o 5º mês as lesões inflamatórias são mais comuns, sendo encontradas principalmente no cérebro, coração, e fígado fetais, além da placenta (PESCADOR et al., 2007). Vale ressaltar que no cérebro as principais lesões encontram-se na substância cinzenta e na região do cerebelo. Lesões no fígado características de hepatite e miosites cardíacas também são frequentes (HELMAN et al., 1998)

Diferentemente dos ruminantes, os cães podem apresentar manifestações clínicas da neosporose quando jovens, idosos, gestantes ou imunossuprimidos. As principais manifestações clínicas acometem cães infectados congenitamente e surgem após 5-7 semanas do nascimento e apresentam-se como paresia e paralisia dos membros posteriores, atrofia muscular, polirradiculoneurite e poliomiosite. Em cães adultos, os sinais clínicos mais comuns são encefalite, meningoencefalomielite, miosite e paraparesia (BARBER; TREES, 1996; DUBEY et al., 2017).

A neosporose já foi identificada clinicamente em outros animais como cavalos adultos (DUBEY et al., 2001), rinocerontes (*Ceratotherium simum*) (SANGSTER et al.,

2010; SOMMANUSTWEECHAI et al., 2010; WILLIAMS et al., 2002), guaxinins (*Procyon lotor*) (LINDSAY et al., 2001), cervos de cauda negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) (WOODS et al., 1994), alpacas (*Vicugna pacos*), lhamas (*Lama glama*) (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2004), cabras (MESQUITA et al., 2013), ovelhas (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2014) e antílopes (*Tragelaphus imberbis*) (PETERS et al., 2001).

1.1.6 Epidemiologia

N. caninum possui uma ampla distribuição geográfica e, mesmo sendo um parasito que apresenta dificuldades de ser isolado, já foi identificado em diversos países do mundo tais como Estados Unidos, Reino Unido, Austrália, Argentina, Brasil, Nova Zelândia, Coréia, Japão, Malásia dentre outros (DUBEY et al., 2017). No Brasil, há vários estudos sorológicos descritos que tiveram como objetivo a detecção de anticorpos contra o parasito e, a partir desses estudos, é possível concluir que o parasito está distribuído em quase todos os estados e infectando uma vasta gama de hospedeiros (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).

Estima-se que as perdas econômicas causadas pela neosporose, principalmente para a pecuária, seja em torno de US\$ 1.298 bilhões podendo chegar a US\$ 2.380 bilhões por ano (REICHEL et al., 2013). Grande parte desses prejuízos são da indústria leiteira. Estudos recentes mostram que a maior prevalência do *N. caninum* estão concentradas na América do Norte e do Sul, ambas com 24% de positividade para as amostras analisadas. Já foi descrito que as maiores perdas econômicas devido a neosporose bovina também se encontram nessas duas regiões sendo estas de US \$842,9 milhões na América do Norte e US\$ 239,7 na América do Sul (RIBEIRO et al., 2019).

Um dos principais fatores de risco de transmissão do *N. caninum* para a criação de ruminantes é a presença e a utilização de cães no manejo dos rebanhos. Os canídeos são os hospedeiros definitivos do *N. caninum* e estima-se que 17,4% dos cães do mundo todo estejam infectados com o parasito, sendo que a maior soropositividade foi encontrada nos países do continente africano (26,5%). Estima-se que cães de áreas rurais têm maior soropositividade (20 a 97%) quando comparados com os cães de área urbana (7 a 26%) (ANVARI et al., 2020). Essa maior prevalência na área rural se dá principalmente pelo fato de que esses cães se alimentam de restos de placenta, fetos que sofreram abortamentos, carcaças de bovinos que podem estar contaminadas, além de carne e leite

contaminados, completando assim o ciclo biológico (DUBEY et al., 2017; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Sabe-se que em várias regiões a principal via da transmissão do *N. caninum* é a transmissão endógena, que acontece em vacas que entraram em contato com oocistos ou tiveram cistos teciduais do parasito reativados durante a gestação e com isso transmitem para o feto. Altas taxas de soropositividade são registradas em fetos recém-nascidos provenientes de vacas soropositivas, demonstrando que o *N. caninum* consegue atravessar a barreira transplacentária com alta eficiência (DUBEY et al., 2017; THURMOND; HIETALA, 1997).

É importante destacar que uma das principais consequências da neosporose bovina são os abortamentos. Os abortamentos estão relacionados, principalmente, com a transmissão transplacentária exógena, geralmente causada por contaminação pontual de água e/ou alimentos contaminados. Em geral, esses surtos são temporários e 15% dos abortamentos acontecem em até 4 semanas, 10% em até 6 semanas e 12,5% em até 8 semanas (MOEN et al., 1998; SCHARES et al., 2002; WOUDA; BARTELS; MOEN, 1999). Há registros de surtos com consequentes abortamentos na mesma região por vários anos, sendo que estes se relacionam principalmente com a transmissão endógena do parasito (DUBEY et al., 2017).

1.1.7 Controle e prevenção

Os prejuízos causados pela neosporose são consideráveis e por isso são necessárias medidas de controle da infecção para minimizar tais efeitos. Para diminuir a transmissão horizontal do gado bovino, uma das principais medidas a serem adotadas é evitar o contato dos cães com instalações de manejo do gado bovino, principalmente em áreas de estocagem e distribuição de água e alimentos (DUBEY et al., 1988a; GONDIM et al., 2004). Sabe-se que fazendas que produzem o alimento do gado, como a silagem, têm uma maior soropositividade para *N. caninum*. Além disso deve-se evitar o contato do gado com outros possíveis hospedeiros intermediários do parasito como roedores e aves (BARTELS; WOUDA; SCHUKKEN, 1999).

Outra medida preconizada é realizar testes sorológicos antes da compra do gado, com a intenção de se verificar a presença de anticorpos específicos contra *N. caninum* e, assim, evitar a introdução do parasito no rebanho. A eliminação dos animais positivos dentro dos rebanhos também é uma opção para se evitar a transmissão endógena na propriedade.

Em consonância, preconiza-se também a transferência de embriões utilizando receptoras soronegativas (DUBEY; SCHARES, 2011; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A medida ideal para o controle da neosporose seria a vacinação ampla dos rebanhos e cães. Contudo, a única vacina já licenciada foi retirada do mercado devido a sua baixa eficácia (ROMERO; PÉREZ; FRANKENA, 2004).

Protocolos vacinais têm sido testadas em bovinos utilizando-se taquizoítos atenuados, onde constatou-se uma forte resposta imune após o protocolo vacinal, porém a eficácia após o desafio com parasitos viáveis não se mostrou efetiva (ROJO-MONTEJO et al., 2013; WEBER et al., 2013). Outros estudos têm utilizado taquizoítos lisados em associação com adjuvantes para induzir proteção, protocolos esses que induzem uma alta produção de IFN- γ e IgG1, porém também induzem baixos níveis de proteção após o desafio (HORCAJO et al., 2016). Por fim, tem-se buscado estratégias de imunização com subunidades do parasito, como proteínas recombinantes (NcGRA7, NcSAG1, NcHSP20, dentre outras) associadas a adjuvantes. Em geral, tais protocolos de imunização induzem uma forte resposta imune humoral em vacas prenhas, mas estes também não foram capazes de proteger a infecção do feto (HORCAJO et al., 2016; NISHIKAWA et al., 2018). Uma das vacinas mais promissoras em bovinos utiliza profilinas do *N. caninum* associadas a epítomos de células T derivados do vírus da estomatite vesicular (rNcPRO/G) e agonistas dos receptores *toll-like 2* e *9* (TLR2 e TLR9). As imunizações com esta vacina foram capazes de induzir uma resposta imune humoral efetiva bem como a produção de IFN- γ sistêmica (MANSILLA et al., 2016a; MANSILLA; CAPOZZO, 2017).

1.1.8 Diversidade de isolados do parasito e seus hospedeiros

Atualmente, há um número razoável de relatos de isolados de *N. caninum* no mundo, sendo estes obtidos de diferentes hospedeiros. O primeiro isolado, denominado Nc-1, foi obtido a partir de amostras teciduais de cachorros labradores, nos Estados Unidos, que apresentavam sinais clínicos da neosporose. Estas amostras foram inoculadas em culturas de células, camundongos e outros cães e conseguiu-se recuperar parasitos de todas as infecções (DUBEY et al., 1988b).

O próximo isolado de *N. caninum* foi obtido no Hospital de pequenos animais da Universidade de Liverpool, Reino Unido, em 1995. Um cão da raça Boxer apresentava dificuldades de agachar e paresia grave dos membros posteriores e anteriores. Esses sinais

clínicos foram diagnosticados como sendo neosporose e o animal foi eutanasiado. O homogenato das amostras do tecido cerebral foi adicionado em cultura de células e 5 dias depois os taquizoítos começaram a se replicar nas monocamadas. A confirmação de que o novo isolado era *N. caninum* foi feito por imunofluorescência e sequenciamento de genes específicos por PCR, comparando-se com Nc-1 (BARBER et al., 1995).

Até o presente momento, já foram obtidos isolados de *N. caninum* de seis espécies diferentes: bovinos, cães, ovelhas, búfalo asiático, veado-de-cauda-branca e cabras. A distribuição desses isolados é bem heterogênea sendo que, com exceção da África e Antártida, *N. caninum* foi isolado em todos os outros continentes (DUBEY et al., 2017). No Brasil, o primeiro isolado, Nc-Bahia, foi encontrado no cérebro de um cão infectado. Amostras desse tecido foram inoculadas em gerbilos e, após 3-4 meses de infecção, identificou-se cistos teciduais contendo bradizoítos no cérebro desses animais. Estes cistos foram cultivados em cultura de células e posteriormente confirmou-se que era *N. caninum* através de imuno-histoquímica e PCR (GONDIM et al., 2001).

Alguns trabalhos objetivaram a comparação da virulência entre diferentes isolados e sabe-se que Nc-Liv é uma das mais virulentas encontradas até hoje. Comparando-se Nc-1 e Nc-Liv *in vivo*, a cepa isolada em Liverpool demonstrou ser mais patogênica por causar maior mortalidade e danos teciduais em camundongos (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006). *In vitro*, Ortega-Mora e colaboradores compararam a virulência de Nc-Liv com outras 10 cepas isoladas de bovinos na Espanha (Nc-Spain 1-10) e apenas Nc-Spain 4H demonstrou ter um comportamento de invasão e proliferação semelhante ao de Nc-Liv (REGIDOR-CERRILLO et al., 2011). Comparando-se a taxa de invasão e proliferação de taquizoítos bem como o comportamento *in vivo* de infecção congênita, Nc-Liv juntamente com Nc-Bahia demonstraram ser mais virulentos quando comparados a outras 4 cepas (Nc-Ger2, Nc-Ger3, Nc-Ger-6 e Nc-6 Arg). Tal virulência está relacionada com a forma de obtenção dos parasitos visto que as cepas mais virulentas foram obtidas a partir de tecidos de cães com sinais neurológicos e as menos virulentas de oocistos eliminados nas fezes de cães sem sinais clínicos (DELLARUPE et al., 2014)

Além de comparações *in vivo* e *in vitro*, alguns grupos têm buscado encontrar diferenças proteômicas entre cepas de *N. caninum*. Recentemente Ortega-Mora e colaboradores comparam 3 cepas sabidamente mais virulentas (Nc-Bahia, Nc-Spain 4H e Nc-Spain 7) com outras 3 cepas menos virulentas (Nc-Ger6, Nc-Spain2H e Nc-Spain1H). Proteínas relacionadas ao metabolismo e fornecimento de energia foram as

que demonstraram ter maior expressão nas cepas mais virulentas. Além disso, proteínas da família ROP20, GRAs e proteínas relacionadas a DNA polimerase também tiveram maior expressão nas cepas mais virulentas (RICO-SAN ROMÁN et al., 2020).

1.1.9 *N. caninum* em aves

Como descrito na seção 2.1.4 o parasito *N. caninum* possui diversas espécies de animais como hospedeiros intermediários, porém as aves ainda não têm o seu papel bem definido no ciclo biológico do parasito. Alguns estudos epidemiológicos demonstram que a presença de aves nas fazendas contribui com o aumento da soroprevalência e problemas reprodutivos no gado bovino (DE BARROS et al., 2018).

A primeira identificação natural do *N. caninum* em aves se deu em 2008 por um grupo de pesquisadores que avaliaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em 400 galinhas (*Gallus domesticus*) no estado da Bahia, Brasil. A soroprevalência foi de 12,5% (50/400) sendo que a maioria dos animais positivos era proveniente de criações livres. Além de anticorpos, também foi encontrado DNA do parasito em amostras teciduais em 6 de 10 desses animais (COSTA et al., 2008). Outro estudo realizado no Brasil, em 23 fazendas do Rio Grande do Sul, identificou a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em 36,5% (50/137) de galinhas criadas livres (CAMILLO et al., 2015). Estudos realizados no Irã, China e EUA também encontraram anticorpos anti *N. caninum* em galinhas, indicando que esses animais podem ser infectados naturalmente através de contato direto com o parasito no ambiente (COSTA et al., 2008; GONDIM et al., 2004; MARTINS; KWOK; DUBEY, 2011; SAYARI; NAMAVARI; MOJAVER, 2016).

Além da análise em galinhas, outras espécies de aves também foram estudadas para a identificação de anticorpos anti-*N. caninum*. Já foram encontrados anticorpos em pombas (*Zenaida auriculata*) (DE BARROS et al., 2017) e corvos (*Corvus corax*, *Corvus monedula* e *Corvus splendens*) (MOLINA-LÓPEZ et al., 2012) e detecção do parasito por PCR em pardais (*Passer domesticus*), pássaros selvagens, corvos e pombas (ABDOLI et al., 2015; DU et al., 2015; GONDIM et al., 2010; MINEO et al., 2011). Apesar do parasito já ter sido identificado em aves, nenhum grupo havia conseguido isolar *N. caninum* provenientes destas espécies até o momento.

Além das infecções naturais, com o objetivo de entender o comportamento do parasito em aves, infecções experimentais já foram realizadas em diversas espécies de aves. Pombas (*Columba livia*) infectadas com Nc-1 produziram anticorpos específicos após 5 dias da inoculação, atingindo o pico máximo 10 a 20 dias depois. Além disso, 1 animal morreu 25 dias em decorrência da infecção e foi identificado disseminação do parasito em diversos órgãos como pulmões, coração, SNC, fígado, baço e rins (MCGUIRE et al., 1999). Vale ressaltar que infecções experimentais de ovos de galinhas

e pombas com *N. caninum* também resultaram em disseminação do parasito para o coração, fígado e membrana cório-alantoide desses animais (FURUTA et al., 2007; MINEO et al., 2009b). Além disso, cães que foram inoculados com esses ovos infectados pelo parasito produziram anticorpos e eliminaram oocistos nas suas fezes (MUNHOZ et al., 2014). Por outro lado, vale ressaltar que as aves mostraram-se resistentes a *N. caninum*, como demonstrado em infecções experimentais de galinhas com 200 oocistos de Nc-SP1 onde não se detectou a soroconversão. Além disso, utilizando-se outro isolado proveniente de búfalos asiáticos, NcWTDMn1, em protocolos experimentais de infecção de galinhas, geraram baixos níveis de anticorpos detectáveis após 60 dias da inoculação e não foram identificados oocistos nos bioensaios (OLIVEIRA et al., 2018).

Portanto sabe-se que as aves são potenciais hospedeiros intermediários do *N. caninum* e que o estudo desse modelo de infecção é de suma importância. As aves se alimentam no chão, muitas vezes de restos de alimentos, são criadas soltas em muitas fazendas e têm os canídeos como um de seus principais predadores contribuindo para a manutenção do ciclo de vida do parasito e a sua conseqüente transmissão. Apesar de já se ter identificado *N. caninum* em tecidos de aves, nenhum parasito vivo foi identificado até o momento, diferentemente de *T. gondii* em que o isolamento de novas cepas em aves é bem frequente (Dubey et al 2021).

1.1.10 Caracterização de novos isolados de *N. caninum*

Ao contrário de outros parasitos do filo Apicomplexa que tem o seu ciclo biológico bem definido, o ciclo de *Nesopora caninum* ainda possui algumas lacunas que precisam ser elucidadas. Para a identificação e caracterização de novos isolados de *N. caninum*, diversas técnicas podem ser utilizadas, dentre elas o sequenciamento de nova geração (NGS). Nos últimos 20 anos, houve avanços significativos que modernizaram as análises genômicas e o NGS tem sido utilizado no diagnóstico de doenças e no sequenciamento total de genomas, inclusive o genoma humano. Através do NGS a posição exata dos nucleotídeos do DNA analisado é identificada a partir de bilhões de fragmentos. Um dos diferenciais dessa técnica é a geração de fragmentos maiores, tecnicamente denominados *reads*, comparado aos sequenciamentos genômicos anteriores, tornando o alinhamento mais acurado (CALARCO; BARRATT; ELLIS, 2020)

Sabe-se que mutações em regiões codificantes e não codificantes do *N. caninum* resultam em divergências genéticas que vão se acumulando e culminam em divergências populacionais. Essas diferenças podem ser caracterizadas em níveis moleculares através

da identificação de *single nucleotides polymorphisms* (SNPs), inserções e deleções (InDels), variantes estruturais (SVs), transversões, variação no número de cópias gênicas, inversões e duplicações. Recentemente, (KHAN et al., 2019) fizeram a comparação de SNPs entre isolados do gênero *Neospora* e identificaram 2 clusters populacionais com uma distância significativa entre os isolados de *N. caninum* e *N. hughesi*. Além disso foi possível visualizar que os cromossomos III, VI, VIIb, IX, XI e XII são os que possuem a maior quantidade de polimorfismos.

Atualmente existem cerca de 159 isolados de *N. caninum* obtidos em bovinos, ovelhas, búfalo-asiático, veado-de-cauda-branca, cabra e cães em diversos países. Inicialmente, técnicas sorológicas como imunofluorescência (IFAT) e ELISA são utilizadas para a triagem de animais por meio da identificação da soropositividade. Quando isolado dos tecidos, a análise molecular de amostras é crucial e para isso utiliza-se a comparação de genotípica de regiões ribossômicas como 18S, a região do espaçador interno transcrito, ITS1, bem como a amplificação do gene Nc5, que é específico de *N. caninum* (DUARTE et al., 2020). ITS1 é um fragmento adjacente aos genes codificadores de DNA ribossômico como 18S e 5.8S em eucariotos e diversos trabalhos foram bem-sucedidos ao utilizar ITS1 para análises filogenéticas de espécies próximas. Esse marcador é universal em eucariotos e possui diversas cópias no genoma desses organismos podendo ser eficientemente localizados (ALVAREZ; WENDEL, 2003).

Para a diferenciação de cepas e isolados de parasitos do filo Apicomplexa, utiliza-se também marcadores mini e microssatélites. Esses marcadores são sequências pequenas e repetitivas de regiões codificantes e não codificantes do genoma, altamente polimórficas, que contribuem para a diferenciação intra-espécies. Esse tipo de genotipagem já foi utilizada com sucesso em organismos como *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2002), *C. parvum* e *C. hominis* (MALLON et al., 2003), *Plasmodium falciparum* (ANDERSON et al., 2000) e *Theileria parva* (OURA et al., 2003). Em *N. caninum*, primeiramente, foram descritos 13 marcadores de microssatélites de 8 isolados do parasito (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006) e, desde então, diversos trabalhos têm utilizado estes marcadores como forma de caracterização e agrupamento dos diversos isolados obtidos (CABRERA et al., 2019; DORSCH et al., 2020; MEDINA-ESPARZA et al., 2016; REGIDOR-CERRILLO et al., 2020).

1.2 Resposta imune contra *N. caninum*

Os principais modelos de estudo da resposta imune do *N. caninum* são células bovinas e murinas, com a intenção de se elucidar o controle da infecção (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Sabe-se que no organismo dos hospedeiros este parasito tem como mecanismo de sobrevivência a invasão celular para evadir do sistema imune do hospedeiro.

A primeira linha de defesa contra o *N. caninum* é física e se dá por via oral, sendo representada por enterócitos e espessas junções intercelulares da mucosa intestinal, que visam diminuir a invasão parasitária (BUZONI-GATEL et al., 2006). Análises recentes do tecido intestinal de um cão jovem infectado naturalmente com *N. caninum* detectaram infiltrados de eosinófilos, macrófagos, além de hemorragias multifocais que contribuíram para a atrofia e necrose desse tecido. Além disso, foram encontradas estruturas semelhantes a oocistos e esquizontes no epitélio, indicando a importância de uma resposta imune nas células intestinais dos hospedeiros (KUL et al., 2015).

Em camundongos já foram identificadas vias imunes inatas importantes para a resistência do hospedeiro, sendo os macrófagos e as células dendríticas as principais células envolvidas neste processo. Sabe-se que *N. caninum* induz um intenso recrutamento de macrófagos durante infecções *in vivo* e que camundongos que tiveram seus macrófagos intraperitoneais depletados são muito susceptíveis à infecção (ABE et al., 2014; FERREIG; NISHIKAWA, 2020). Os receptores Toll-like (TLRs) são um tipo de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que tem como função o reconhecimento de proteínas de superfície de patógenos, os chamados PAMPs e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs do parasito, uma resposta antígeno específica é iniciada pelas células T que se diferenciam em uma resposta Th1, Th2 e Th17.

O principal tipo de resposta relacionada a resposta imune contra *N. caninum* é pró-inflamatória do tipo Th1. Como mostrado na **Figura 4** as células NK induzem a produção de interferon gama (IFN- γ) e essa produção é continuada pelos linfócitos TCD4+. Outra citocina que possui grande relevância é IL-12, pois induz a ativação de TCD4+ e TCD8+ e em conjunto com IFN- γ , criam um ambiente pró-inflamatório essencial ao combate do parasito impedindo sua replicação, destruindo as células infectadas, neutralizando os parasitos extracelulares e induzindo a formação de cistos

teciduais (DONAHOE et al., 2015; INNES et al., 2005; KHAN et al., 1997; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Um dos receptores envolvidos na resposta do tipo Th1 é o TLR11 que reconhece proteínas localizadas na região apical de *N. caninum*, as chamadas profilinas (JENKINS et al., 2010; MANSILLA et al., 2016b). Além de TLR11, durante a invasão dos macrófagos o parasito ativa a via de TLR2, que associado a molécula adaptadora MyD88, induz a transcrição de NF- κ B e contribui para a secreção de IL-12 (MINEO et al., 2009a, 2010a). Essa citocina auxilia a ativação de células natural killer (NK) e diferenciação dos linfócitos T em TCD4+. Os linfócitos TCD4+ bem com as células NK secretam IFN- γ , que culmina na ativação de óxido nítrico sintetase (iNOS), uma enzima essencial para a produção de óxido nítrico (NO). NO é um importante regulador citotóxico da replicação intracelular do parasito que auxilia também, na indução de uma infecção latente (ABDUL-CADER; AMARASINGHE; ABDUL-CAREEM, 2016; BARROS et al., 2019; BRAKE, 2002).

Vale destacar que *N. caninum* ativa também receptores endossomais, como TLR3, que recruta a molécula adaptadora TRIF para ativar o fator de transcrição interferon tipo 3 (IRF3) e induzir a produção de interferon tipo I (α/β). Tais moléculas são essenciais para a indução da citocina IL-12, para o controle do parasito e redução da inflamação tecidual em camundongos (**Figura 4**) (BEITING et al., 2014; MIRANDA et al., 2019).

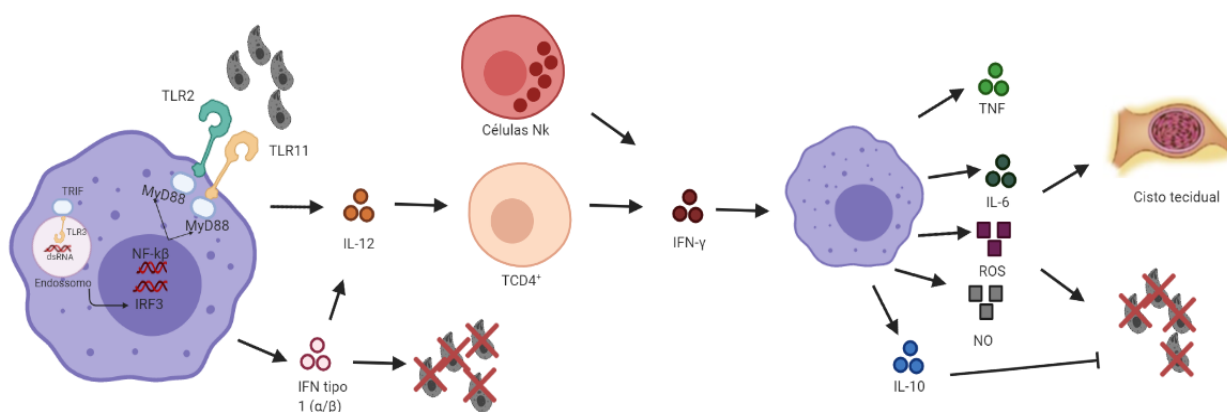


Figura 4: Modelo da resposta imune celular contra *N. caninum*. Receptores TLR2 e TLR11 quando ativados se ligam a molécula adaptadora MyD88 ativando o fator de transcrição NF- κ B a produzir IL-12 e posteriormente IFN- γ para induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), importantes na eliminação de parasitos e na indução de cistos teciduais. Para conter os danos teciduais causados pela intensa inflamação, IL-10 é secretada. TLR3 quando ativado se liga a molécula adaptadora TRIF ativa o fator de transcrição IRF3 e estimula a produção de IFN- tipo I que contribui para a eliminação de parasitos extracelulares e exacerba a produção e IL-12.

Outro tipo de receptor envolvido da resposta imune contra *N. caninum* é o receptor de quimiona cisteína-cisteína 5 (CCR5) localizado principalmente em células T, macrófagos, células dendríticas e eosinófilos. Ciclofilinas presentes nos antígenos secretados/excretados pelo *N. caninum* atuam como quimiocinas atraindo células do sistema imune, principalmente células monocíticas, para o sítio da infecção, as quais o parasito utiliza para infectar e se disseminar pelo organismo do hospedeiro (MINEO et al., 2010b)

Receptores citoplasmáticos, como os receptores do tipo Nod (NLR), também têm sido estudados quanto ao seu papel na resposta imune inata contra *N. caninum*. O receptor citoplasmático NOD2, apesar de controlar o parasitismo a partir da indução de citocinas como TNF e IL-6, aumenta a patogênese e a inflamação dos tecidos dos hospedeiros (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). Ainda sobre receptores citoplasmáticos, é importante destacar que a ativação do inflamassoma pelos sensores NLRP3 e NLRC4 junto com a molécula adaptadora ASC e o complexo caspase 1/11, limitam a replicação parasitária. Quando ativado durante a fase aguda, pró-IL-1 β e pró-IL-18 são clivadas por caspase-1/11 e secretadas no microambiente inflamatório, auxiliando na limitação da replicação parasitária e contribuindo para a ativação e fatores da imunidade Th1 como, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS) (MOTA et al., 2020; WANG et al., 2017, 2019).

Alguns mecanismos de evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro já foram descritos em modelos murinos. Dentre eles podemos destacar a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) em que proteínas do parasito são reconhecidas por receptores acoplados a proteína G, que ativam a via PI3K/AKT, fosforilando p38 e reduzindo a secreção da citocina IL-12 (MOTA et al., 2016). Outro mecanismo de evasão do parasito é a ativação do receptor Dectina-1, que induz uma menor secreção de IL-12 e ROS, dois fatores cruciais no controle da replicação parasitária (DA SILVA et al., 2017).

Além de citocinas pro-inflamatórias, a resposta imune contra *N. caninum* também é marcada pelo aumento de citocinas regulatórias como IL-10 e IL-4. IL-10 é uma citocina anti-inflamatória responsável pela recuperação tecidual de hospedeiros infectados, mas também está associada a um aumento da proliferação parasitária. Já IL-4 tem sido identificada principalmente em camundongos gestantes e infectados com *N. caninum*, sendo uma das citocinas responsáveis por controlar os danos inflamatórios

gerados pela infecção e possíveis causadores de danos fetais (ALMERIA; SERRANO-PEREZ; LOPEZ-GATIUS, 2017; LONG; BASZLER, 2000).

Além da resposta imune celular, alguns mecanismos da resposta imune humoral já foram descritos. Sabe-se que camundongos geneticamente deficientes para a produção de linfócitos B (*MicroMT*) são mais susceptíveis à infecção por *N. caninum* quando comparados ao selvagens (WT) (EPPERON 1999). A primeira classe de imunoglobulina produzida é a IgM, precedendo a produção de anticorpos IgG, IgE e IgA específicos, dentre os quais as IgGs são produzidas em maior quantidade (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). O *switch* de classe dessas imunoglobulinas é induzido principalmente pelo o complexo de histocompatibilidade II (MHCII) presente em células apresentadoras de antígenos que determinará o perfil de citocinas e o isótipo de Ig secretado (SILVA, 2017). Para tanto, antígenos interiorizados, processados e apresentados aos linfócitos TCD4⁺ contribuem para a expansão clonal. Este fato culmina na secreção de tais citocinas que induzem a proliferação e diferenciação de células B (UNANUE et al 2016).

Estima-se que em bovinos, os anticorpos IgM atinjam seu pico máximo com 2 semanas, caracterizando a fase aguda da doença. As concentrações de IgG se mantêm elevadas por 3-6 meses, mas persistem em menores níveis por toda a vida do hospedeiro (GUIDO et al., 2016). Durante a infecção em camundongos por *N. caninum*, citocinas pró-inflamatórias estimulam a maior produção de anticorpos do tipo IgG2a e IgG3 (ANDRIANARIVO et al., 2005), enquanto a resposta imune do tipo Th2, com secreção predominante de IL-4, favorece a produção da subclasse IgG1 (ROJO-MONTEJO et al., 2009). Vale ressaltar que as moléculas MyD88 e iNOS são cruciais para a produção da subclasse de IgG2a e reconhecimento antigênico do antígeno solúvel do *N. caninum* (NLA) (SILVA, 2017).

2 Justificativa

A neosporose é uma doença causada pelo parasito *N. caninum* e traz perdas econômicas para a pecuária tanto leiteira quanto de gado de corte, pois induz abortamento em bovinos. Esta doença já foi identificada em 45 países, com prejuízos que podem chegar a 2,4 bilhões de dólares anualmente (DONAHOE et al., 2015). No Brasil estima-se que essa perda anual seja em torno de 51,3 milhões de dólares (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017). Por muito tempo esta doença permaneceu silenciosa, sendo muitas vezes diagnosticada erroneamente, mas com os avanços da ciência, novos modelos passaram a identificar esse parasito e as características da neosporose.

Trabalhos anteriores já identificaram que as aves são reservatórios do *N. caninum* (DE BARROS et al., 2018; DU et al., 2015; FURUTA et al., 2007; NARDONI et al., 2019), porém, o presente trabalho é pioneiro no isolamento deste parasito em aves. O desconhecimento da neosporose por parte dos produtores rurais é um dos grandes responsáveis pela disseminação do *N. caninum*. Por isso, o isolamento de *N. caninum* em galinhas reforça a ideia de que é preciso criar medidas de isolamento entre bovinos, cães e aves nas propriedades rurais para conter a transmissão do parasito.

Além disso, utilizou-se neste trabalho o sequenciamento de nova geração (NGS) para a descrição genômica deste novo isolado, Nc-UDI4. O uso de NGS no estudo de *N. caninum* ainda é limitado, porém, sabe-se que o uso desta técnica possibilita a obtenção de dados aprofundados acerca deste parasito que permitem a identificação de polimorfismos, inserções e deleções entre os isolados e genomas de referência. Vale ressaltar que se realizou uma comparação geral entre o genoma do novo isolado e o genoma de referência e não apenas de regiões específicas, como tem sido descrito na literatura nos últimos anos.

Neste sentido, buscou-se ainda verificar as diferenças de virulência entre isolados, pois sabe-se que os danos causados pelo parasito variam de acordo com o tipo de hospedeiro em que é feito o isolamento. Por isso, comparou-se biologicamente Nc-UDI4 e outros dois isolados que já possuem um comportamento *in vivo* bem descrito, Nc-Liv e Nc-1. Desta forma, identificou-se diferenças de virulência entre estes isolados e mecanismos que contribuem para tais comportamentos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente um novo isolado de *N. caninum* obtido em galinha (Nc-UDI4) e comparar sua virulência e potencial de indução de resposta imune em modelo murino com isolados de referência.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o genoma de Nc-UDI4 através de sequenciamento de nova geração (NGS).
- Comparar Nc-UDI4 filogeneticamente com genomas de referência de organismos do filo Apicomplexa e outros isolados de *N. caninum* através de marcadores de microssatélites.
- Caracterizar os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), as inserções e deleções (InDels) de Nc-UDI4 utilizando o genoma de referência de Nc-Liv.
- Avaliar a sobrevivência, morbidade, carga parasitária, inflamação e produção de anticorpos de camundongos infectados com Nc-UDI4, Nc-1 e Nc-Liv.
- Comparar a produção de citocinas de camundongos infectados com Nc-UDI4, Nc-1 e Nc-Liv durante a fase aguda da infecção.

4 Materiais e métodos

4.1 Obtenção do isolado Nc-UDI4

O isolado Nc-UDI4 foi obtido do banco de células do Laboratório de Imunoparasitologia “Mário Endsfeldz Camargo”. O isolamento foi feito em um projeto anterior desenvolvido por membros do laboratório, conforme descrito no trabalho de (COSTA, 2016). Este trabalho buscava identificar a presença de anticorpos anti-*T.gondii* em galinhas criadas de forma extensiva em diversos pontos da zona urbana de Uberlândia e, no caso de positividade com altos títulos de anticorpos, prosseguiram para a tentativa de se isolar novas cepas do parasito. Uma dessas galinhas, além de possuir anticorpos anti – *T. gondii*, também apresentou altos títulos de anticorpos anti – *N. caninum* (DA COSTA - em preparação). A virulência deste novo isolado foi testada em camundongos comparando-se com cepas de *T. gondii*, mas o seu comportamento de virulência demonstrou ser muito discrepante em relação às outras cepas. Portanto, para o presente trabalho, buscamos verificar se estes parasitos isolados pertenciam ao gênero *Toxoplasma* ou *Neospora*, prosseguindo com caracterização genética e biológica conforme descrição a seguir.

4.2 Delineamento experimental

Com o objetivo de caracterizar o isolado Nc-UDI4, infectou-se camundongos C57BL/6 fêmeas (n=5) com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* (Nc-UDI4 e Nc-Liv) e 1×10^3 de *T. gondii* (Tg-ME49) por via intraperitoneal (i.p.). O soro destes animais foi coletado 30 dias após a infecção (d.p.i) e a produção de IgG total foi quantificada frente aos antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA) e de *T. gondii* (STAg) através do ensaio imunoenzimático (ELISA). Além disso, o reconhecimento das proteínas de superfície de *N. caninum* e *T. gondii* por estes anticorpos foi visualizado através da reação de imunofluorescência indireta.

A partir da confirmação sorológica buscou-se a confirmação molecular da especificidade do novo isolado. Para isso, o DNA de Nc-UDI4, Nc-Liv e Tg-ME49 foi extraído, amplificado utilizando-se primers específicos de *N. caninum* (Nc-5) e *T. gondii* (Tg529) e o resultado foi visualizado em gel de agarose 2%. Após este passo de confirmação, o DNA genômico de Nc-UDI4 foi submetido ao sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando-se Illumina Hiseq3000 e os resultados foram alinhados com genomas de *N. caninum*, *N. hughesi*, *T. gondii*, *H. hammondi* e *S. neurona*. Utilizou-se o

software SnpEff para encontrar as diferenças de polimorfismos (SNPs), inserções e deleções entre o genoma de referência Nc-Liv e Nc-UDI4. Para a análise intra-espécie, 158 isolados de *N. caninum* foram comparados e agrupados por meio de 9 marcadores de microssatélites (MS4, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS8, MS10, MS12 e MS21).

Com base na caracterização genômica do isolado, prosseguiu-se com as comparações biológicas de Nc-UDI4 com os isolados de referência Nc-Liv e Nc-1. Primeiramente, avaliou-se o perfil de lise de placas dos três isolados através da infecção de fibroblastos murinos (NIH/3T3). Para as comparações *in vivo*, infectou-se camundongos C57BL/6 fêmeas (n=5) com dose letal de Nc-1, Nc-UDI4 e Nc-Liv (1×10^7 taquizoítos/animal) e avaliou-se a sobrevivência e morbidade. Para análise das infecções de fase aguda e crônica utilizou-se dose subletal (1×10^6 taquizoítos/animal).

Nas infecções de fase aguda foram coletados soro dos animais com 1, 3 e 7 d.p.i e fígado com 7 dias pós-infecção (d.p.i) para a dosagem de citocinas (IL-12p40, IFN- γ e IL-10) e quantificação da carga parasitária por qPCR. Nas infecções da fase crônica foram coletados o soro e o cérebro dos animais 30 d.p.i e avaliados o parasitismo por qPCR e imuno-histoquímica. O perfil inflamatório dos tecidos do fígado e cérebro foram visualizados através de análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina. A produção cinética de imunoglobulinas específicas foi avaliada em amostras sorológicas pelo método imunoenzimático ELISA indireto (IgG total, IgG1 e IgG2a).

4.3 Cultivo de parasitos

Células de fibroblastos murino NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; GIBCO, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com glutamina (2mM), antibiótico/antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina e 0,25 μ g/mL anfotericina B) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), e mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂, até atingirem confluência. Essas células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4) e *T. gondii* (Tg-ME49 e RH) e mantidas nas condições descritas, porém apenas com meio RPMI 1640, sem adição de SFB. Após lise parcial e a verificação da presença de grandes quantidades de vacúolos parasitóforos, as células remanescentes foram descoladas com o auxílio do *cell scraper*, o sobrenadante coletado, passado em seringa com agulha de 4mm e centrifugado a 1000 x g, por 10 minutos. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para as infecções dos camundongos. O

sedimento, rico em parasitos, foram estocados a -20 °C para posterior extração do DNA ou preparo dos antígenos solúveis.

4.4 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT), com 6-8 semanas de idade, fêmeas, foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C) e alimento e água *ad libitum*. Os manejos e cuidados com o bem-estar animal foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) através das resoluções normativas publicadas em seu eBook. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA / UFU) sob o protocolo de número 109/16 (ANEXO A).

4.5 Preparação do antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) e antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg)

Para preparação do antígeno solúvel de lisado de *N. caninum* (NLA), pellets de *N. caninum* (Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4) e *T. gondii* (RH) foram estocados, diluídos em PBS e tratados com coquetel de inibidores de protease (Complete Mini, Roche, Basel, Suíça), submetidos a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido de sonicação durante cinco minutos a 60Hz em banho de gelo. Posteriormente, os parasitos lisados foram submetidos à centrifugação (10.000 × g, 30 min, 4°C), o sobrenadante resultante coletado e a concentração proteica quantificada, utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Aliquotas de NLA e STAg foram armazenadas a -20°C até sua utilização nas reações imunoenzimáticas (ELISA).

4.6 Quantificação de anticorpos IgG anti-*N. caninum* por ELISA indireto

Para verificar a produção de anticorpos, camundongos C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 taquizoítos de Nc-Liv, Nc-UDI4 e Tg-ME49. O soro desses animais foram coletados 7 e 30 dias após a infecção. Para determinação da cinética

de anticorpos IgG utilizou-se a técnica do ELISA indireto. Microplacas de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com NLA e STAg na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato de sódio 0,06M (pH 9,6), e incubadas por 18 horas a 4°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) acrescidos de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-T-M5%). Amostras de soros dos animais infectados foram diluídas a 1:50 em PBS-T-M5% e incubadas por 1 hora à 37°C para detecção de IgG total. Para a quantificação das subclasses IgG1 e IgG2a as placas foram bloqueadas com PBS acrescidos de 1% de albumina sérica bovina (BSA – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). As amostras foram diluídas (1:25) para a detecção de IgG1 e IgG2a. Anticorpos específicos anti-IgG de camundongos marcados com peroxidase (1:1000; Sigma-Aldrich) e anti-IgG1 (1:4000) ou anti-IgG2a de (1:2000) de camundongo marcado com biotina (Caltag Lab, EUA) foram incubados por 1 hora a 37°C. Para a detecção de IgG1 e IgG2, os poços foram incubados com estreptavidina-peroxidase. A reação foi desenvolvida com 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônica) (ABTS, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, Washington, DC, EUA) e a densidade óptica (DO) determinada a 405 nm em leitor de placas (*SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA). Entre cada uma das etapas os poços foram lavados com 100µl de PBS-T por 5 vezes.

4.7 Imunofluorescência indireta

Taquizoítos de Nc-UDI4 e RH foram fixados com formol a 4% e plaqueados em poços de lâmina. Adicionou-se soros de camundongos infectados com Nc-UDI4, Nc-Liv e Tg-ME49 nas diluições de 1:25 e incubadas em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente as lâminas foram novamente lavadas com PBS e secas a temperatura ambiente para adição de anticorpos IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), como conjugado enzimático, na diluição 1:50. Após lavagens adicionais, as lamínulas foram montadas com glicerina tamponada e a fluorescência foi observada em microscópio de luz invertida, equipado com sistema de fotodocumentação (EVOSfl, Thermo Scientific).

4.8 PCR convencional

Amostras de Nc-UDI4, NcLiv e Tg-ME49 foram coletadas a partir de garrafas de cultura de células lisadas e o DNA foi extraído utilizando-se proteinase K. A reação de PCR convencional foi realizada de acordo com as instruções do kit TopTaq DNA polimerase (Qiagen, Germany). Água destilada foi usada como controle negativo. Os primers listados (Apêndice A) foram usados para a amplificação da região do gene Nc-5 (Np4/Np7) de *N. caninum* e Tg529 de *T. gondii*. Após a amplificação, os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 2% corados com SYBR® Safe para gel de DNA e visualizados no ChemiDoc MP Systems (BioRad).

4.9 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Para o sequenciamento total do genoma de Nc-UDI4, as células NIH/3T3 foram tratadas por 15 dias com Plasmocin (Invivogen), seguindo as instruções do fabricante, para a eliminação da possibilidade de contaminação das células hospedeiras com *Mycoplasma sp.* Posteriormente, as células foram infectadas com Nc-UDI4 e, após lise total, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 800 x g por 10 minutos. O DNA dos taquizoítos foi extraído utilizando-se o kit Promega Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (A2360) e ajustado para a concentração de 1.64 µg/µl. Este DNA foi submetido a um PCR convencional para verificação da amplificação de genes específicos de *Mycoplasma sp.*, células do hospedeiro (GAPDH) e *N. caninum* (Nc5) e o produto foi visualizado em gel de agarose 3%. Após a confirmação de que não houve amplificação de genes específicos de *Mycoplasma sp* e que a quantidade de células do hospedeiro era mínima, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento. O sequenciamento foi feito seguindo as instruções da empresa GENEWIZ, utilizando o sistema Illumina HiSeq3000, sendo a biblioteca de DNA construída a partir de *reads* pareadas de 150 bp.

4.10 Análise das sequências e parâmetros de qualidade

A avaliação dos parâmetros de qualidade e o mapeamento das sequências genômicas foram feitas na plataforma online Galaxy. As *reads* obtidas do sequenciamento eram do tipo *paired-end* e foram inicialmente trimadas utilizando Trimmomatic e a qualidade analisada por FastQC. Posteriormente, *reads* trimadas foram mapeadas com o genoma de referência Nc-Liv (ToxoDB) utilizando-se Bowtie2. As *reads* mapeadas no formato BAM foram filtradas utilizando SAMtools, a cobertura do genoma de referência foi analisada utilizando-se QualiMap BAM QC e posteriormente

visualizadas no software IGV. O arquivo BAM filtrado foi realinhado com o genoma de referência Nc-Liv e com outros genomas de referência do ToxoDB: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* e *Sarcocystis neurona*. A sequência FASTA foi extraída desse arquivo BAM e alinhada com as sequências FASTAQ de NcSpain7 (SRX5723129) e *Neospora hughesi* (NhOregon - SRX5723127) obtidas do NCBI. A porcentagem de alinhamento foi obtida a partir de SAM-stats (Figura 5).

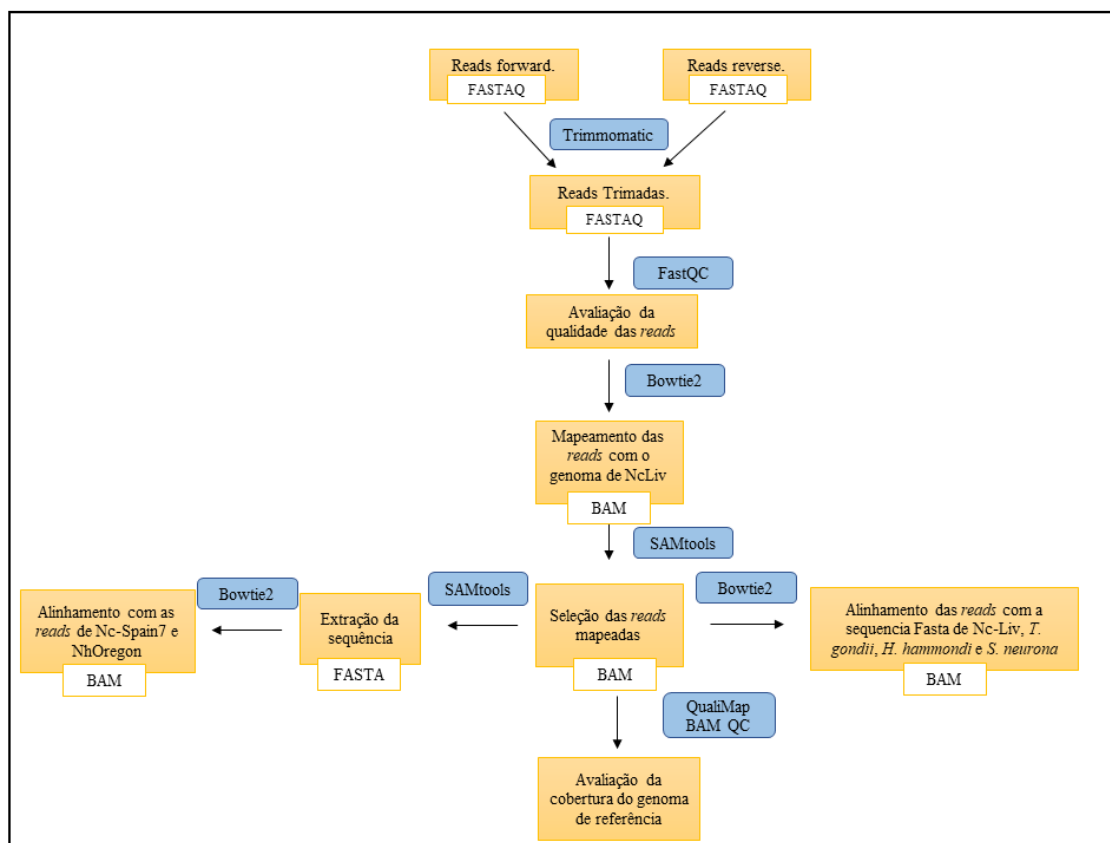


Figura 5 – Pipeline das análises do sequenciamento de nova geração (NGS)

4.11 Construção das árvores filogenéticas

Para a construção da árvore filogenética interespecie foi utilizado a região do espaçador interno transcrito (ITS1). As sequências foram obtidas do NCBI conforme a tabela 1. A busca dessas sequências no genoma de Nc-UDI4 foi feita utilizando-se a ferramenta BLAST e as sequências foram alinhadas no software online Clustal Omega. O método Neighbor joining foi utilizado para a construção da árvore filogenética através do software Splits Tree v.4.13.1.

Para a construção da árvore filogenética intra-espécie, 9 marcadores de microssatélites foram utilizados: MS4, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS8, MS10, MS12 e MS21. Os marcadores de microssatélites são sequências de nucleotídeos que se repetem ao longo do genoma dos organismos e possuem uma alta taxa de variação entre isolados da mesma espécie. Esses padrões de repetições de di e tri nucleotídeos foram categorizados de acordo com os dados do trabalho de (DORSCH et al., 2020). A busca dessas sequências no genoma de Nc-UDI4 foi feita utilizando a ferramenta BLAST e a contagem das repetições das sequências de dinucleotídeos e trinucleotídeos foi feita de forma manual. O perfil de repetição dos marcadores de microssatélites de 158 cepas de *N. caninum* foi obtida a partir dos dados do trabalho de (DORSCH et al. 2020) acrescidos dos alelos de Nc-UDI4, conforme mostrado no Apêndice B. Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o software Phyloviz online que tem como algoritmo goeBURST.

Tabela 1 – Referência das sequências utilizadas para análise de ITS1

Isolado	Marcador utilizado	Número das sequências – NCBI
<i>Neospora caninum</i> (Nc-Liv)	ITS1	AY259038.1
<i>Toxoplasma gondii</i> (Tg-ME49)		AY259045.1
<i>Sarcocystis neurona</i>		AF081944.2
<i>Hammondia hammondi</i>		AF076857.1
<i>Hammondia heydorni</i>		HQ542300.1
<i>Neospora hughesi</i> (Nh-Oregon1)		DQ997621.1

4.12 Identificação e anotação das variantes

Para a identificação das variantes, *reads* duplicadas foram marcadas utilizando-se o software MarkDuplicatesWithMateCigar e removidas utilizando RmDup. O arquivo BAM filtrado foi usado para gerar um arquivo pileup a partir de SAMtools. Esse arquivo foi filtrado com o objetivo de se obter variantes que possuíam bases com phred score >30

e cobertura >5 . O arquivo pileup foi submetido ao VarScan para a identificação de SNPs e InDels no formato vcf. Todos os passos descritos anteriormente foram feitos na plataforma Galaxy (Figura 6). Para a anotação e identificação do efeito das variantes foi usado SnpEff na plataforma VEuPathDB que já continha o genoma de referência e anotações do Nc-Liv (ToxoDB). Os SNPs e InDels foram divididos em blocos de 10kb e plotados em gráficos utilizando GGplot2. Os genes que continham mutações não sinônimas com efeito High e deleções foram selecionados e as funções gênicas foram analisadas utilizando ferramentas do ToxoDB e a plataforma InterPro Scan e plotadas utilizando o software Circos.

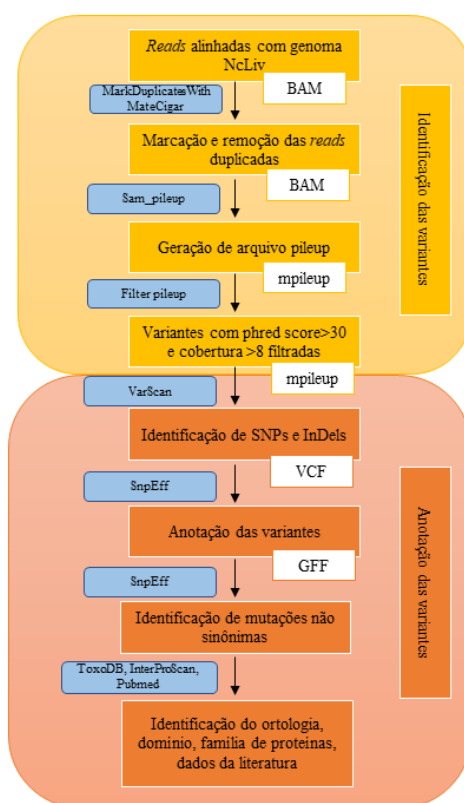


Figura 6 – Pipeline das análises de seleção e anotação das variantes

4.13 Ensaio de placa

400 taquizoítos de Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 foram adicionados a monocamadas confluentes de células NIH/3T3 em placas de seis poços. Todas as placas foram incubadas durante seis dias a 37°C e 5% de CO₂. Após 6 dias de infecção, os poços foram lavados com PBS e fixados com formol 4% 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, 10 fotos de cada poço foram tiradas utilizando o microscópio (EVOSfl, Thermo Scientific) no aumento de 4x e posteriormente o tamanho das placas foi mensurado com o auxílio do software Image J. Os ensaios foram feitos em duplicatas independentes.

4.14 Análise da sobrevivência e morbidade

Camundongos C57BL/6 foram infectados por via i.p. com dose letal de 1×10^7 taquizoítos/animal de Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 ou não infectados (NI), sendo mantidos dez camundongos por grupo. Os animais foram observados diariamente para avaliação de sinais clínicos como morbidade (alteração no peso corporal) e mortalidade. Todos os animais sobreviventes foram eutanasiados após 30 de infecção.

4.15 Quantificação da carga parasitária por qPCR

A carga parasitária foi quantificada em amostras de fígado e cérebro de animais WT infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 através da amplificação específica de cópias de DNA de *N. caninum* por meio de PCR quantitativo (qPCR-StepOne Plus, Applied Biosystems, EUA) utilizando-se sistema de detecção SYBR *green* (Promega, Madison, EUA) e normalizada com gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como previamente descrito (JOHNSON; WIDLANSKI,2004).

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

A reação foi realizada utilizando primers espécie - específicos. As reações para os genes Nc5 e GAPDH foram realizadas em tubos separados. Em ambos os casos, a mistura de

PCR (volume total de 25 μ l) continha *master mix* (GoTaq qPCR, Promega, Madison, WI, EUA), 10 pmol de cada primer e 100 ng DNA para a sequência de gene de Nc5 e 5 ng para a sequência de GAPDH. As curvas de diluição (fator de diluição x 10) para ambas as sequências foram preparados a partir de *N. caninum* e DNA genômico de camundongos extraído separadamente e usada para quantificação absoluta. Todas as amostras foram quantificadas em triplicada. A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de Nc-5 nas amostras comparado com a curva padrão. Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito/ μ g de DNA total.

4.16 Análise histológica e imuno-histoquímica

Amostras de tecido do fígado e cérebro de camundongos WT previamente infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 foram coletadas e fixadas em formol 10% tamponado com fosfato por 24 horas à temperatura ambiente, seguido da adição de álcool 70% e submetidas a procedimentos padrão de inclusão em parafina. Após a inclusão, os órgãos parafinizados foram seccionados a 5 μ m de espessura e depositados em lâminas microscópicas. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas para a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes foram fotografados utilizando-se o microscópio invertido automatizado (FSX100, Olympus, Japão) para posterior análise das alterações morfológicas teciduais (MIRANDA et al., 2019).

Os cortes do tecido cerebral também foram processados para a reação de imuno-histoquímica, com o objetivo de quantificar o parasitismo tecidual. Para isso, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de álcool e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos com peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Após a realização do resgate de sítios antigênicos com tampão citrato 0,2 M (pH 6,0) por 5 minutos em microondas, os sítios não específicos foram bloqueados com soro normal de cabra a 2% em PBS e, logo em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (*pool* de soros de camundongos infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 por 30 d.p.i) diluído 1:100 em PBS contendo BSA 1% por 18 horas a 4°C. Após duas lavagens de 5 minutos em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo marcada com biotina (Sigma Chemical Co.) diluído 1:200 em PBS por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, a reação foi amplificada pela incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase biotinilada diluído 1:250 em PBS durante 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com

substrato H₂O₂ a 0,03% e DAB (Sigma Chemical Co) e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas e examinadas em microscopia óptica (FSX100, Olympus, Japão).

4.17 Quantificação de citocinas

As concentrações de IFN- γ , IL-12p40 e IL-10 foram mensuradas em amostras de soro e homogenatos de fígados (100 mg de tecido) de camundongos WT infectados ou não com taquizoítos de Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 via i.p. A quantificação das citocinas foi realizada a partir de kits de ELISA comerciais, conduzidos de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA).

Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (Corning Laboratories Inc, New York, EUA) foram revestidas com anticorpos de captura anti-camundongos específicos para IFN- γ , IL-12p40 e IL-10 e incubadas overnight a 4°C. Posteriormente, para bloquear os sítios inespecíficos, foi adicionado a placa 10% de soro fetal bovino em PBS 0,01M (pH 7,2) por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, curvas padrões das respectivas citocinas em diluições seriadas e amostras a serem testadas foram acrescidas as placas e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Para a quantificação da presença das citocinas nas amostras, anticorpos de detecção anti-citocinas murinas conjugadas com biotina e acrescidos de estreptavidina-peroxidase foram incubados por 1 hora. Entre cada passo, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A reação foi desenvolvida com tetrametilbenzidina (TMB) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para interromper a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada a 450 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax M2e, Molecular Devices, EUA). A concentração das citocinas foi determinada a partir da curva padrão com concentrações conhecidas de citocinas, e os resultados foram expressos em pg/ml, de acordo com os limites de detecção para cada ensaio: IFN- γ (4,1 pg/mL), IL-12p40 (15,6 pg/mL) e IL-10 (4 pg/mL).

4.18 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 foram 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% CO₂. 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% CO₂ 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 ressuspensa em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o layout experimental.

4.19 Infecção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

1x10⁶ BMDMs/mL foram plaqueados em placas de 96 poços e infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 (*Multiplicity of infection* - MOI 0,5) e mantidos em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 18 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior análise de citocinas.

4.20 Análise estatística

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

5 Resultados

5.1 Caracterização do isolado Nc-UDI4 por meio da produção de anticorpos específicos para *N. caninum* e amplificação de Nc5 por PCR

Conforme descrito no tópico 4.1, obtivemos Nc-UDI4 a partir do banco de células do laboratório e, devido às semelhanças morfológicas e antigênicas entre *N. caninum* e *T. gondii*, iniciou-se o presente trabalho caracterizando Nc-UDI4 através de ensaios sorológicos, moleculares e genotípicos comparando com Tg-ME49, RH e Nc-Liv.

Para avaliar a produção de anticorpos específicos de *N. caninum* e/ou *T. gondii*, camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 taquizoítos/animal de Nc-UDI4 e Nc-Liv e 1×10^3 taquizoítos/animal de Tg-Me49 por 30 dias. O soro desses animais foi testado frente aos antígenos de *N. caninum* (NLA) e *T. gondii* (STAg), conforme mostrado na Figura 7A. Os animais infectados com Tg-ME49 produziram altos níveis de anticorpos específicos contra STAg e uma quantidade significativamente menor reagiu com NLA, diferentemente dos anticorpos produzidos por Nc-UDI4 e Nc-Liv que reagiram em quantidades significativamente maiores com o antígeno de *N. caninum* comparados ao de *T. gondii*. Além disso, conforme representado na Figura 7B, anticorpos de Nc-Liv e Tg-Me49 foram testados quanto a reatividade às proteínas de superfície da cepa RH e Nc-UDI4. Foi notável que anticorpos produzidos por animais infectados com Nc-Liv se ligaram positivamente aos antígenos de superfície de Nc-UDI4 e não de RH e que os anticorpos produzidos por animais infectados com Tg-ME49 reagiram apenas com os antígenos de superfície de RH e não de Nc-UDI4, comprovando que Nc-UDI4 tem um perfil de reatividade mais semelhante a *N. caninum* comparado a *T. gondii*.

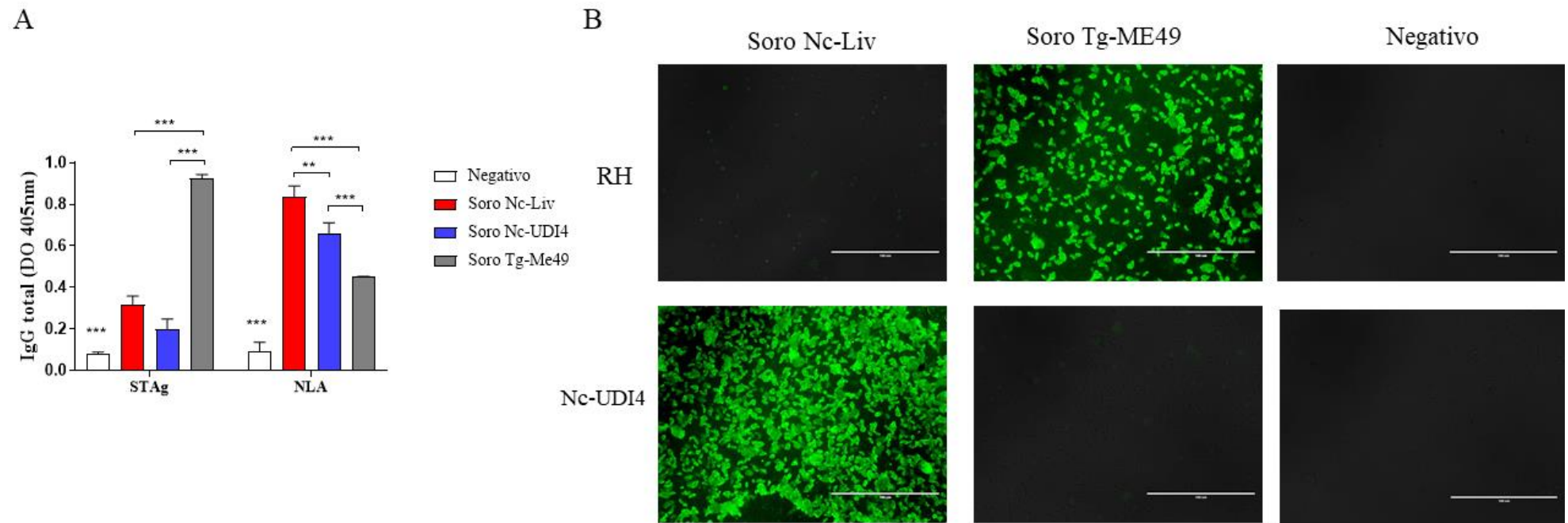


Figura 7 – Quantificação da produção de anticorpos IgG antígeno-específicos. Anticorpos antígeno-específicos (A) Soro de camundongos infectados com Nc-Liv, Nc-UDI4 e Tg-Me49 testados frente ao antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) e *N. caninum* (NLA). (B) Soro de camundongos C57Bl/6 infectados com Nc-Liv, Nc-UDI4 e Tg-Me49 testados frente a taquizoítos de *N. caninum*. A produção de anticorpos foi mensurada após 30 dias após infecção. Os valores são expressos como DO média \pm SEM, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

A caracterização molecular de Nc-UDI4 foi feita a partir da amplificação do DNA específico através de PCR convencional. Conforme representado nos géis das figuras 8A e 8B, o DNA dos controles positivos de *T. gondii* e de *N. caninum* amplificaram com os primers específicos Tg529 (94bp) e Nc5 (375bp), respectivamente. O DNA de Nc-UDI4 foi amplificado apenas com os primers de Nc5, onde foi observado uma banda de 375bp, sugerindo que Nc-UDI4 possui genes específicos de *N. caninum* e não de *T. gondii*.

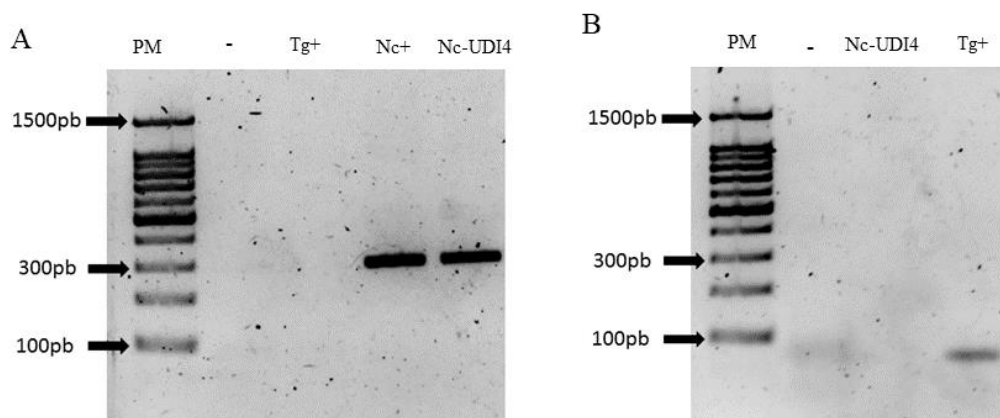


Figura 8 –Gel de agarose representando os produtos da amplificação de DNA por PCR. Padrão de peso molecular (PM) de 100bp. (A) Primers específicos de *N. caninum* (B) Primers específicos de *T. gondii*.

5.2 Sequenciamento de nova geração do genoma de Nc-UDI4 utilizando Illumina HiSeq – Avaliação da qualidade das reads

Como observado nos resultados anteriores, o novo isolado do cérebro de galinha, Nc-UDI4, pertence a espécie *N. caninum*. Para confirmar este resultado e avaliar as diferenças desse novo isolado em galinhas, até então não descrita na literatura, fez-se o NGS de Nc-UDI4 e comparou-se com o genoma de referência Nc-Liv. Após o sequenciamento obteve-se 2 arquivos de *reads* (Forward e Reverse) no formato FASTAQ com um total de 34GB. As *reads* foram trimadas e a qualidade das bases e sequências foram avaliadas. Obteve-se um total de 285827440 sequências divididas em *reads* de 150bp com 43% GC. O gráfico da Figura 9A permite a visualização dos valores de qualidade dos pares de base nas *reads*. As *reads* de ambos os arquivos FASTAQ tiveram uma média de phred score variando de 34 – 36, assim como as *reads* tiveram uma média de phred score de 36 (Figura 9B), demonstrando que a qualidade do sequenciamento obtido está excelente.

5.3 Mapeamento do genoma de Nc-UDI4 com genomas de referência

As *reads* trimadas foram alinhadas com o genoma de referência de Nc-Liv e obteve-se um total de 17365024 *reads* mapeadas, cobrindo 99,4% do genoma de referência com pelo menos 5 *reads* (Figura 9C). Foi extraído um arquivo BAM a partir do mapeamento anterior e esse arquivo foi alinhado com os genomas de referência de *H. hammondi*, *T. gondii* e *S. neurona* e as taxas de *reads* mapeadas foram respectivamente 11%, 10% e 3% (Tabela 2). Além do mapeamento com o genoma de referência Nc-Liv foi feito também o alinhamento com outro isolado de *N. caninum*, Nc-Spain7, e obteve-se uma taxa de 98,6%. Vale ressaltar que este genoma foi escolhido por estar disponível para uso no NCBI e ter uma alta qualidade. Para finalizar, alinhou-se o genoma de Nc-UDI4 com outra espécie do gênero *Neospora*, *N. hughesi*, e a taxa de mapeamento foi de 18%.

Portanto, a partir dos resultados mostrados, é possível concluir que Nc-UDI4 é de fato um novo isolado de *N. caninum*. As sequências obtidas conseguiram cobrir praticamente todo o genoma de Nc-Liv e Nc-Spain7 e as taxas de alinhamento com outras espécies filogeneticamente próximas foram muito inferiores.

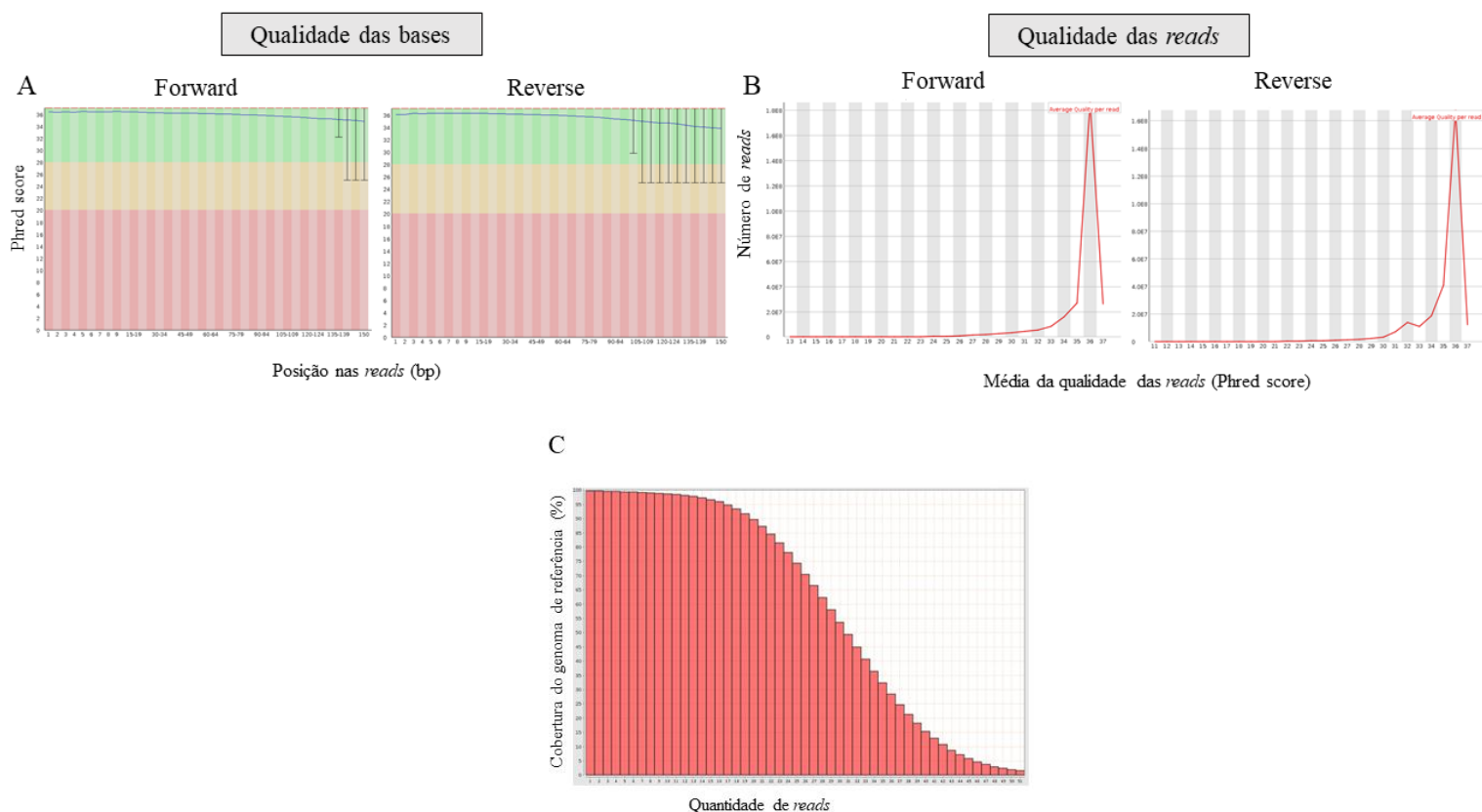


Figura 9 – Análise da qualidade e cobertura do sequenciamento de nova geração (NGS) de Nc-UDI4. (A) Análise da qualidade dos pares de base das reads forward e reverse. O eixo X representa a posição dos pares de base nas reads e o eixo Y o phred score. As linhas vermelhas representam o valor da mediana e a linha azul a média do phred score em cada posição das reads. A faixa vermelha indica phred score ruim (0 a 20), a amarela phred médio (21 a 28) e a verde phred score excelente (acima de 28). (B) Análise da curva da qualidade média das reads forward e reverse. O eixo X representa o score médio das reads e o eixo Y a sua frequência na leitura. (C) Representação gráfica da cobertura do genoma de referência Nc-Liv com as reads de Nc-UDI4. O eixo X mostra a quantidade de reads e o eixo Y a porcentagem do genoma de referência que está coberto. É possível visualizar que 99,4% do genoma de referência está coberto com pelo menos 5 reads do sequenciamento.

Tabela 2 – Análise do sequenciamento de nova geração com genomas de *N. caninum*, *N. hughesi*, *H. hammondi*, *T. gondii* e *S. neurona*. Todas as sequências foram mapeadas com as reads de Nc-UDI4.

Organismo	Reads mapeadas	Porcentagem do genoma mapeado	Referência
<i>Neospora caninum</i> (NcLiv)	1.73×10^7	99.4%	ToxoDB
<i>Neospora caninum</i> (NcSpain7)	1.02×10^8	98.6%	SRX5723129 – NCBI
<i>Neospora hughesi</i> (NhOregon)	1.4×10^7	18.3%	SRX5723127 - NCBI
<i>Hammondia hammondi</i>	1.9×10^6	11%	ToxoDB
<i>Toxoplasma gondii</i> (TgME49)	1.8×10^6	10.3%	ToxoDB
<i>Sarcocystis neurona</i>	5.4×10^5	3%	ToxoDB

5.4 Análise filogenética da região ITS1 entre espécies do filo Apicomplexa

Para a caracterização filogenética de Nc-UDI4, escolheu-se a região de ITS1 que codifica um espaçador interno do DNA ribossomal, ficando entre as regiões 18S e 5.8S. Apesar do DNA ribossomal ser bem conservado entre as espécies do gênero *Neospora* (DUBEY et al., 2001), a região de ITS1 é bem variável entre espécies do filo Apicomplexa e, por isso, foi utilizada para o alinhamento e construção da árvore filogenética.

Conforme mostrado na Figura 10B, 4 ramos principais foram criados com base no alinhamento das sequências de ITS1 de Nc-Liv, Nc-UDI4, *N. hughesi*, *H. hammondi*, *H. heydorni*, *T. gondii* e *S. neurona*. Foi possível visualizar que o ramo em que Nc-UDI4 se encaixou foi o das espécies do gênero *Neospora* e que ficou mais próximo de Nc-Liv com uma similaridade de 94,4%, conforme mostrado na matriz de identidade (Figura 10A).

ITS1

A

	<i>S. neurona</i>	<i>H. heydorni</i>	<i>T. gondii</i>	<i>H. hammondi</i>	Nc-UDI4	Nc-Liv	<i>N. hughesi</i>
<i>Sarcocystis neurona</i>	100.00	40.86	42.20	43.17	43.95	43.85	43.09
<i>Hammondia heydorni</i>	40.86	100.00	68.98	69.97	62.69	68.29	67.26
<i>Toxoplasma gondii</i>	42.20	68.98	100.00	95.66	70.76	73.97	73.20
<i>Hammondia hammondi</i>	43.17	69.97	95.66	100.00	73.20	75.00	73.71
Nc-UDI4	43.95	62.69	70.76	73.20	100.00	94.43	92.98
Nc-Liv	43.85	68.29	73.97	75.00	94.43	100.00	98.34
<i>Neospora hughesi</i>	43.09	67.26	73.20	73.71	92.98	98.34	100.00

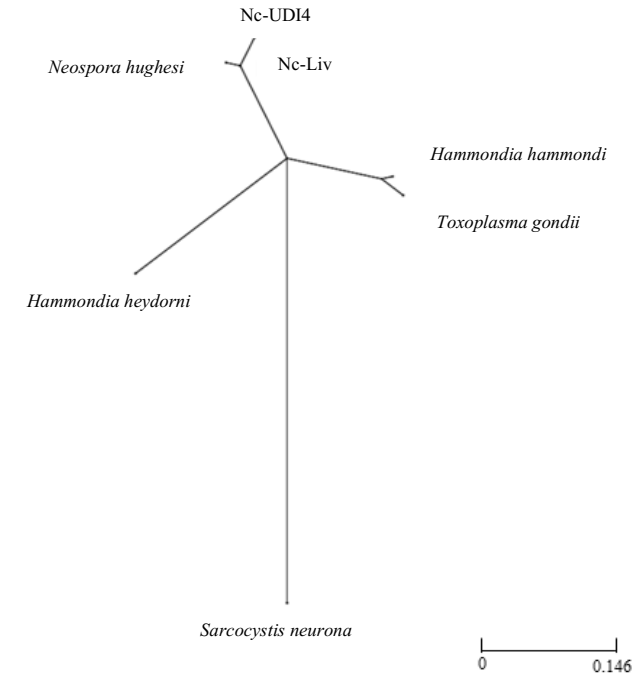


Figura 10 – Análise da região de ITS1 de organismos do filo Apicomplexa. (A) Matriz de identidade com as porcentagens do alinhamento de 7 sequências de ITS1 de organismos do filo Apicomplexa (*S. neurona*, *H. heydorni*, *H. hammondi*, Nc-UDI4, Nc-Liv e *N. hughesi*) utilizando Clustal Omega e Neighbour-net *p* distance. A coluna em destaque mostra que o alinhamento de ITS1 de Nc-UDI4 ficou mais próximo de Nc-Liv do que das outras sequências. (B) Árvore filogenética comparando o alinhamento da região de ITS1 das 8 sequências de organismos do filo Apicomplexa utilizando o método Neighbour-joining.

5.5 Comparação dos SNPs e InDels entre Nc-UDI4 e o Nc-Liv

Para fazer a comparação das variantes de Nc-UDI4 em relação a NcLiv, identificou-se os SNPs e InDELS nos diferentes cromossomos com uma cobertura de pelo menos 8 *reads*. Os cromossomos foram divididos em blocos de 10kb para que a densidade de variantes fosse mensurada. Foram identificados 24642 SNPS sendo 1 SNP a cada 2393 bp, um total de 14361 transições (A/G, C/T, G/A e T/C), 10281 transversões (A/C, A/T, C/G e G/T) e taxa TS/TV de 1.39. Os principais cromossomos afetados foram o Ia, II, VI, VIa e XI conforme observado na figura 11A. Os genes que tiveram maiores quantidades de alterações (> 100 SNPs) foram anotados, conforme a tabela do Apêndice C. No total caracterizou-se 45 genes dentre os quais podemos destacar genes relacionados a motilidade, localizados no complexo apical do parasito (*NCLIV_038810* e *NCLIV_064590*), genes da família SAG (*NCLIV_034380*, *NCLIV_034390*, *NCLIV_034381* e *NCLIV_015720*), roptrias (*NCLIV_064620*, *NCLIV_064520* e *NCLIV_009150*) e relacionados a síntese de treonina (*NCLIV_004630*).

Foram identificados 2735 InDels sendo que os cromossomos com maior densidade foram II, IV, VI, VIIa e XII, conforme observado na figura 11B. 22 genes tiveram grandes quantidades de inserções e/ou deleções (> 10 InDels) e dentre eles destaca-se *NCLIV_004630* e *NCLIV_055800* que estão relacionados à síntese de treonina (Apêndice D).

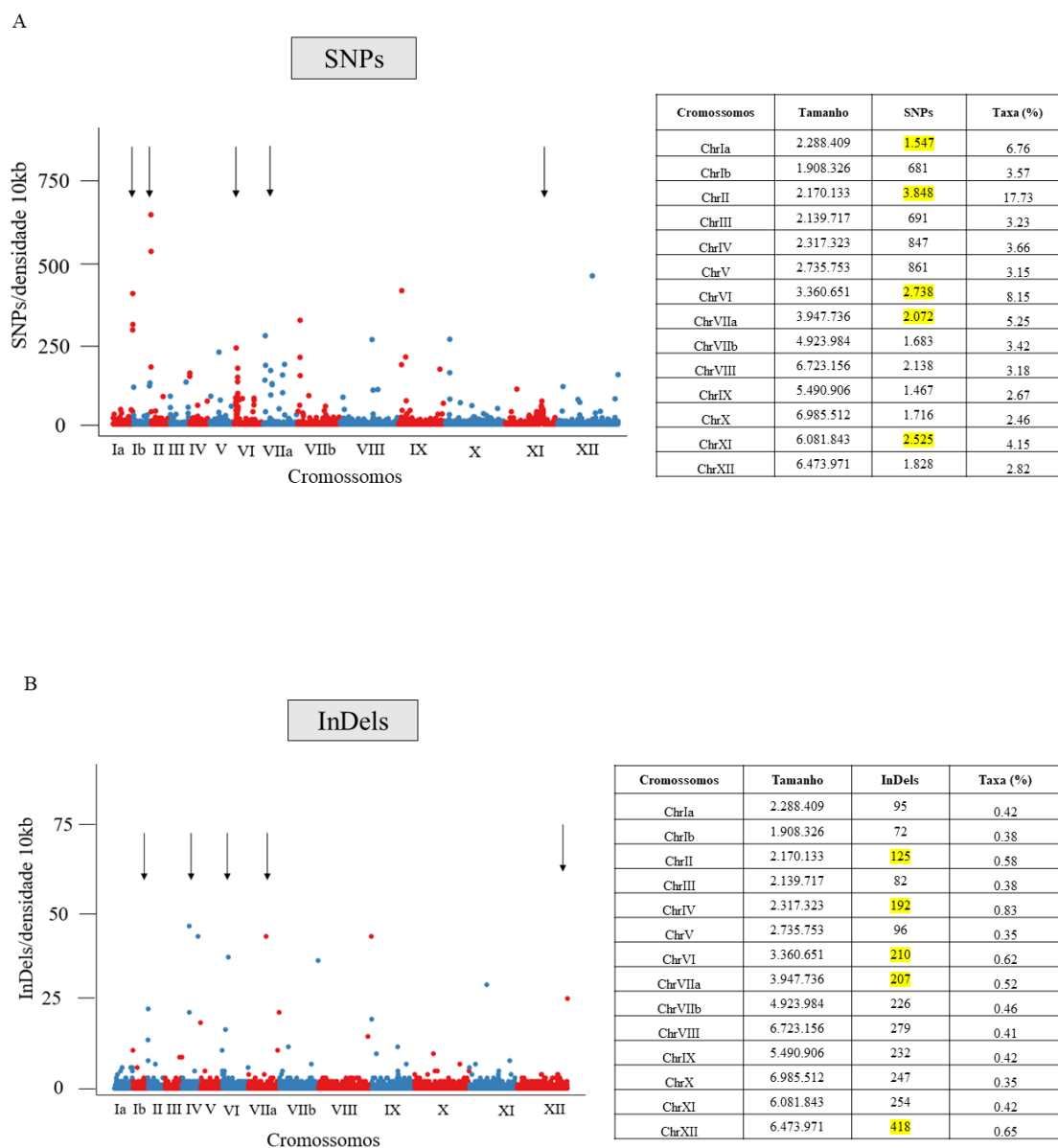


Figura 11 –Gráfico da densidade de SNPs (A) e InDels (B). Cada ponto representa a média das variações em 10kb comparando com o genoma de referência Nc-Liv. As tabelas mostram os valores brutos das variações e a porcentagem de cada cromossomo alterado. As setas destacam as regiões cromossômicas com maior quantidade de variações.

5.6 Identificação e anotação de mutações não sinônimas

As variações entre Nc-UDI4 e Nc-Liv também podem ser visualizadas no formato de histograma no gráfico Circos (figura 12) sendo que a linha 1 representa os Indels e a linha 2 os SNPs. É possível perceber que grande parte dos *hotspots* de variações são comuns entre SNPs e InDels. Para verificar quais são os genes mais alterados e qual a sua importância para o parasito utilizamos como primeiro critério a identificação das mutações não sinônimas e deleções. Os resultados obtidos através do software SnpEff foram categorizados de acordo com genes que possuíam polimorfismos Missense (a troca de nucleotídeos codifica alteração de aminoácidos), Nonsense (a troca de nucleotídeos codifica um *stop codon*) e deleções. Um total de 726 genes tiveram algum tipo de mutações não sinônima e/ou deleções, conforme mostrado no histograma da linha 4 da figura 12.

Os genes que possuíam mutações não sinônimas e/ou deleções de alto impacto foram identificados e classificados em categorias de função e/ou localização no parasito. Foram utilizadas informações disponíveis na literatura, ToxoDB, InterPro Scan e comparação com genes ortólogos e sintênicos de *T. gondii*. 126 genes no total foram identificados e a distribuição ao longo dos cromossomos pode ser visualizada na linha 3 da figura 12. Os cromossomos XI e VIIa foram os que mais tiveram genes com mutações não sinônimas e/ou deleções de alto impacto.

Conforme mostrado no Apêndice E, as categorias escolhidas para a classificação dos genes foram: crescimento e ciclo celular, síntese/replicação/recombinação e reparo de ácido nucleicos, metabolismo de RNA, síntese de proteínas, modificação de histonas/cromatina/microtúbulos, sinalização celular, tráfico intracelular e transmembrana, metabolismo e energia, genes relacionados a resposta imune, adesão, invasão e sobrevivência, proteínas transmembrana e hipotéticas (GARCIA-SANCHEZ et al., 2019). Dentre as categorias identificadas, destaca-se que 3 genes relacionam-se com crescimento e ciclo celular, 5 com a síntese de ácidos nucleicos, replicação, recombinação e reparo, 13 genes auxiliam nos processos de metabolismo de RNA, 7 genes com síntese, modificação e dobramento de proteínas, 3 genes que se relacionam a modificação de histonas, cromatina e dinâmica dos microtúbulos, 4 genes de sinalização celular, 5 genes que estão localizados intracelularmente e/ou com tráfico transmembrana, 7 genes que estão relacionados a processos energéticos e/ou de metabolismo, 31 genes alterados que fazem parte de processos de adesão, invasão e sobrevivência do parasito, 5 genes que

codificam proteínas transmembrana, 3 genes que não se encaixam em nenhuma das categorias acima e 40 genes que codificam proteínas hipotéticas.

Dentre os principais genes afetados destaca-se alterações não sinônimas em 13 genes (*NCLIV_034391*, *NCLIV_038960*, *NCLIV_020092*, *NCLIV_025185*, *NCLIV_038970*, *NCLIV_020080*, *NCLIV_020100*, *NCLIV_010040*, *NCLIV_020093*, *NCLIV_034430*, *NCLIV_010720*, *NCLIV_015720* e *NCLIV_020091*) que codificam proteínas de superfície (SRS) essenciais para o processo de invasão do parasito nas células hospedeiras bem como genes do complexo apical (*NCLIV_015660* e *NCLIV_028800*). Vale destacar que 4 proteínas de grânulos densos importantes para a manutenção do vacúolo parasitóforo (GRA 36, 25, 20 e 19), já descritas em *T. gondii* foram alteradas (*NCLIV_013180*, *NCLIV_062680*, *NCLIV_042680* e *NCLIV_062690*). 2 proteínas de roptrias (*NCLIV_057550* e *NCLIV_046970*) importantes para a entrada do parasito nas células hospedeiras e formação do vacúolo parasitóforo também tiveram alterações.

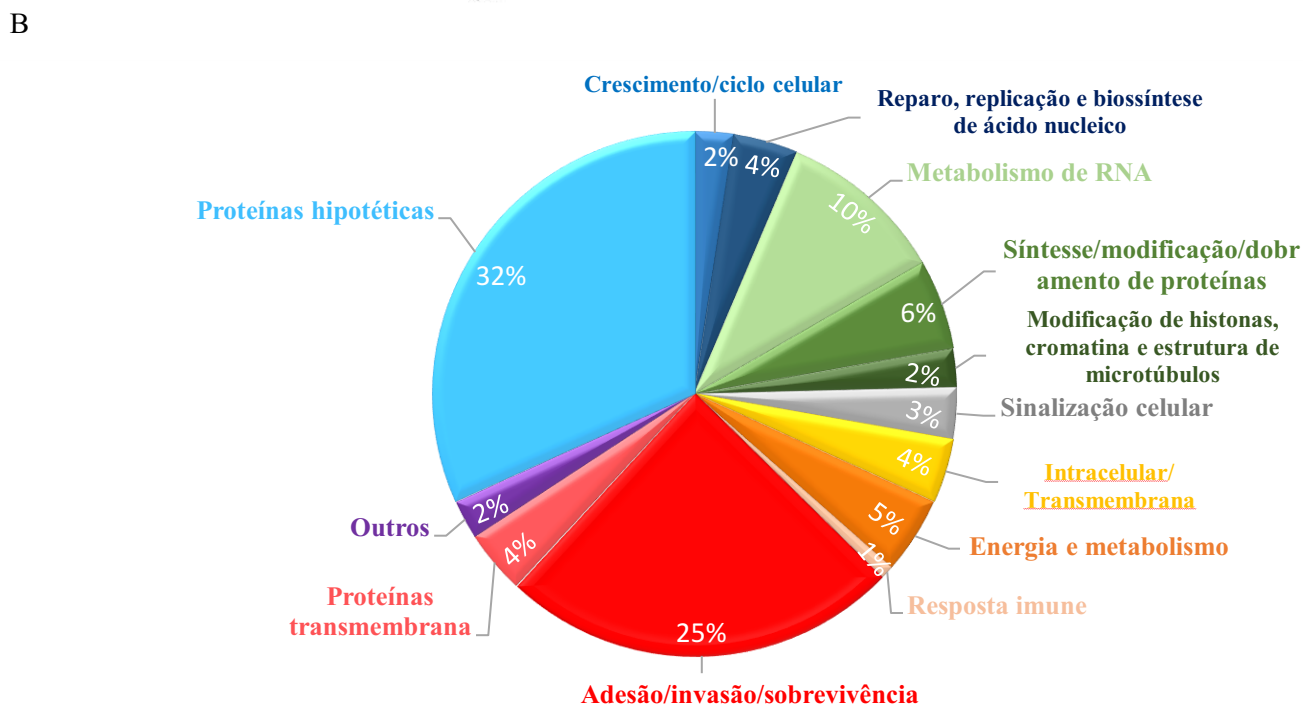
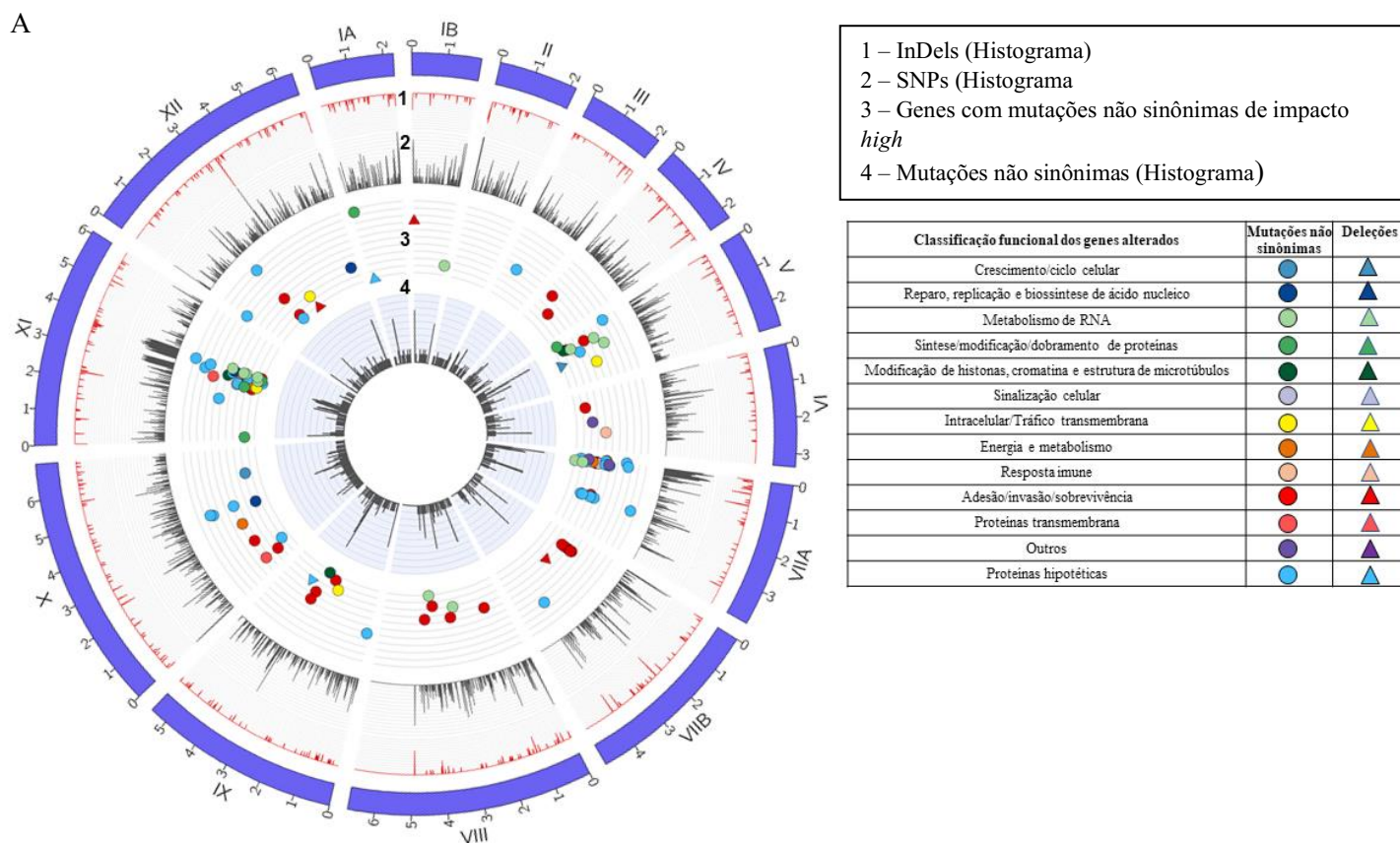


Figura 12 – Composição do genoma de *N. caninum*. (A) Gráfico Circos representando a densidade de SNPs e InDels, as mutações não sinônimas e deleções entre Nc-UDI4 e Nc-Liv. Os cromossomos estão representados em números romanos. 1 – Histograma da distribuição de InDels 10kb. 2 – Histograma da distribuição de SNPs em 10kb. 3 – Posição e classificação das mutações não sinônimas e deleções. 4 – Histograma da distribuição de mutações não sinônimas e deleções em 10kb. (B) Frequência distribuição funcional dos genes que possuem mutações sinônimas e/ou deleções de *Neospora caninum*.

5.7 Comparação do alinhamento de marcadores de microssatélites de cepas de *N. caninum*

Buscando relacionar a proximidade de Nc-UDI4 com outras cepas de *N. caninum*, selecionou-se 9 marcadores de microssatélites: MS4, MS5, MS6A, MS6B MS7, MS8, MS10, MS12 e MS21, localizados nos cromossomos IX, X, VIIa, II, VIII e XII (REGIDOR-CERRILLO et al., 2006). No total utilizou-se 159 cepas de *N. caninum* sendo estas isoladas de diferentes hospedeiros tais como: bovinos, canídeos, ovinos, cabras e aves provenientes de diversos países do mundo (Argentina, Alemanha, Brasil, Coréia, Escócia, Estados Unidos, Espanha, Grã-Betanha, Itália, Japão, México e Suécia). Os padrões de repetição dos marcadores de microssatélites de Nc-UDI4 foram contados manualmente. Vale destacar que o marcador MS10 em Nc-UDI4 apresentou exclusividade no padrão de repetição quando comparado às outras cepas.

Com o auxílio do algoritmo goeBURST estas cepas foram agrupadas e foi possível visualizar 2 grupos bem distintos sendo o grupo 1 composto por 98 isolados e o grupo 2 por 61 isolados (Figura 13). Nc-UDI4 foi agrupada no grupo 2 e ficou mais próxima de cepas Argentinas, isoladas de bovinos, e do primeiro isolado de *N. caninum*, Nc-1. Nc-Liv também está nesse grupo, porém em um braço mais distante. Vale ressaltar que as cepas brasileiras, Nc-Bahia, Nc-Goiás, BRA-3-NC-SP1 (BRA-15) e BRA-12-4-BNC-PR4, isoladas em bovinos, foram agrupadas no Grupo 1.

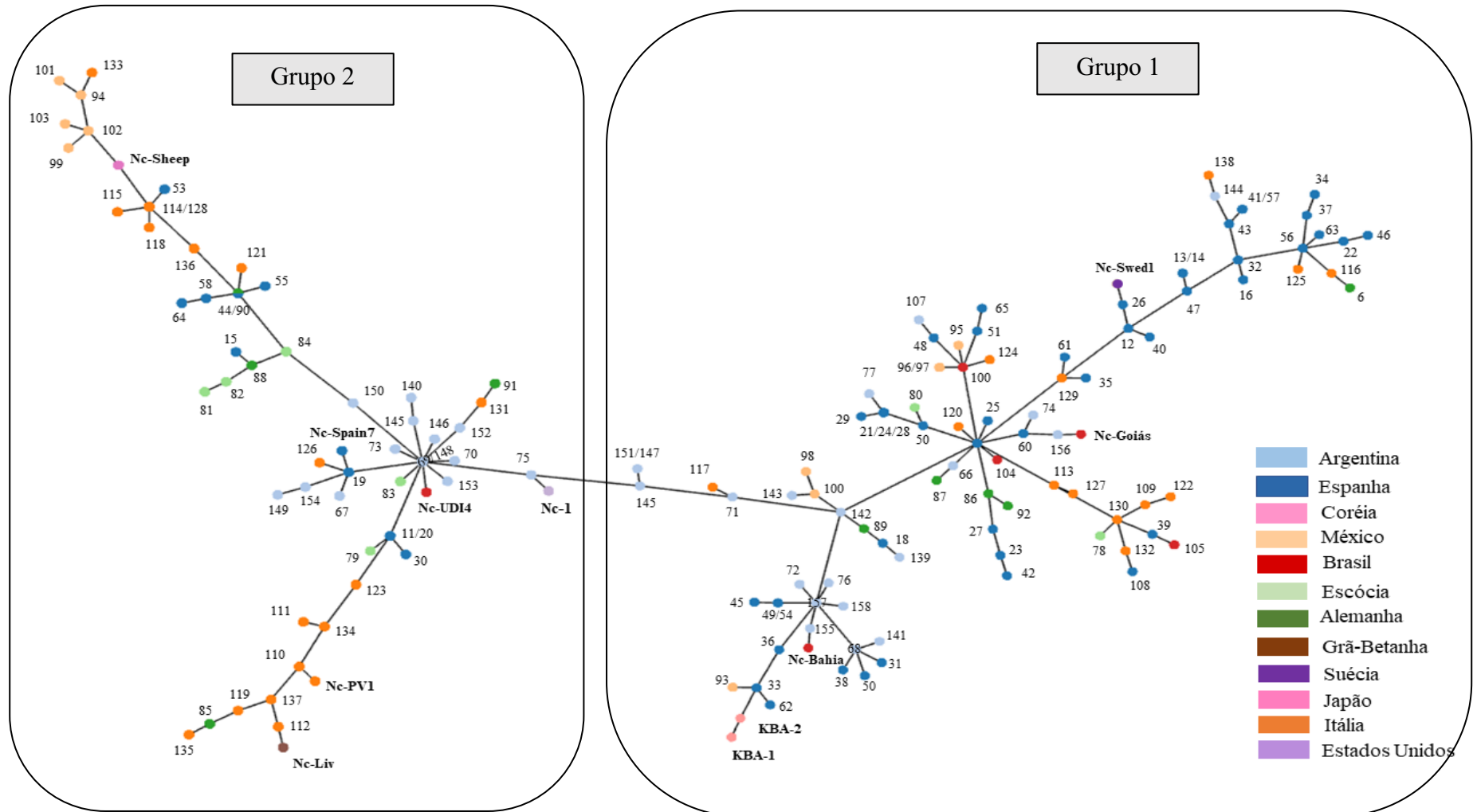


Figura 13 – Comparações genotípicas entre 159 cepas de *N. caninum* utilizando goeBURST. Cada círculo representa um isolado e as cores indicam país em que as amostras foram isoladas. 2 grupos principais foram identificados utilizando como base as distâncias entre as associações.

5.8 Ensaio de placa

Para iniciar os ensaios biológicos de comparação entre Nc-UDI4, Nc-1 e Nc-Liv fez-se um ensaio de placa em que fibroblastos murinos foram infectados com 400 taquizoítos de cada isolado, em poços independentes, por 6 dias. Como mostrado na figura 14A é possível visualizar macroscopicamente que há uma maior quantidade de placas nos poços infectados com Nc-Liv. Microscopicamente foram analisados 10 campos de cada poço e as placas formadas nos poços infectados com Nc-Liv foram significativamente maiores do que os de Nc-1 e Nc-UDI4 (Figura 14B). Tal resultado indica que em um sistema *in vitro*, independente de resposta imune, o Nc-Liv possui maior capacidade de invasão e proliferação nas células quando comparado as demais isolados testados.

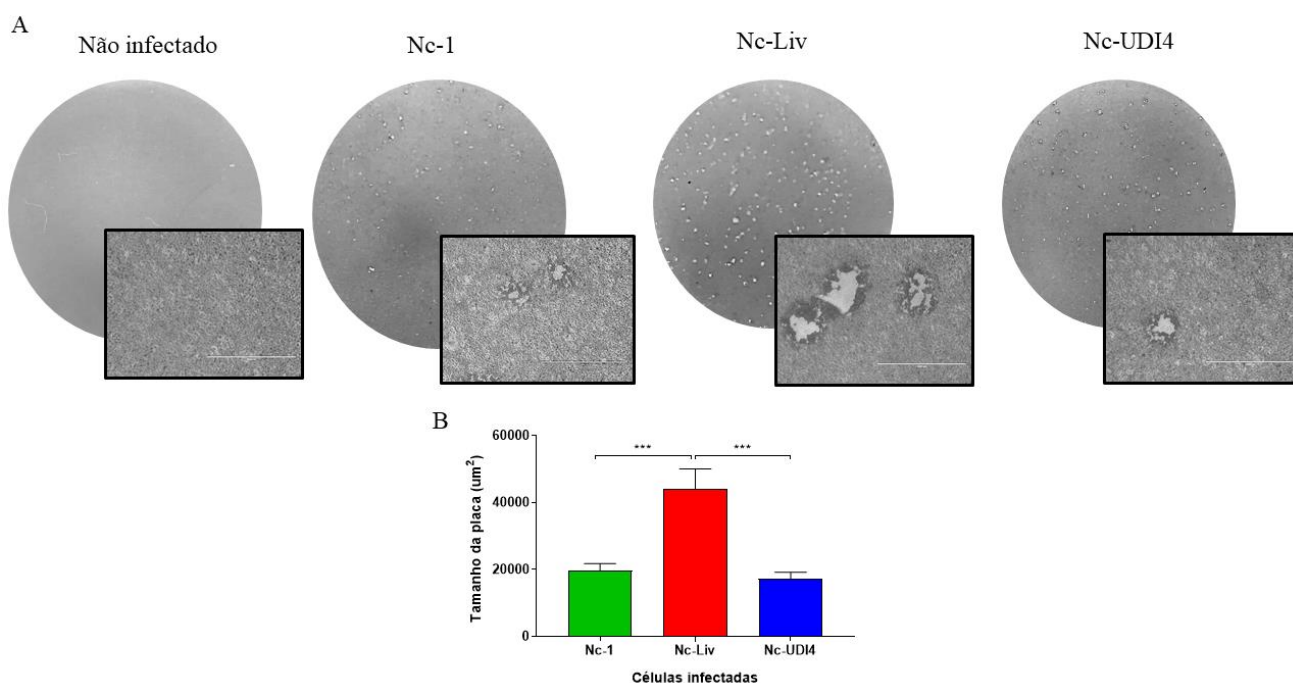


Figura 14 – Ensaio de placa comparando Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4. Células NIH3T3 foram plaqueadas até atingirem confluência e depois infectadas com 400 taquizoítos de cada cepa em poços separados e deixadas na estufa por 6 dias. (A) Representação macroscópica e microscópica de cada poço. (B) Comparação da área das placas formadas em cada infecção. 20 campos de cada poço foram analisados e o tamanho das áreas mensurados utilizando o software Image J. Os ensaios foram feitos em duplicatas independentes. As áreas das placas foram comparadas utilizando o teste One-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey (**P<0,01, ***P<0,001).

5.9 Camundongos são mais susceptíveis à infecção por Nc-Liv quando comparados à infecção por Nc-1 e Nc-UDI4

A infecção de camundongos com taquizoítos de Nc-Liv, Nc-1 e Nc-UDI4 foi feita utilizando-se dose letal (1×10^7 taquizoítos/animal) i.p. e o monitoramento feito durante 30 dias. Os animais infectados com Nc-Liv tiveram uma taxa de mortalidade de 90% (Figura 15A), sendo significativamente maior do que os outros grupos. O primeiro animal foi eutanasiado no terceiro dia de infecção e a perda de peso foi superior aos demais grupos (Figura 15B). Por outro lado, os animais infectados com Nc-1 e Nc-UDI4 tiveram um perfil bem semelhante sendo que, em ambos, a taxa de sobrevivência foi de 40%. O primeiro animal do grupo Nc-1 foi eutanasiado no 9º dia de infecção e, para Nc-UDI4, no 10º d.p.i. Esses resultados indicam que Nc-Liv é mais virulento que Nc-1 e Nc-UDI4, por induzir uma maior mortalidade e perda de peso em camundongos.

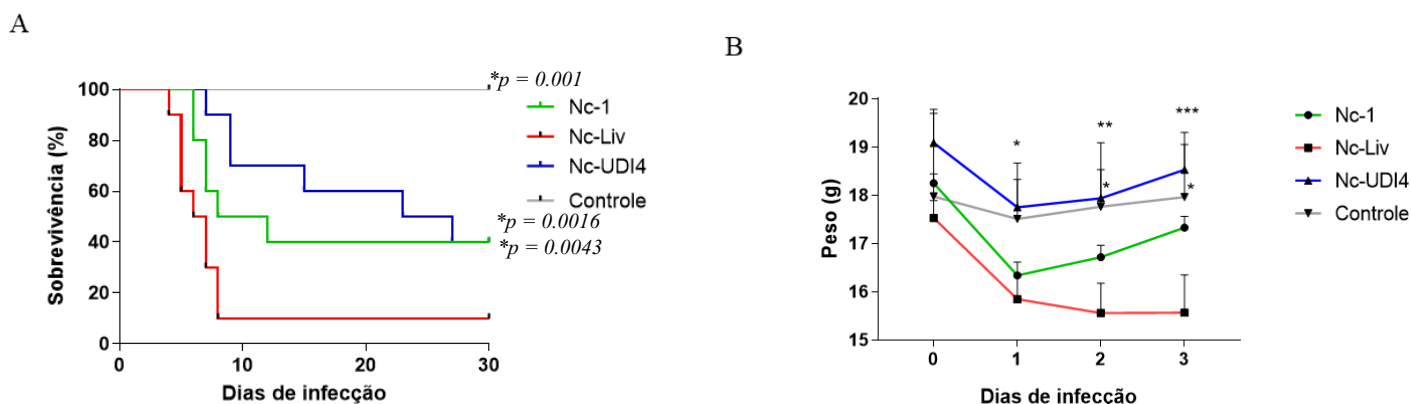


Figura 15 – (A) Curva de sobrevivência (n=5). Os camundongos por 30 dias com 1×10^7 taquizoítos/animal. As diferenças dos grupos foram comparadas com análises de Kaplan Meier utilizando o teste long-rank com p value comparando as comparações entre os grupos com Nc-Liv. Os valores são referentes a dois experimentos realizados de forma independente. *P < 0,05. **(B) acompanhamento da mudança de peso de camundongos C57BL/6 infectados intraperitonealmente com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 (n=5).** As diferenças de pesos foram comparados utilizando o teste Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey (**P<0,01, ***P<0,001, *P<0,05). Os valores são referentes a dois experimentos realizados de forma independente

5.10 Camundongos infectados com Nc-Liv apresentaram maior carga parasitária no fígado e cérebro comparados à Nc-UDI4 e Nc-1

Como Nc-Liv demonstrou ter uma capacidade maior de invasão e proliferação *in vitro* e virulência *in vivo* buscou-se investigar mais profundamente essas diferenças. Para isso, camundongos C57BL/6 foram infectados com uma dose sub letal (1×10^6 taquizoítos/animal) i.p. por 7 (fase aguda) e 30 (fase crônica) dias. Os órgãos escolhidos para avaliação foram fígado e cérebro e verificou-se que a carga parasitária no fígado de animais infectados com Nc-Liv, 7 d.p.i, foi superior ao de Nc-1 e Nc-UDI4 (Figura 16A). A quantidade de DNA de *N. caninum* também foi maior no cérebro de Nc-Liv, 30 d.p.i., comparados ao de Nc-1 e Nc-UDI4 (Figura 16B). A imuno-histoquímica também confirmou esse resultado, já que estruturas que se assemelham a cistos de *N. caninum* foram encontrados no cérebro de animais infectados com Nc-Liv (Figura 16C) e não nos outros grupos.

Com base nestes resultados foi verificado o perfil inflamatório do fígado e cérebro desses animais através de análises histopatológicas. O fígado e o cérebro dos animais infectados com Nc-Liv, Nc-1 e Nc-UDI4 apresentaram lesões inflamatórias com infiltrados focais mononucleares, contudo não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos (Figura 17).

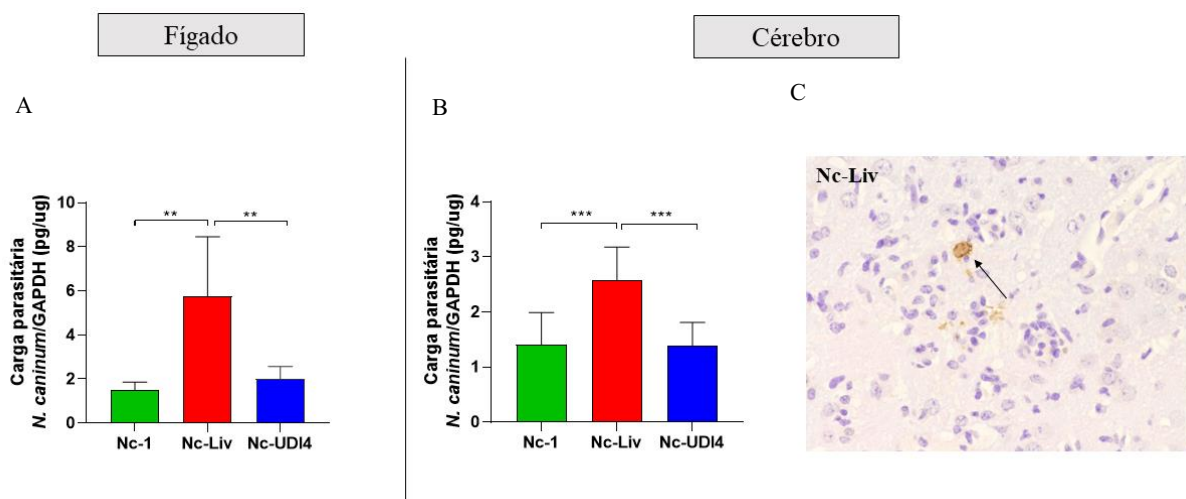


Figura 16 – Quantificação da carga parasitária de *N. caninum* no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 (A) Fígado, 7 d.p.i. e (B) cérebro 30 d.p.i. Os dados foram obtidos a partir da amplificação do gene Nc5 por qPCR. Os valores são expressos como média e \pm desvio padrão (SD) ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (teste One-way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey). (C) Fotomicrografias representativas da análise imuno-histoquímica de cérebros de camundongos infectados com Nc-Liv mostrando uma estrutura que se assemelha a um cisto tecidual (Seta). DAB e hematoxilina de Harris foram utilizadas para coloração e contra coloração respectivamente. Aumento de 1000x.

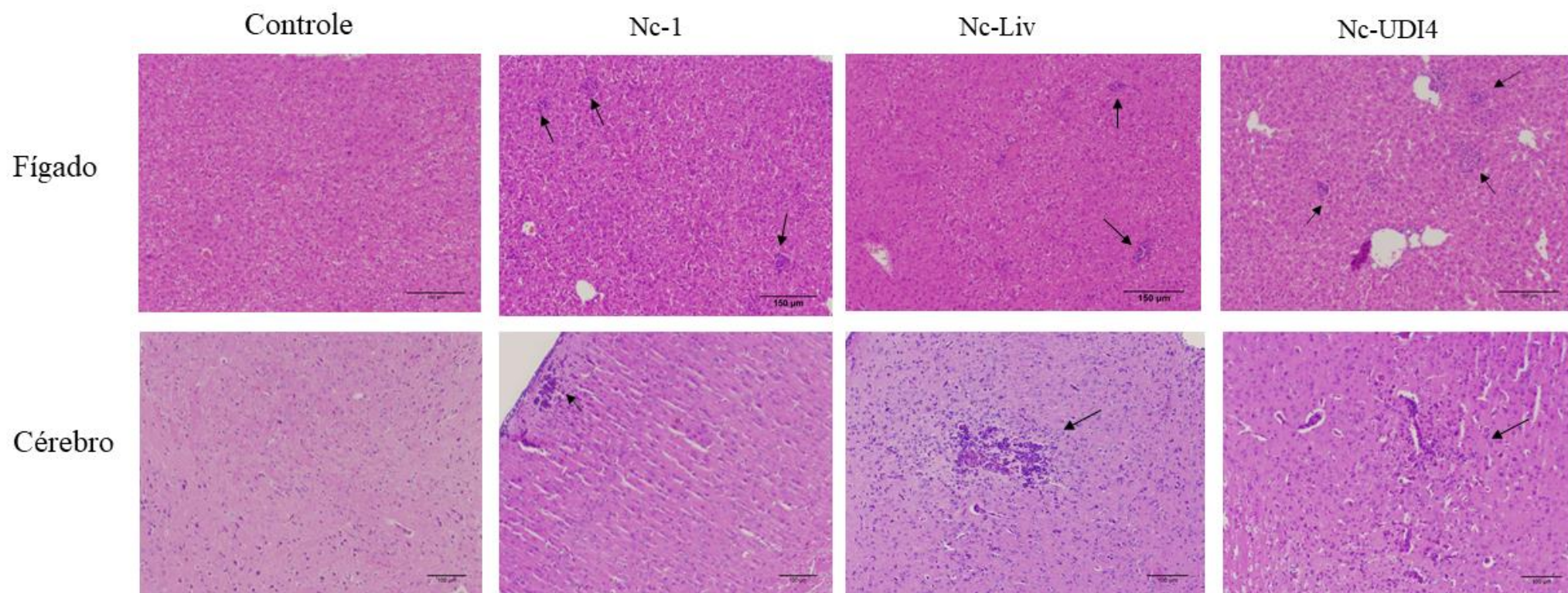


Figura 17 – Análise histológica do fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4. Análise histológica em amostras de tecido do fígado (7 d.p.i) e sistema nervoso central (30 d.p.i) infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*. As setas indicam locais com a presença de infiltrados inflamatórios.

5.11 Produção de anticorpos específicos da classe IgG e suas subclasses em animais infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4

Para verificar se as diferenças de virulências encontradas entre Nc-Liv, Nc-1 e Nc-UDI4 advinda da produção de anticorpos, avaliou-se a produção de IgG total e subclasses, IgG1 e IgG2a, 7 e 30 d.p.i. Conforme mostrado na figura 18 não houve diferença na produção de anticorpos e nem no reconhecimento antigênico de nenhum dos grupos em ambas as fases de infecção analisadas.

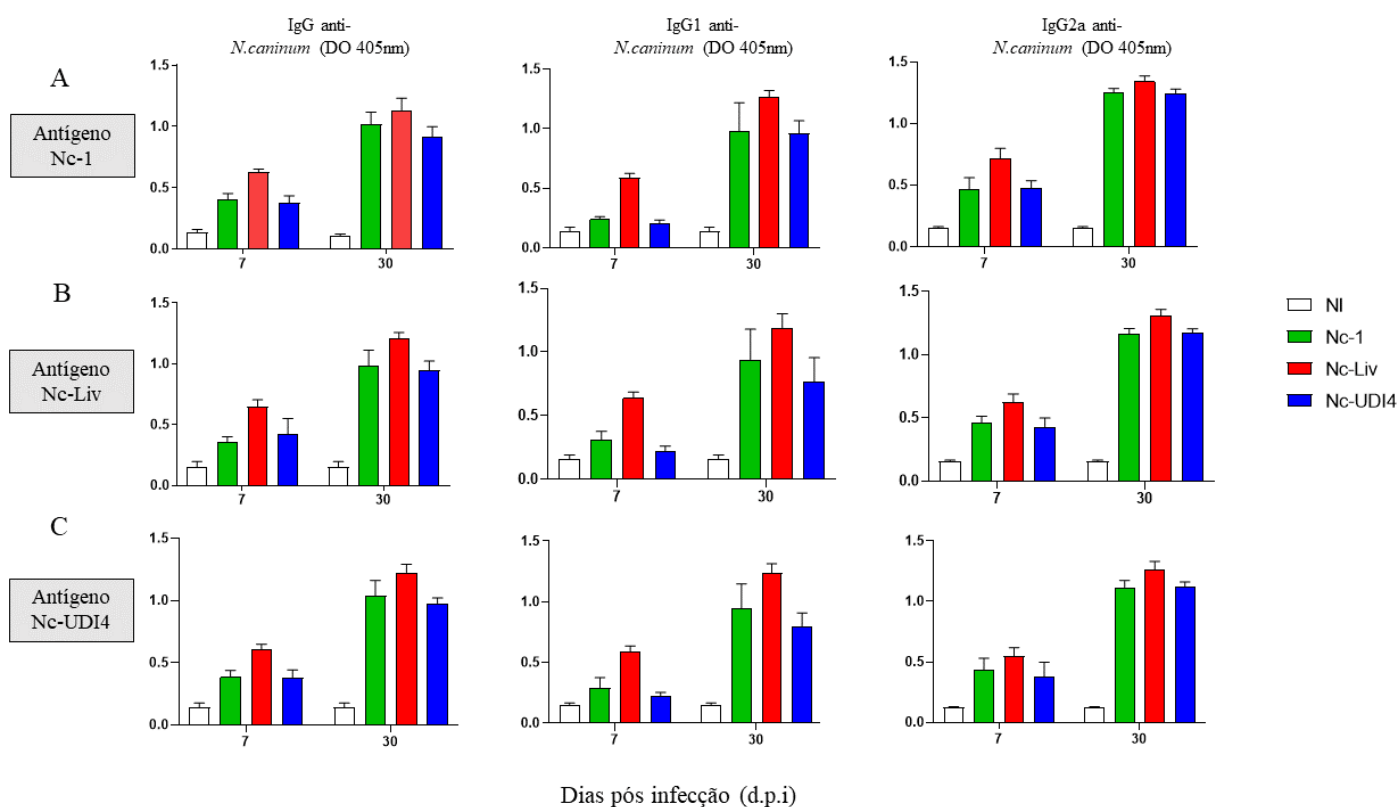


Figura 18 - Cinética da produção de anticorpos IgG antígeno-específicos. Anticorpos antígeno-específicos IgG total, IgG1 e IgG2a foram mensurados em camundongos C57BL/6 infectados com 1×10^6 taquizoítos de Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4 frente aos antígenos solúvel de Nc-1 (A), Nc-Liv (B) e Nc-UDI4 (C). A produção de anticorpos foi mensurada após 0, 7, e 30 dias após infecção em amostras de soro obtidas de todos os grupos. Os valores são expressos como DO média \pm SD, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (***) $P < 0,001$.

5.12 Nc-Liv induz uma maior produção de IL-10 comparados a Nc-1 e Nc-UDI4 durante a fase aguda da infecção

Com o intuito de analisar o padrão de resposta celular comparando as infecções por Nc-Liv, Nc-1 e Nc-UDI4 foi feita a dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e IFN- γ) e anti-inflamatória (IL-10). No primeiro dia de infecção, foi detectado uma maior quantidade de IFN- γ nos soros dos grupos infectados com Nc-Liv e Nc-UDI4 (Figura 19B), porém esses valores se igualaram 3 e 7 d.p.i e não houve diferença na produção desta citocina no fígado dos animais analisados. Não houve diferença de detecção de IL-12 no soro dos grupos infectados (Figura 19A) e nem no fígado desses animais (Figura 19D). Com relação a produção de IL-10 houve um aumento significativo no soro 3 e 7 d.p.i (Figura 19C) e no fígado (Figura 19F) 7 d.p.i. dos animais infectados com Nc-Liv quando comparados a Nc-1 e Nc-UDI4.

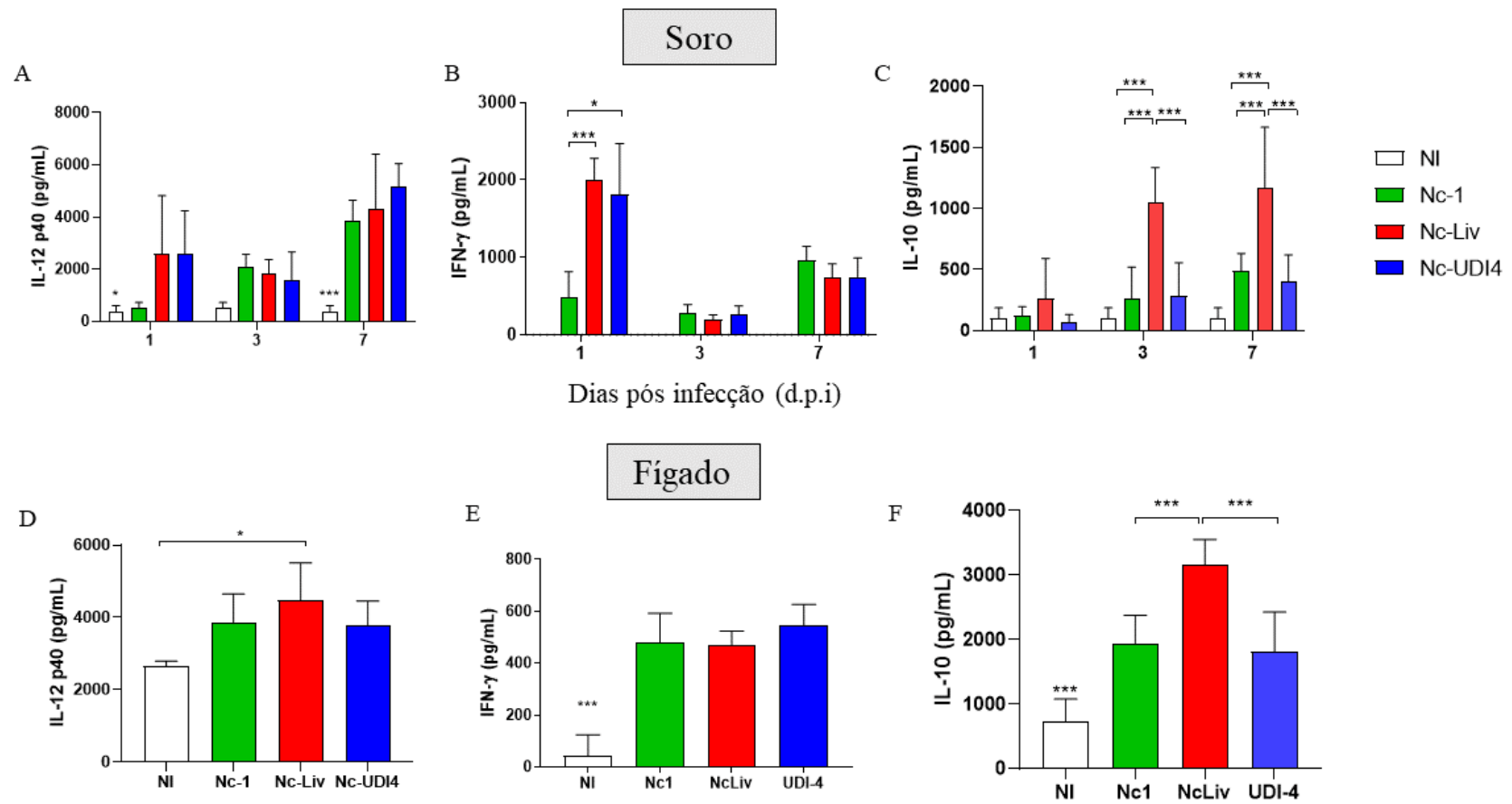


Figura 19 - Cinética da produção de citocinas no soro e no fígado de camundongos infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4. (A, D) IL-12p40, (B, E) IFN- γ , (C, F) IL-10. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum*, sendo mensurado a quantidade de IL-12p40, IFN- γ e IL-10 (A, B e C) em amostras de soro após 0, 1 e 3 dias de infecção e no homogenato de fígado após 7 d.p.i. Os valores são referentes a dois experimentos independentes e expressos como média \pm SD, e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

5.13 BMDMs infectados com Nc-Liv induzem maior produção de IL-10

Para verificar o perfil de citocinas induzidos por células específicas do sistema imune, BMDMs de camundongos WT foram diferenciadas e infectadas com Nc-Liv, Nc-1 e Nc-UDI4 por 18 horas. Houve maior produção de IL-12 nas células infectadas com Nc-Liv quando comparadas a Nc-1 (Figura 20A). Por outro lado, a produção de IL-10 foi significativamente maior no sobrenadante de Nc-Liv comparados a Nc-UDI4 e Nc-1 (Figura 20B).

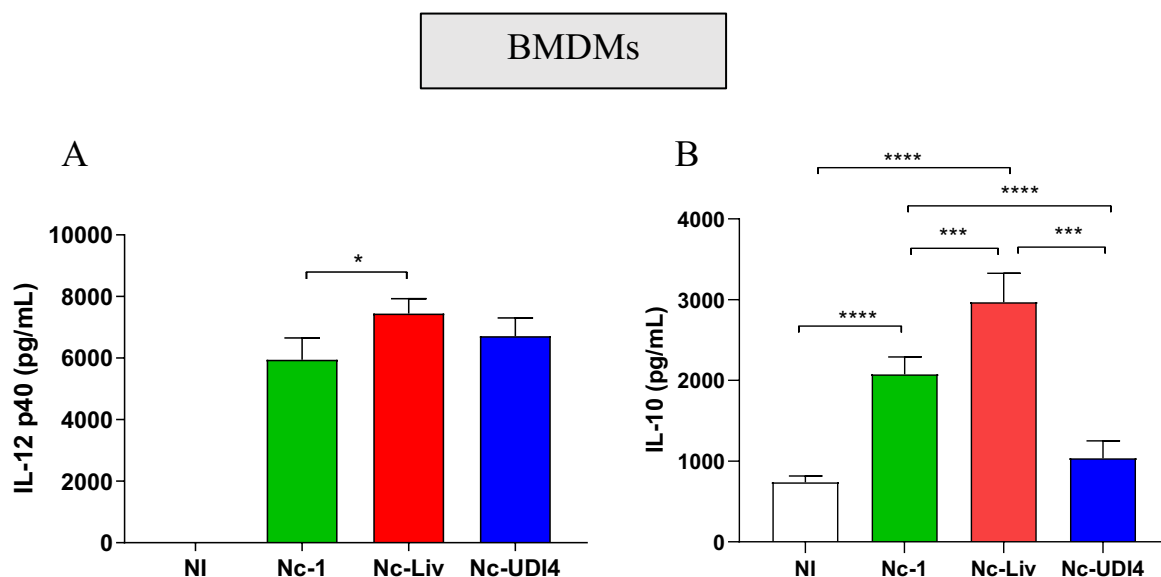


Figura 20 - Cinética da produção de citocinas no sobrenadante de macrófagos de medula óssea de camundongos C57BL/6 (BMDMs) infectados com Nc-1, Nc-Liv e Nc-UDI4. (A) IL-12p40 e (B) IL-10. BMDMs (n=5) foram infectados com MOI 0,5 de *N. caninum* por 18 horas, sendo mensurado a quantidade de IL-12p40 e IL-10 (A e B). Os valores são expressos como média \pm SD e analisados por meio do teste Two-Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$).

6 Discussão

A manutenção do ciclo de vida do *N. caninum* é um assunto que tem ganhado espaço nas últimas décadas. Sabe-se que os canídeos são os hospedeiros definitivos e que diversos mamíferos têm o papel de hospedeiros intermediários e são capazes de se infectarem pelo parasito. A neosporose atinge principalmente os bovinos causando prejuízos para os produtores rurais, pois induz ao abortamento. Ao avaliar o ambiente rural, o parasito tem as condições ideais para se manter vivo já que grande parte das propriedades possuem cães criados junto aos bovinos. Estudo realizado na Itália mostrou que a taxa de vacas soropositivas para o *N. caninum* é maior em propriedades rurais que possuem pelo menos 2 cachorros, confirmando que relação direta dos hospedeiros intermediários e definitivos aumentam as taxas de infecção (OTRANTO et al., 2003). Outro fator de risco existente nas fazendas são os canídeos silvestres que também são hospedeiros do *N. caninum* e contribuem para a manutenção do ciclo parasitário. Por isso, a criação de barreiras para impedir o contato direto de hospedeiros intermediários e definitivos nas propriedades rurais são necessárias (RIBEIRO et al., 2019).

Além dos hospedeiros intermediários já conhecidos, vários estudos têm mostrado a identificação de anticorpos anti-*N. caninum* e DNA do parasito em aves. Pensando nas propriedades rurais, as galinhas fazem parte desse ambiente e sabe-se que representam um fator de risco para a transmissão do parasito (COSTA et al., 2008; DE BARROS et al., 2018; OTRANTO et al., 2003). Estudo feito no Brasil com 324 galinhas registrou uma taxa de soropositividade de 34,3% para *N. caninum* (MARTINS; KWOK; DUBEY, 2011). Já foram isoladas diversas cepas de *T. gondii* em galinhas (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002), porém o presente trabalho é pioneiro para de *N. caninum*.

Contando o relato aqui descrito, já foram isolados *N. caninum* de sete espécies de hospedeiros diferentes, sendo a América do Sul o continente que possui maior diversidade de hospedeiros dos quais o parasito foi isolado e a Europa o continente com maior número de isolados (Figura 21). Nc-UDI4 foi o primeiro isolado de *N. caninum* advindo de aves e, devido ao histórico de dupla positividade sorológica do animal que o deu origem, foram realizados diferentes protocolos de confirmação para demonstrar a real identificação deste parasito. Sorologicamente, tanto pelo ELISA quanto IFA,

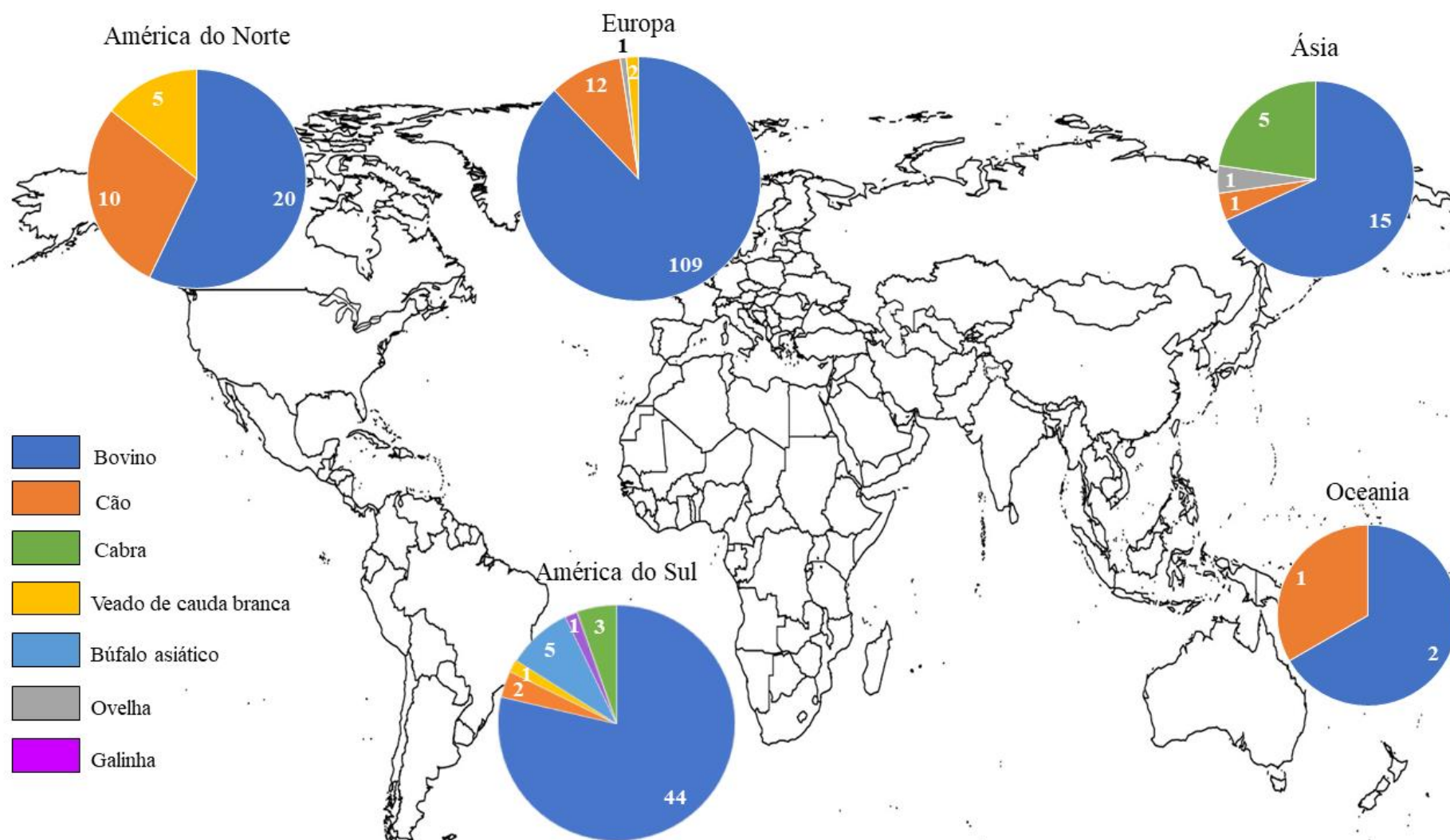


Figura 21 – Mapa da distribuição de isolados de *N. caninum* (números) em cada continente. As cores representam o hospedeiro em que foi feito o isolamento.

mostraram que os animais infectados com Nc-UDI4 apresentaram anticorpos IgG séricos para antígenos de *N. caninum*, e não de *T. gondii*. Os testes moleculares também confirmaram a procedência de Nc-UDI4 o gene utilizado para essa confirmação, Nc-5, é amplamente utilizado na identificação de isolados de *N. caninum* (DE BARROS et al., 2018; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Além disso, o NGS demonstrou que as *reads* de Nc-UDI4 conseguiu cobrir 99,4% de Nc-Liv e 98,6% de Nc-Spain7. Trabalho realizado por um grupo de pesquisadores (KHAN et al., 2019) descreveu uma taxa de mapeamento semelhante entre Nc-Spain7, Nc-SP1 e Nc-Liv, sendo esta de 99,8%. Neste mesmo trabalho comparou-se NhOregon com Nc-Liv e a taxa de mapeamento encontrada foi de 33,1%, e no nosso trabalho a taxa de alinhamento entre Nc-UDI4 e NhOregon foi de 18,3%. Vale ressaltar que a porcentagem de *reads* alinhadas com organismos de outras espécies (*T. gondii*, *H. hammondi* e *S. neurona*) foi ainda menor.

Apesar da alta taxa de mapeamento entre Nc-UDI4 e Nc-Liv, muitos polimorfismos, inserções e deleções foram identificados. A quantidade de SNPs foi muito superior a descrita por (KHAN et al., 2019) que comparou 7 cepas de *N. caninum* e encontrou um total de 5766 SNPs entre a população analisada e Nc-Liv. Outro trabalho comparou as variações, utilizando RNA-seq, de Nc-Nowra e Nc-Liv e foram encontrados 3130 SNPs e 6123 InDels (CALARCO; BARRATT; ELLIS, 2018). A grande diferença de variações em Nc-UDI4 indica que o parasito sofreu mais mutações e isso pode justificar o fato de este isolado conseguir infectar galinhas. Os cromossomos de Nc-UDI4 que tiveram maior quantidade de SNPs foram Ib, II, VI, VIIa e XI e InDels Ib, IV, VI, VIIa e XII. Trabalhos anteriores destacaram maior concentração de variações nos cromossomos VI, XI e XII, indicando que esta pode ser uma região de hipervariabilidade em *N. caninum*, (CALARCO; BARRATT; ELLIS, 2018, 2020).

Os genes que tiveram maior quantidade de mutações foram os do complexo apical (*NCLIV_038810* e *NCLIV_064590*), genes da família SAG (*NCLIV_034380*, *NCLIV_034390*, *NCLIV_034381* e *NCLIV_015720*), roptrias (*NCLIV_064620*, *NCLIV_064520* e *NCLIV_009150*) e relacionados a síntese de treonina (*NCLIV_004630*). Quanto às mutações não sinônimas, a maior parte dos genes que sofreram alterações estão relacionados à processos de invasão/adesão e sobrevivência. Cerca de 13 genes possuem domínio SRS e 4 delas já foram descritas em *T. gondii* (SRS38B, SRS15C, SRS17B e SRS22). Essa classe de proteínas tem funções cruciais para o parasito, sendo responsáveis pela ligação do parasito às células hospedeiras, ativação de células do sistema imune e

regulação da virulência (JUNG et al. 2004). Em nosso trabalho foi visto que Nc-UDI4 tem uma menor capacidade de invasão de células comparado a Nc-Liv, conforme mostrado no ensaio de placa, e *in vivo* por causar menor mortalidade, parasitismo e produção de citocinas, quando comparados a Nc-Liv. As diferenças nas proteínas da família SRS bem como do complexo apical podem contribuir para tal comportamento. Vale ressaltar que quando se comparou a cepa Nc-Spain1H (avirulenta) e Nc-Spain7 (virulenta), também foram descritas diferenças na expressão de genes da família SRS (GARCIA-SANCHEZ et al., 2019)

Deve-se ressaltar que 6 genes (*NCLIV_017780*, *NCLIV_056770*, *NCLIV_015660*, *NCLIV_028800*, *NCLIV_001270* e *NCLIV_056660*) tiveram mutações não sinônimas importantes e estes se relacionam com o complexo apical do parasito. Dentre estes genes destaca-se *NCLIV_001270* que possui ortologia e sintenia com *TGME49_305020*. Este gene codifica Hsp20, uma proteína altamente conservada nos parasitos do filo Apicomplexa e que está relacionada com invasão e motilidade (COCERES et al., 2012). Conforme visualizado no ensaio de placa, Nc-UDI4 apresentou uma menor capacidade de invasão dos fibroblastos murinos.

Após a ligação de *N. caninum* as células do hospedeiro, roptrias são liberadas para a formação da junção de movimento que facilita a sua entrada e o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo. Proteínas de grânulos densos também são liberadas de forma a modular a resposta imune e manter o sucesso da infecção (SOHN et al., 2011). Dentre os genes alterados, 3 deles tiveram uma alta taxa de variações em roptrias (*NCLIV_064620*, *NCLIV_064520* e *NCLIV_009150*) e dois (*NCLIV_057550* e *NCLIV_046970*) tiveram mutações não sinônimas. Destaca-se *NCLIV_064620* que é uma roptria que possui ortologia e sintenia com a proteína RON2 de *T. gondii*, proteína que faz parte de um complexo macromolecular localizado no complexo apical e responsável pela invasão do parasito na célula hospedeira (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011).

Quatro genes importantes (*NCLIV_013180*, *NCLIV_062680*, *NCLIV_042680* e *NCLIV_062690*) tiveram mutações não sinônimas em GRAs já descritas em *T. gondii* sendo estas GRA36, GRA20, GRA25 e GRA19 respectivamente. GRA19 e GRA20 são responsáveis pela formação do vacúolo parasitóforo (BAI et al., 2018). GRA25 que também foi alterada e é um importante fator de virulência de *T. gondii* regula a secreção de citocinas (SHASTRI et al., 2014). No presente trabalho observou-se que Nc-Liv, diferentemente de Nc-UDI4, conseguiu modular a resposta imune de camundongos induzindo uma maior secreção de IL-10 e conseqüentemente contribuiu para uma maior

replicação do parasito no fígado e cérebro, ressaltando que esse perfil se repetiu BMDMs. Tais observações sugerem que fatores secretados ou expressos pelo parasito nos momentos iniciais da interação com as células do hospedeiro podem estar relacionados a produção de fatores imunomodulatórios.

Nc-UDI4 teve muitas variações não sinônimas em genes relacionados ao metabolismo de RNA (n=13). Conforme mostrado em recente trabalho, cepas virulentas (Nc-Spain7, Nc-Spain4H e Nc-Bahia) e cepas avirulentas (Nc-Spain1H, Nc-Spain2H e Nc-Ger6) também tiveram alterações significativas nesses genes, sendo que os isolados mais virulentos possuem maior abundância de genes relacionados a expressão de RNA. Nc-Ger6 teve um ciclo de vida *in vitro* mais longo e tal fato pode estar relacionada a essas variações metabólicas de RNA (RICO-SAN ROMÁN et al., 2020).

Vale ressaltar que o gene NCLIV_015050 também teve alterações não sinônimas em Nc-UDI4 e este foi categorizado como sendo relacionado a resposta imune. Este gene é descrito no ToxoDB como sendo uma glicoproteína da família dos fosfoglicanos 4 (PPG4). A cepa virulenta Nc-Spain7 demonstrou ter uma alta expressão desse gene quando comparada a Nc-Spain1H. PPG4 já foi descrita como sendo responsável por regular a secreção de proteínas pró-inflamatórias e regulatórias em macrófagos infectados com *Leishmania donovani* e uma dessas citocinas é IL-10 (SAMANT et al., 2009). No presente trabalho houve uma diferença na produção de citocinas IL-10, sendo maior em macrófagos infectados com Nc-Liv.

Mesmo tendo uma grande quantidade de polimorfismos, a região de ITS1 continuou conservada entre as espécies do gênero *Neospora*. Diversos grupos utilizam esse marcador para fazer a análise filogenética de parasitos do filo Apicomplexa, e os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com a literatura (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Foi encontrado neste trabalho que Nc-UDI4, Nc-Liv e Nh-Oregon1 formam um braço da árvore filogenética e *T. gondii* e *H. hammondi* outro. Conclui-se então que a região de ITS1 é interessante para análises intra-espécies e independe da quantidade de polimorfismos do restante do genoma pois, assim como Nc-UDI4, *N. hughesi* teve 375000 SNPs quando comparado a Nc-Liv mas a região ITS1 permaneceu conservada (KHAN et al., 2019).

Para fazer a comparação de Nc-UDI4 com outras cepas de *N. caninum* utilizou-se 9 marcadores de microssatélites. Tais marcadores são amplamente utilizados para caracterizar isolados de *N. caninum* pois conseguem detectar diversidades genéticas entre as cepas (BASSO et al., 2009; REGIDOR-CERRILLO et al., 2006; ROJO-MONTEJO

et al., 2009). Dentre todos os alelos caracterizados, Nc-UDI4 demonstrou ter exclusividade quanto ao padrão de repetição do marcador MS10, descrito como o marcador que mais apresenta mutações entre os isolados. Todos os outros marcadores de Nc-UDI4 apresentaram padrões de alelos já descritos, indicando que há uma conservação do padrão genético de *N. caninum* nas diferentes regiões do mundo. Vale destacar que esses marcadores de microssatélites se mantêm estáveis durante várias gerações, visto que trabalho anterior comparou o padrão de repetição de alelos entre taquizoítos de Nc-1 isolados no ano de 1988 e taquizoítos que foram passados em cultura de células sucessivas vezes e este se manteve o mesmo (REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007).

O algoritmo goeBURST conseguiu agrupar todos os 159 isolados analisados, diferentemente de trabalhos anteriores que utilizaram o algoritmo eBURST (DORSCH et al., 2020). 2 grupos distintos puderam ser visualizados sendo que o grupo 1, assim como mostrado anteriormente, engloba principalmente cepas provenientes da Espanha, Argentina e as cepas brasileiras, Nc-Bahia, Nc-Goiás, BRA-06-2180 e Nc-SP1. Conforme descrito por (REGIDOR-CERRILLO et al., 2013), houve uma introdução de bovinos provenientes da Espanha e Portugal na América do Sul, no final do século 15, e isso pode ter contribuído para o espalhamento de *N. caninum* na América do Sul. Já o grupo 2 é composto por cepas de regiões mais variadas tais como Argentina, Escócia, Itália e México e, conforme mostrado por (DORSCH et al., 2020), essas cepas possuem uma maior quantidade de mutações. Os padrões de repetição de Nc-UDI4 se aproximaram mais das cepas Argentinas ARG-05-5 e ARG-16-55. Estas cepas foram isoladas em bovinos com uma diferença de 10 anos em localidades com 400 km de distância entre si (REGIDOR-CERRILLO et al., 2013), corroborando com a ideia de que estes isolados possuem origem comum e podem ter sido introduzidos no Brasil. Vale ressaltar que, em todos os ensaios de biológicos, Nc-UDI4 teve um comportamento de virulência semelhante ao de Nc-1. Ambos tiveram 4 marcadores de microssatélites idênticos (MS5, MS8, MS12 e MS21), indicando que pode haver uma relação entre o comportamento biológico do parasito e os padrões de repetição destes alelos (ROJO-MONTEJO et al., 2009).

A virulência de *N. caninum* é determinada por inúmeros fatores tais como invasão, capacidade de replicação e a capacidade de evadir da resposta imune no hospedeiro. Já foi descrito na literatura que isolados de *N. caninum* induzem perfis de citocinas diferentes, conforme mostrado na comparação com o isolado mais virulento Nc-Spain7 e o menos virulento Nc-Spain 1H (GARCIA-SANCHEZ et al., 2019). Verificou-se no

presente trabalho que Nc-Liv induziu uma maior quantidade de IL-10 quando comparada a Nc-1 e Nc-UDI4 e tal fato contribuiu para um maior parasitismo no fígado, durante a infecção aguda, e no cérebro, na fase crônica. Diversos estudos já fizeram essa correlação entre a maior quantidade de IL-10 e o aumento do parasitismo em células da glia, trofoblastos e macrófagos. Vários trabalhos já provaram que, na ausência de receptores importantes de *N. caninum* tais como TLR2, MyD88 e NOD2, há uma diminuição de secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-12, associadas a maior produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) intensificando o parasitismo (DAVOLIFERREIRA et al., 2016; MINEO et al., 2009b, 2010a). Portanto, IL-10 está relacionada ao aumento do parasitismo e a sua produção em infecções por cepas menos virulentas de *N. caninum* fica diminuída.

7 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos no trabalho é possível concluir que:

- Nc-UDI4 é o primeiro isolado de *N. caninum* obtido em galinhas, sendo confirmado por análises sorológicas e genômicas;
- As comparações de microssatélites demonstraram que o genótipo de Nc-UDI4 se aproxima mais filogeneticamente de isolados argentinos, espanhóis e de Nc-1;
- Nc-UDI4 é um isolado menos virulento quando comparada a Nc-Liv, pois induziu menor parasitismo e mortalidade em camundongos, com um perfil semelhante a Nc-1;
- Nc-UDI4 e Nc-1 induzem uma menor quantidade de IL-10 em ensaios in vitro e in vivo, quando comparados a Nc-Liv, citocina esta que favorece o parasitismo.

8 Referências Bibliográficas

ABDOLI, Amir; ARBABI, Mohsen; DALIMI, Abdolhossein; PIRESTANI, Majid. Molecular detection of *Neospora caninum* in house sparrows (*Passer domesticus*) in Iran. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, England, v. 44, n. 4, p. 319–322, 2015. DOI: 10.1080/03079457.2015.1050583.

ABDUL-CADER, Mohamed Sarjoon; AMARASINGHE, Aruna; ABDUL-CAREEM, Mohamed Faizal. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. **Archives of virology**, Austria, v. 161, n. 8, p. 2075–2086, 2016. DOI: 10.1007/s00705-016-2904-x.

ABE, Chisa; TANAKA, Sachi; IHARA, Fumiaki; NISHIKAWA, Yoshifumi. Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1185–1188, 2014. DOI: 10.1128/CVI.00082-14.

AJZENBERG, Daniel; COGNÉ, Nadine; PARIS, Luc; BESSIÈRES, Marie-Hélène; THULLIEZ, Philippe; FILISETTI, Denis; PELLOUX, Hervé; MARTY, Pierre; DARDÉ, Marie-Laure. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 186, n. 5, p. 684–689, 2002. DOI: 10.1086/342663.

ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. **Research in veterinary science**, England, v. 95, n. 2, p. 303–309, 2013. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.04.008.

ALMERIA, Sonia; SERRANO-PEREZ, Beatriz; LOPEZ-GATIUS, Fernando. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial pathogenesis**, England, v. 109, p. 177–182, 2017. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.05.042.

ALVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular phylogenetics and evolution**, United States, v. 29, n. 3, p. 417–434, 2003. DOI: 10.1016/s1055-7903(03)00208-2.

ANDERSON, T. J. et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular biology and evolution**, United States, v. 17, n. 10, p. 1467–1482, 2000. DOI:

10.1093/oxfordjournals.molbev.a026247.

ANVARI, Davood; SABERI, Reza; SHARIF, Mehdi; SARVI, Shahabbedin; HOSSEINI, Seyed Abdollah; MOOSAZADEH, Mahmood; HOSSEININEJAD, Zahra; CHEGENI, Tooran Nayeri; DARYANI, Ahmad. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dog Population Worldwide: A Systematic Review and Meta-analysis. **Acta parasitologica**, Switzerland, v. 65, n. 2, p. 273–290, 2020. DOI: 10.2478/s11686-019-00163-4.

BAI, Meng-Jie; WANG, Jin-Lei; ELSHEIKHA, Hany M.; LIANG, Qin-Li; CHEN, Kai; NIE, Lan-Bi; ZHU, Xing-Quan. **Functional Characterization of Dense Granule Proteins in *Toxoplasma gondii* RH Strain Using CRISPR-Cas9 System** **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00300>. DOI: 10.3389/FCIMB.2018.00300

BANDINI, Giulia; HASERICK, John R.; MOTARI, Edwin; OUOLOGUEM, Dinkorma T.; LOURIDO, Sebastian; ROOS, David S.; COSTELLO, Catherine E.; ROBBINS, Phillips W.; SAMUELSON, John. -fucosylated glycoproteins form assemblies in close proximity to the nuclear pore complexes of *Toxoplasma gondii*; **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 113, n. 41, p. 11567 LP – 11572, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1613653113. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/113/41/11567.abstract>.

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

BARBER, J. S.; TREES, A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **The Veterinary record**, England, v. 139, n. 18, p. 439–443, 1996. DOI: 10.1136/vr.139.18.439

BARROS, Patrício da Silva Cardoso et al. Inducible Nitric Oxide Synthase is required for parasite restriction and inflammatory modulation during *Neospora caninum* infection. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 276, p. 108990, 2019. DOI:

10.1016/j.vetpar.2019.108990.

BARTELS, C. J.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for Neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, United States, v. 52, n. 2, p. 247–257, 1999. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00126-0.

BASSO, W.; SCHARES, S.; BÄRWALD, A.; HERRMANN, D. C.; CONRATHS, F. J.; PANTCHEV, N.; VRHOVEC, M. Globokar; SCHARES, G. Molecular comparison of Neospora caninum oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 160, n. 1–2, p. 43–50, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.085.

BEITING, Daniel P.; PEIXOTO, Lucia; AKOPYANTS, Natalia S.; BEVERLEY, Stephen M.; WHERRY, E. John; CHRISTIAN, David A.; HUNTER, Christopher A.; BRODSKY, Igor E.; ROOS, David S. Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species. **PloS one**, United States, v. 9, n. 2, p. e88398, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0088398.

BERRY, Laurence et al. Toxoplasma gondii chromosomal passenger complex is essential for the organization of a functional mitotic spindle: a prerequisite for productive endodyogeny. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [S. l.], v. 75, n. 23, p. 4417–4443, 2018. DOI: 10.1007/s00018-018-2889-6.

BESTEIRO, Sébastien; DUBREMETZ, Jean-François; LEBRUN, Maryse. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 797–805, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, Germany, v. 70, n. 2, p. 271–274, 1984. DOI: 10.1007/BF00942230.

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. Neospora species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, United States, v. 208, n. 9, p. 1441–1444, 1996.

BRAKE, David A. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. **International journal for parasitology**, England, v. 32, n. 5, p. 509–515, 2002. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00353-8

BUXTON, David; MCALLISTER, Milton M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in parasitology**, England, v. 18, n. 12, p. 546–552, 2002. DOI: 10.1016/s1471-4922(02)02414-5.

BUZONI-GATEL, Dominique; SCHULTHESS, Julie; MENARD, Laurence C.; KASPER, Lloyd H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular microbiology**, England, v. 8, n. 4, p. 535–544, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00692.x.

CABRERA, Andres et al. Isolation and molecular characterization of four novel *Neospora caninum* strains. **Parasitology research**, Germany, v. 118, n. 12, p. 3535–3542, 2019. DOI: 10.1007/s00436-019-06474-9.

CALARCO, Larissa; BARRATT, Joel; ELLIS, John. Genome Wide Identification of Mutational Hotspots in the Apicomplexan Parasite *Neospora caninum* and the Implications for Virulence. **Genome biology and evolution**, England, v. 10, n. 9, p. 2417–2431, 2018. DOI: 10.1093/gbe/evy188.

CALARCO, Larissa; BARRATT, Joel; ELLIS, John. Detecting sequence variants in clinically important protozoan parasites. **International journal for parasitology**, England, v. 50, n. 1, p. 1–18, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpara.2019.10.004.

CAMEJO, Ana; GOLD, Daniel A.; LU, Diana; MCFETRIDGE, Kiva; JULIEN, Lindsay; YANG, Ninghan; JENSEN, Kirk D. C.; SAEIJ, Jeroen P. J. Identification of three novel *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins. **International journal for parasitology**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 147–160, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.08.002.

CAMILLO, G.; CADORE, G. C.; FERREIRA, M. S. T.; BRAÜNIG, P.; MACIEL, J. F.; PIVOTO, F. L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. **Toxoplasma Gondii and Neospora Caninum Antibodies in Backyard Chickens in Rio Grande do Sul, Brazil** **Brazilian Journal of Poultry Science** scielo , , 2015. DOI: 0.1590/1516-635x1702263-265

CERQUEIRA-CEZAR, Camila Koutsodontis; CALERO-BERNAL, Rafael; DUBEY, Jitender Prakash; GENNARI, Solange Maria. All about neosporosis in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, Brazil, v. 26, n. 3, p. 253–279, 2017. DOI: 10.1590/S1984-29612017045.

CHERRY, Ahmed Adnan; ANANVORANICH, Sirinart. Characterization of a homolog of DEAD-box RNA helicases in *Toxoplasma gondii* as a marker of cytoplasmic mRNP stress granules. **Gene**, Netherlands, v. 543, n. 1, p. 34–44, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.04.011.

COCERES, Veronica M.; ALONSO, Andrés M.; ALOMAR, M. Lis; CORVI, María M. Rabbit antibodies against *Toxoplasma Hsp20* are able to reduce parasite invasion and gliding motility in *Toxoplasma gondii* and parasite invasion in *Neospora caninum*. **Experimental parasitology**, United States, v. 132, n. 2, p. 274–281, 2012. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.08.003.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther; LÓPEZ-PÉREZ, Inmaculada; ALVAREZ-GARCÍA, Gema; ORTEGA-MORA, Luis M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 2491–2494, 2006. DOI: 10.1128/IAI.74.4.2491-2494.2006.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, England, v. 38, n. 2, p. 157–159, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.10.008.

COSTA, Luiz Carlos Gebrim de Paula. **Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Toxoplasma Gondii* de galinhas caipiras criadas de forma extensiva no município de Uberlândia - MG**. 2016. Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2016. DOI: <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2016.2>.

DA COSTA, Mylla Spirandelli. *Neospora caninum* in free-range chickens: Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies and parasite DNA. [S. l.], em preparação.

DA SILVA, Murilo Vieira; FERREIRA FRANCA, Flavia Batista; MOTA, Caroline

Martins; DE MACEDO JUNIOR, Arlindo Gomes; RAMOS, Eliezer Lucas Pires; SANTIAGO, Fernanda Maria; MINEO, Jose Roberto; MINEO, Tiago Wilson Patriarca. Dectin-1 Compromises Innate Responses and Host Resistance against *Neospora caninum* Infection. **Frontiers in immunology**, Switzerland, v. 8, p. 245, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00245.

DAVOLI-FERREIRA, Marcela et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. **Scientific reports**, England, v. 6, p. 29289, 2016. DOI: 10.1038/srep29289.

DE BARROS, Luiz Daniel et al. Survey of *Neospora caninum* in eared doves (*Zenaida auriculata*) in Southern Brazil. **Acta tropica**, Netherlands, v. 174, p. 132–135, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.07.007.

DE BARROS, Luiz Daniel; MIURA, Ana Carolina; MINUTTI, Ana Flavia; VIDOTTO, Odilon; GARCIA, Joao Luis. *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology international**, Netherlands, v. 67, n. 4, p. 397–402, 2018. DOI: 10.1016/j.parint.2018.03.009.

DE NAPOLI, M. G.; DE MIGUEL, N.; LEBRUN, M.; MORENO, S. N. J.; ANGEL, S. O.; CORVI, M. M. N-terminal palmitoylation is required for *Toxoplasma gondii* HSP20 inner membrane complex localization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1833, n. 6, p. 1329–1337, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913000803>.

DELLARUPE, Andrea; REGIDOR-CERRILLO, Javier; JIMÉNEZ-RUIZ, Elena; SCHARES, Gereon; UNZAGA, Juan Manuel; VENTURINI, María Cecilia; ORTEGA-MORA, Luis M. Clinical outcome and vertical transmission variability among canine *Neospora caninum* isolates in a pregnant mouse model of infection. **Parasitology**, England, v. 141, n. 3, p. 356–366, 2014. DOI: 10.1017/S0031182013001479.

DENDOUGA, Najoua; CALLEBAUT, Isabelle; TOMAVO, Stanislas. A novel DNA repair enzyme containing RNA recognition, G-patch and specific splicing factor 45-like motifs in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **European journal of biochemistry**, England, v. 269, n. 14, p. 3393–3401, 2002. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02993.x.

DONAHOE, Shannon L.; LINDSAY, Scott A.; KROCKENBERGER, Mark; PHALEN,

David; SLAPETA, Jan. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, England, v. 4, n. 2, p. 216–238, 2015. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2015.04.002.

DORSCH, Matias A.; REGIDOR-CERRILLO, Javier; ORTEGA-MORA, Luis M.; SCIOLI, María V; MORRELL, Eleonora L.; CANTÓN, Germán J.; MOORE, Dadín P.; HECKER, Yanina P. Microsatellite genotyping reveals extensive genetic diversity in bovine *Neospora caninum* from the humid Pampa region in Argentina. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 119, n. 12, p. 4049–4059, 2020. DOI: 10.1007/s00436-020-06922-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06922-x>.

DU, Ling; YANG, Dongsheng; ZHAI, Tao; GONG, Pengtao; ZHANG, Xichen; LI, Jianhua. Detection of *Neospora caninum*-DNA in brain tissues from pigeons in Changchun, Jilin (China). **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 214, n. 1–2, p. 171–173, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.09.005.

DUARTE, Pâmella Oliveira; OSHIRO, Leandra Marla; ZIMMERMANN, Namor Pinheiro; CSORDAS, Bárbara Guimarães; DOURADO, Doroty Mesquita; BARROS, Jacqueline Cavalcante; ANDREOTTI, Renato. Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 9043, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-65991-1.

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**, United States, v. 192, n. 9, p. 1269–1285, 1988. a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, United States, v. 193, n. 10, p. 1259–1263, 1988. b.

DUBEY, J. P.; HEMPHILL, A.; CALERO-BERNAL, Rafael; SCHARES, G. **Neosporosis in Animals**. 1st. ed. [s.l: s.n.], 2017. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315152561>.

DUBEY, J. P.; LIDDELL, S.; MATTSON, D.; SPEERT, C. A.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a

horse. **The Journal of parasitology**, United States, v. 87, n. 2, p. 345–353, 2001. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)087[0345:COTOIO]2.0.CO;2.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 180, n. 1–2, p. 90–108, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.031.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, United States, v. 20, n. 2, p. 323–367, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00031-06.

ENGELBERG, Klemens; CHEN, Chun-Ti; BECHTEL, Tyler; SÁNCHEZ GUZMÁN, Victoria; DROZDA, Allison A.; CHAVAN, Suyog; WEERAPANA, Eranthie; GUBBELS, Marc-Jan. The apical annuli of *Toxoplasma gondii* are composed of coiled-coil and signalling proteins embedded in the inner membrane complex sutures. **Cellular microbiology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. e13112, 2020. DOI: 10.1111/cmi.13112.

ESCOTTE-BINET, Sandie; HUGUENIN, Antoine; AUBERT, Dominique; MARTIN, Anne-Pascaline; KALTENBACH, Matthieu; FLORENT, Isabelle; VILLENA, Isabelle. Metallopeptidases of *Toxoplasma gondii*: in silico identification and gene expression TT - Métallopeptidases de *Toxoplasma gondii* : identification in silico et expression génique. **Parasite (Paris, France)**, [S. l.], v. 25, p. 26, 2018. DOI: 10.1051/parasite/2018025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29737275>.

FARHAT, Dayana C. et al. A MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories and sexual commitment. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 570–583, 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-0674-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0674-4>.

FAVILA, Michelle A.; GERACI, Nicholas S.; JAYAKUMAR, Asha; HICKERSON, Suzanne; MOSTROM, Janet; TURCO, Salvatore J.; BEVERLEY, Stephen M.; MCDOWELL, Mary Ann. Differential Impact of LPG-and PG-Deficient *Leishmania* major Mutants on the Immune Response of Human Dendritic Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e0004238, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004238>.

FENOY, Ignacio M.; BOGADO, Silvina S.; CONTRERAS, Susana M.; GOTTIFREDI, Vanesa; ANGEL, Sergio O. The Knowns Unknowns: Exploring the Homologous

Recombination Repair Pathway in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 7, p. 627, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00627. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199954>.

FEREIG, Ragab M.; NISHIKAWA, Yoshifumi. From Signaling Pathways to Distinct Immune Responses: Key Factors for Establishing or Combating *Neospora caninum* Infection in Different Susceptible Hosts. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 9, n. 5, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9050384.

FRÉNAL, Karine; DUBREMETZ, Jean-François; LEBRUN, Maryse; SOLDATI-FAVRE, Dominique. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. **Nature reviews. Microbiology**, England, v. 15, n. 11, p. 645–660, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.86.

FRÉNAL, Karine; TAY, Chwen L.; MUELLER, Christina; BUSHELL, Ellen S.; JIA, Yonggen; GRAINDORGE, Arnault; BILLKER, Oliver; RAYNER, Julian C.; SOLDATI-FAVRE, Dominique. Global analysis of apicomplexan protein S-acyl transferases reveals an enzyme essential for invasion. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 895–911, 2013. DOI: 10.1111/tra.12081.

FURUTA, P. I.; MINEO, T. W. P.; CARRASCO, A. O. T.; GODOY, G. S.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, England, v. 134, n. Pt.14, p. 1931–1939, 2007. DOI: 10.1017/S0031182007003344.

GARCIA-SANCHEZ, Marta et al. Differential Responses of Bovine Monocyte-Derived Macrophages to Infection by *Neospora caninum* Isolates of High and Low Virulence. **Frontiers in immunology**, Switzerland, v. 10, p. 915, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00915.

GONDIM, L. F. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 101, n. 1, p. 1–7, 2001. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00493-9

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **The Journal of parasitology**, United States, v. 90, n. 6, p. 1361–1365,

2004. DOI: 10.1645/GE-341R.

GONDIM, Leane S. Q.; ABE-SANDES, Kiyoko; UZÊDA, Rosângela S.; SILVA, Mariana S. A.; SANTOS, Sara L.; MOTA, Rinaldo A.; VILELA, Sineide M. O.; GONDIM, Luis F. P. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 168, n. 1–2, p. 121–124, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.09.055.

GONZÁLEZ-WARLETA, Marta; CASTRO-HERMIDA, José Antonio; REGIDOR-CERRILLO, Javier; BENAVIDES, Julio; ÁLVAREZ-GARCÍA, Gema; FUERTES, Miguel; ORTEGA-MORA, Luis Miguel; MEZO, Mercedes. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. **Veterinary research**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 88, 2014. DOI: 10.1186/s13567-014-0088-5.

GOODSWEN, Stephen J.; KENNEDY, Paul J.; ELLIS, John T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Netherlands, v. 13, p. 133–150, 2013. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.08.012.

GREBER, Basil J.; TOSO, Daniel B.; FANG, Jie; NOGALES, Eva. The complete structure of the human TFIIH core complex. **eLife**, [S. l.], v. 8, 2019. DOI: 10.7554/eLife.44771.

GUITON, Pascale S.; SAGAWA, Janelle M.; FRITZ, Heather M.; BOOTHROYD, John C. An in vitro model of intestinal infection reveals a developmentally regulated transcriptome of *Toxoplasma* sporozoites and a NF- κ B-like signature in infected host cells. **PloS one**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. e0173018–e0173018, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0173018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28362800>.

HELMAN, R. G.; STAIR, E. L.; LEHENBAUER, T. W.; RODGERS, S.; SALIKI, J. T. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, United States, v. 10, n. 3, p. 292–295, 1998. DOI: 10.1177/104063879801000314.

HEMPHILL, A.; GAJENDRAN, N.; SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.;

HENTRICH, B.; JENKINS, M. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 429–438, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00193-8). Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751997001938>.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, England, v. 112 (Pt 2, p. 183–197, 1996. DOI: 10.1017/s0031182000084754.

HORCAJO, P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; AGUADO-MARTINEZ, A.; HEMPILL, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite immunology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1111/pim.12342.

HUYNH, My-Hang; BOULANGER, Martin J.; CARRUTHERS, Vern B. A conserved apicomplexan microneme protein contributes to *Toxoplasma gondii* invasion and virulence. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 82, n. 10, p. 4358–4368, 2014. DOI: 10.1128/IAI.01877-14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25092910>.

INNES, Elisabeth A.; WRIGHT, Steve; BARTLEY, Paul; MALEY, Stephen; MACALDOWIE, Colin; ESTEBAN-REDONDO, Irma; BUXTON, David. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, Netherlands, v. 108, n. 1–2, p. 29–36, 2005. DOI: 10.1016/j.vetimm.2005.07.004.

JARDINE, J. E.; LAST, R. D. The prevalence of neosporosis in aborted bovine foetuses submitted to the Allerton Regional Veterinary Laboratory. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, South Africa, v. 62, n. 3, p. 207–209, 1995.

JENKINS, Mark C.; TUO, Wenbin; FENG, Xiaosheng; CAO, Lili; MURPHY, Charles; FETTERER, Raymond. *Neospora caninum*: cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profilin. **Experimental parasitology**, United States, v. 125, n. 4, p. 357–362, 2010. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.03.001.

JUNG, Calvin; LEE, Cleo Y. F.; GRIGG, Michael E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International journal for parasitology**, England, v. 34, n. 3, p. 285–296, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.12.004.

KHAN, Asis et al. Global selective sweep of a highly inbred genome of the cattle parasite *Neospora caninum*; **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 116, n. 45, p. 22764 LP – 22773, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1913531116. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/116/45/22764.abstract>.

KING, Jessica S.; SLAPETA, Jan; JENKINS, David J.; AL-QASSAB, Sarwat E.; ELLIS, John T.; WINDSOR, Peter A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, England, v. 40, n. 8, p. 945–950, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.01.008.

KRISHNA, Ritesh et al. A large-scale proteogenomics study of apicomplexan pathogens- *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **Proteomics**, [S. l.], v. 15, n. 15, p. 2618–2628, 2015. DOI: 10.1002/pmic.201400553.

KUL, O.; ATMACA, H. T.; ANTEPLIOGLU, T.; OCAL, N.; CANPOLAT, S. *Neospora caninum*: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 9–13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.03.005>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997515000535>.

LINDSAY, D. S.; SPENCER, J.; RUPPRECHT, C.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. **The Journal of parasitology**, United States, v. 87, n. 5, p. 1197–1198, 2001. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)087[1197:POAATN]2.0.CO;2.

LINDSAY, David S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 205–222, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072019300519>.

LOBATO, Janaina; SILVA, Deise A. O.; MINEO, Tiago W. P.; AMARAL, Jodi D. H. F.; SEGUNDO, Gesmar R. Silva; COSTA-CRUZ, Julia M.; FERREIRA, Marcelo S.; BORGES, Aercio S.; MINEO, Jose R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, United States, v. 13, n. 1, p. 84–89, 2006. DOI:

10.1128/CVI.13.1.84-89.2006.

MALLON, Marianne E.; MACLEOD, Annette; WASTLING, Jonathan M.; SMITH, Huw; TAIT, Andy. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Netherlands, v. 3, n. 3, p. 207–218, 2003. DOI: 10.1016/s1567-1348(03)00089-3.

MANSILLA, F. C.; QUINTANA, M. E.; CARDOSO, N. P.; CAPOZZO, A. V. Fusion of foreign T-cell epitopes and addition of TLR agonists enhance immunity against *Neospora caninum* profilin in cattle. **Parasite immunology**, England, v. 38, n. 11, p. 663–669, 2016. a. DOI: 10.1111/pim.12354.

MANSILLA, Florencia C.; CAPOZZO, Alejandra V. Apicomplexan profilins in vaccine development applied to bovine neosporosis. **Experimental parasitology**, United States, v. 183, p. 64–68, 2017. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.10.009.

MANSILLA, Florencia Celeste; QUINTANA, Maria Eugenia; LANGELLOTTI, Cecilia; WILDA, Maximiliano; MARTINEZ, Andrea; FONZO, Adriana; MOORE, Dadin Prando; CARDOSO, Nancy; CAPOZZO, Alejandra Victoria. Immunization with *Neospora caninum* profilin induces limited protection and a regulatory T-cell response in mice. **Experimental parasitology**, United States, v. 160, p. 1–10, 2016. b. DOI: 10.1016/j.exppara.2015.10.008.

MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 182, n. 2–4, p. 349–351, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.023.

MARUGAN-HERNANDEZ, V. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. **Journal of comparative pathology**, England, v. 157, n. 2–3, p. 193–200, 2017. DOI: 10.1016/j.jcpa.2017.08.001.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International journal for parasitology**, England, v. 28, n. 9, p. 1473–1478, 1998.

MCGUIRE, A. M.; MCALLISTER, M.; WILLS, R. A.; TRANAS, J. D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*)

with *Neospora caninum* tachyzoites. **International journal for parasitology**, England, v. 29, n. 10, p. 1525–1529, 1999. DOI: 10.1016/s0020-7519(99)00103-4.

MEDINA-ESPARZA, Leticia; REGIDOR-CERRILLO, Javier; GARCÍA-RAMOS, Daniel; ÁLVAREZ-GARCÍA, Gema; BENAVIDES, Julio; ORTEGA-MORA, Luis Miguel; CRUZ-VÁZQUEZ, Carlos. Genetic characterization of *Neospora caninum* from aborted bovine foetuses in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 228, p. 183–187, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716303715>.

MERCIER, Corinne; CESBRON-DELAUW, Marie-France. Toxoplasma secretory granules: one population or more? **Trends in parasitology**, England, v. 31, n. 2, p. 60–71, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2014.12.002.

MESQUITA, Leonardo P. et al. Antibody kinetics in goats and conceptuses naturally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 196, n. 3, p. 327–333, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.002>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171300143X>.

MINEO, Tiago W. P.; BENEVIDES, Luciana; SILVA, Neide M.; SILVA, Joao S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary research**, England, v. 40, n. 4, p. 32, 2009. a. DOI: 10.1051/vetres/2009015.

MINEO, Tiago W. P.; CARRASCO, Adriano O. T.; MARCIANO, José A.; WERTHER, Karin; PINTO, Aramis A.; MACHADO, Rosangela Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 159, n. 2, p. 149–153, 2009. b. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.024.

MINEO, Tiago W. P.; CARRASCO, Adriano O. T.; RASO, Tânia F.; WERTHER, Karin; PINTO, Aramis A.; MACHADO, Rosangela Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 182, n. 2–4, p. 352–355, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.022.

MINEO, Tiago W. P.; OLIVEIRA, Carlo J. F.; GUTIERREZ, Fredy R. S.; SILVA, Joao S. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and cell biology**,

United States, v. 88, n. 8, p. 825–833, 2010. a. DOI: 10.1038/icb.2010.52.

MINEO, Tiago W. P.; OLIVEIRA, Carlo J. F.; SILVA, Deise A. O.; OLIVEIRA, Leandro L.; ABATEPAULO, Antônio R.; RIBEIRO, Dâmaso P.; FERREIRA, Beatriz R.; MINEO, José R.; SILVA, João S. Neospora caninum excreted/secreted antigens trigger CC-chemokine receptor 5-dependent cell migration. **International journal for parasitology**, England, v. 40, n. 7, p. 797–805, 2010. b. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.12.003.

MIRANDA, Vanessa Dos Santos et al. Toll-Like Receptor 3-TRIF Pathway Activation by Neospora caninum RNA Enhances Infection Control in Mice. **Infection and immunity**, United States, v. 87, n. 4, 2019. DOI: 10.1128/IAI.00739-18.

MOEN, A. R.; WOUDA, W.; MUL, M. F.; GRAAT, E. A.; VAN WERVEN, T. Increased risk of abortion following Neospora caninum abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**, United States, v. 49, n. 7, p. 1301–1309, 1998. DOI: 10.1016/S0093-691X(98)00077-6.

MOLINA-LÓPEZ, R.; CABEZÓN, O.; PABÓN, M.; DARWICH, L.; OBÓN, E.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S. High seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in the Common raven (Corvus corax) in the Northeast of Spain. **Research in veterinary science**, England, v. 93, n. 1, p. 300–302, 2012. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.05.011.

MONNEY, Thierry; HEMPHILL, Andrew. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental parasitology**, United States, v. 140, p. 52–70, 2014. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.02.015.

MOTA, Caroline M. et al. Neospora caninum Activates p38 MAPK as an Evasion Mechanism against Innate Immunity. **Frontiers in microbiology**, Switzerland, v. 7, p. 1456, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01456.

MUNHOZ, Alexandre Dias; AMARAL, Tatiane Fernanda Do; GONÇALVES, Luiz Ricardo; MORAES, Vera Maria Barbosa De; MACHADO, Rosangela Zacarias. Gallus gallus domesticus are resistant to infection with Neospora caninum tachyzoites of the NC-1 strain. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 206, n. 3, p. 123–128, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.009>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714005366>.

MUÑOZ, Christian; SAN FRANCISCO, Juan; GUTIÉRREZ, Bessy; GONZÁLEZ, Jorge. Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, p. 141526, 2015. DOI: 10.1155/2015/141526. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/141526>.

NADIPURAM, Santhosh M.; KIM, Elliot W.; VASHISHT, Ajay A.; LIN, Andrew H.; BELL, Hannah N.; COPPENS, Isabelle; WOHLSCHEGEL, James A.; BRADLEY, Peter J. In Vivo Biotinylation of the Toxoplasma Parasitophorous Vacuole Reveals Novel Dense Granule Proteins Important for Parasite Growth and Pathogenesis. **mBio**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2016. DOI: 10.1128/mBio.00808-16.

NARDONI, Simona; POLI, Alessandro; VARVARO, Ilaria; ROCCHIGIANI, Guido; CECCHERELLI, Renato; MANCIANTI, Francesca. **Detection of Neospora Caninum DNA in Wild Birds from Italy** *Pathogens*, 2019. DOI: 10.3390/pathogens8040202.

NISHIKAWA, Yoshifumi et al. Neospora caninum Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 18, p. e01350-18, 2018. DOI: 10.1128/AEM.01350-18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30006392>.

OLIVEIRA, Solange et al. Experimental Neospora caninum infection in chickens (*Gallus gallus domesticus*) with oocysts and tachyzoites of two recent isolates reveals resistance to infection. **International journal for parasitology**, England, v. 48, n. 2, p. 117–123, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpara.2017.07.004.

OTRANTO, Domenico; LLAZARI, Andi; TESTINI, Gabriella; TRAVERSA, Donato; FRANGIPANE DI REGALBONO, Antonio; BADAN, Mara; CAPELLI, Gioia. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 118, n. 1–2, p. 7–18, 2003. DOI: 10.1016/j.vetpar.2003.10.008.

OURA, C. A. L.; ODONGO, D. O.; LUBEGA, G. W.; SPOONER, P. R.; TAIT, A.; BISHOP, R. P. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. **International journal for parasitology**, England, v. 33, n. 14, p. 1641–1653, 2003. DOI: 10.1016/s0020-7519(03)00280-7.

PASTOR-FERNÁNDEZ, Iván; REGIDOR-CERRILLO, Javier; JIMÉNEZ-RUIZ,

Elena; ÁLVAREZ-GARCÍA, Gema; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, Virginia; HEMPHILL, Andrew; ORTEGA-MORA, Luis M. Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle. **Parasitology**, England, v. 143, n. 1, p. 97–113, 2016. DOI: 10.1017/S0031182015001511.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 150, n. 1–2, p. 159–163, 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.08.028.

PETERS, M.; WOHLSEIN, P.; KNIERIEM, A.; SCHARES, G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 97, n. 2, p. 153–157, 2001. DOI: 10.1016/s0304-4017(01)00401-0.

REGIDOR-CERRILLO, Javier et al. Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. **PloS one**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. e72678–e72678, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072678. Disponible em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23940816>.

REGIDOR-CERRILLO, Javier; GOMEZ-BAUTISTA, Mercedes; SODUPE, Itsaso; ADURIZ, Gorka; ALVAREZ-GARCIA, Gema; DEL POZO, Itziar; ORTEGA-MORA, Luis Miguel. In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. **Veterinary research**, England, v. 42, p. 41, 2011. DOI: 10.1186/1297-9716-42-41.

REGIDOR-CERRILLO, Javier; HORCAJO, Pilar; CEGLIE, Letizia; SCHIAVON, Eliana; ORTEGA-MORA, Luis Miguel; NATALE, Alda. Genetic characterization of *Neospora caninum* from Northern Italian cattle reveals high diversity in European *N. caninum* populations. **Parasitology research**, Germany, v. 119, n. 4, p. 1353–1362, 2020. DOI: 10.1007/s00436-020-06642-2.

REGIDOR-CERRILLO, Javier; PEDRAZA-DÍAZ, Susana; GÓMEZ-BAUTISTA, Mercedes; ORTEGA-MORA, Luis M. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. **The Journal of parasitology**, United

States, v. 92, n. 3, p. 517–524, 2006. DOI: 10.1645/GE-713R.1.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **The Journal of small animal practice**, England, v. 48, n. 6, p. 308–312, 2007. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2006.00236.x.

REICHEL, Michael P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, Luis F. P.; ELLIS, John T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International journal for parasitology**, England, v. 43, n. 2, p. 133–142, 2013. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022.

REICHEL, Michael P.; MCALLISTER, Milton M.; POMROY, William E.; CAMPERO, Carlos; ORTEGA-MORA, Luis M.; ELLIS, John T. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, England, v. 141, n. 11, p. 1455–1470, 2014. DOI: 10.1017/S0031182014000158.

RIBEIRO, Claudia Mello; SOARES, Isabela Ribeiro; MENDES, Rodrigo Guerrero; DE SANTIS BASTOS, Paula Andrea; KATAGIRI, Satie; ZAVILENSKI, Renato Bacarin; DE ABREU, Hudson Felipe Porto; AFREIXO, Vera. Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. **Tropical animal health and production**, United States, 2019. DOI: 10.1007/s11250-019-01929-8.

RICO-SAN ROMÁN, Laura; HORCAJO, Pilar; REGIDOR-CERRILLO, Javier; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, Mercedes; COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther; GUTIÉRREZ-BLÁZQUEZ, Dolores; HERNÁEZ-SÁNCHEZ, María Luisa; SAEIJ, Jeroen P. J.; ORTEGA-MORA, Luis Miguel. Comparative tachyzoite proteome analyses among six *Neospora caninum* isolates with different virulence. **International journal for parasitology**, England, v. 50, n. 5, p. 377–388, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.02.003.

ROJO-MONTEJO, Silvia; COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther; PÉREZ-ZABALLOS, Francisco; RODRÍGUEZ-MARCOS, Sonia; BLANCO-MURCIA, Javier; RODRÍGUEZ-BERTOS, Antonio; PRENAFETA, Antoni; ORTEGA-MORA, Luis Miguel. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. **Veterinary research**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 106, 2013. DOI: 10.1186/1297-9716-44-106.

ROJO-MONTEJO, Silvia; COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther; REGIDOR-

CERRILLO, Javier; ALVAREZ-GARCÍA, Gema; MARUGAN-HERNÁNDEZ, Virginia; PEDRAZA-DÍAZ, Susana; BLANCO-MURCIA, Javier; PRENAFETA, Antonio; ORTEGA-MORA, Luis Miguel. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 159, n. 1, p. 7–16, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.009.

ROMERO, J. J.; PÉREZ, E.; FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 123, n. 3–4, p. 149–159, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.06.016.

SAMANT, Mukesh; GUPTA, Reema; KUMARI, Shraddha; MISRA, Pragma; KHARE, Prashant; KUSHAWAHA, Pramod Kumar; SAHASRABUDDHE, Amogh Anant; DUBE, Anuradha. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, v. 183, n. 1, p. 470–479, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0900265.

SANGSTER, Cheryl; BRYANT, Benn; CAMPBELL-WARD, Michelle; KING, Jessica S.; SLAPETA, Jan. Neosporosis in an aborted southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) fetus. **Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, United States, v. 41, n. 4, p. 725–728, 2010. DOI: 10.1638/2009-0250.1.

SAYARI, M.; NAMAVARI, M.; MOJAVER, S. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in free ranging chickens (*Gallus domesticus*). **Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 845–847, 2016. DOI: 10.1007/s12639-014-0590-8.

SCHARES, G. et al. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 106, n. 4, p. 293–305, 2002. DOI: 10.1016/s0304-4017(02)00103-6.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; CASAS-ASTOS, E.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; CHÁVEZ-VELÁSQUEZ, A.; ORTEGA-MORA, L. M. *Neospora* species-associated abortion in

alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Llama glama*). **The Veterinary record**, England, v. 155, n. 23, p. 748–749, 2004.

SHANMUGASUNDRAM, Achchuthan; GONZALEZ-GALARZA, Faviel F.; WASTLING, Jonathan M.; VASIEVA, Olga; JONES, Andrew R. Library of Apicomplexan Metabolic Pathways: a manually curated database for metabolic pathways of apicomplexan parasites. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 41, n. Database issue, p. D706-13, 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1139.

SHASTRI, Anjali J.; MARINO, Nicole D.; FRANCO, Magdalena; LODOEN, Melissa B.; BOOTHROYD, John C. GRA25 is a novel virulence factor of *Toxoplasma gondii* and influences the host immune response. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 2595–2605, 2014. DOI: 10.1128/IAI.01339-13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711568>.

SILVA, Mariana Ferreira. **Papel de fatores celulares indutores de resposta imune de padrão Th1 na produção e funções de anticorpos contra *Neospora caninum***. 2017. Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2017. DOI: 10.14393/ufu.di.2017.524. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18187>.

SOHN, Catherine S.; CHENG, Tim T.; DRUMMOND, Michael L.; PENG, Eric D.; VERMONT, Sarah J.; XIA, Dong; CHENG, Stephen J.; WASTLING, Jonathan M.; BRADLEY, Peter J. Identification of Novel Proteins in *Neospora caninum* Using an Organelle Purification and Monoclonal Antibody Approach. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. e18383, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018383>.

SOMMANUSTWEECHAI, Angkana; VONGPAKORN, Montakan; KASANTIKUL, Tanit; TAEWNEAN, Jedsada; SIRIAROONRAT, Boripat; BUSH, Mitchell; PIRARAT, Nopadon. Systemic neosporosis in a white rhinoceros. **Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, United States, v. 41, n. 1, p. 165–168, 2010. DOI: 10.1638/2009-0048.1.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. **The Journal of protozoology**, United States, v. 36, n. 5, p. 458–463, 1989. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1989.tb01081.x

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American**

journal of veterinary research, United States, v. 58, n. 12, p. 1381–1385, 1997.

TREES, Alexander J.; WILLIAMS, Diana J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in parasitology**, England, v. 21, n. 12, p. 558–561, 2005. DOI: 10.1016/j.pt.2005.09.005.

TU, Vincent et al. The <i>Toxoplasma gondii</i> Cyst Wall Interactome. **mBio**, [*S. l.*], v. 11, n. 1, p. e02699-19, 2020. DOI: 10.1128/mBio.02699-19. Disponível em: <http://mbio.asm.org/content/11/1/e02699-19.abstract>.

WANG, Xiaocen et al. NLRP3 inflammasome activation in murine macrophages caused by *Neospora caninum* infection. **Parasites & vectors**, England, v. 10, n. 1, p. 266, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2197-2.

WANG, Xiaocen; GONG, Pengtao; ZHANG, Nan; LI, Lu; CHEN, Sining; JIA, Lijun; LIU, Xianyong; LI, Jianhua; ZHANG, Xichen. Inflammasome activation restrains the intracellular *Neospora caninum* proliferation in bovine macrophages. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v. 268, p. 16–20, 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.02.008.

WEBER, Fred H.; JACKSON, James A.; SOBECKI, Brian; CHOROMANSKI, Les; OLSEN, Mary; MEINERT, Todd; FRANK, Rodney; REICHEL, Michael P.; ELLIS, John T. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, [*S. l.*], v. 20, n. 1, p. 99–105, 2013. DOI: 10.1128/CVI.00225-12.

WILLIAMS, D. J. L.; HARTLEY, C. S.; BJORKMAN, C.; TREES, A. J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, England, v. 136, n. 14, p. 1895–1900, 2009. DOI: 10.1017/S0031182009990588.

WILLIAMS, J. H.; ESPIE, I.; VAN WILPE, E.; MATTHEE, A. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. **Journal of the South African Veterinary Association**, South Africa, v. 73, n. 1, p. 38–43, 2002. DOI: 10.4102/jsava.v73i1.547.

WOO, Yong H. et al. Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. **eLife**, [*S. l.*], v. 4, p. e06974, 2015. DOI: 10.7554/eLife.06974.

WOODS, L. W.; ANDERSON, M. L.; SWIFT, P. K.; SVERLOW, K. W. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, United States, v. 6, n. 4, p. 508–510, 1994. DOI: 10.1177/104063879400600425.

WOUDA, W.; BARTELS, C. J.; MOEN, A. R. Characteristics of Neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, United States, v. 52, n. 2, p. 233–245, 1999. DOI: 10.1016/s0093-691x(99)00125-9.

XUE, Junxin; JIANG, Wei; CHEN, Yongjun; GONG, Fengju; WANG, Minyan; ZENG, Peng; XIA, Can; WANG, Quan; HUANG, Kehe. Thioredoxin reductase from *Toxoplasma gondii*: an essential virulence effector with antioxidant function. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 31, n. 10, p. 4447–4457, 2017. DOI: 10.1096/fj.201700008R.

YU, ZhengQing et al. Histone deacetylase SIR2 in *Toxoplasma gondii* modulates functions of murine macrophages in vitro and protects mice against acute toxoplasmosis in vivo. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 154, p. 104835, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104835>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021001078>.

Apêndice A - Sequências de nucleotídeos dos primers utilizados no trabalho

Nome do gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Produto da amplificação (bp)
Nc5	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	CCTCCCAATGCGAACGAAA	375
Tg529	CACAGAAGGGACAGAAGT	TCGCCTTCATCTACAGTC	94
GAPDH	CTCGTCCCGTAGACAAAA	AATCTCCACTTTGCACTGCA	100
GPO3/MGSO (<i>Mycoplasma</i> sp.)	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	270

Apêndice B – Padrões de repetição dos microssatélites em 159 isolados de *N. caninum*

	ID	País	Hospedeiro	MS4	MS5	MS6A	MS6B	MS7	MS8	MS10	MS12	MS21
1	NC-1	EUA	Cão	12	12	12	17	16	16	7.12.9	16	6
2	Nc-Liv	Grã-Betanha	Cão	15	9	15	12	14	17	6.26.10	16	6
3	Nc-SweB	Suécia	Bovino	13	13	12	14	13	14	8.23.8	16	6
4	BRA-1-Nc-Bahia	Brasil	Cão	13	13	15	12	9.1	14	5.14.9	16	6
5	Nc-PV1	Itália	Bovino	14	11	19	12	14	16	6.21.10	16	6
6	Nc-GER1	Alemanha	Cão	12	12	14	12	13	14	6.25.9	17	6
7	KBA1	Coréia	Bovino	15	14	14	12	11	15	6.22.9	16	6
8	KBA2	Coréia	Bovino	15	17	14	12	11	15	6.23.10	16	6
9	Nc-Ovelha	Japão	Ovelha	10	9	15	13	11	13	6.24.8	15	6
10	Nc-Goiás	Brasil	Bovino	13	18	14	12	9.1	12	6.16.9	16	6
11	SP-03-NcSp1H	Espanha	Bovino	13	9	18	12	13	16	6.21.10	16	6
12	SP-03-NcSp2H	Espanha	Bovino	13	15	13	12	9.1	14	6.13.9	16	6
13	SP-03-NcSp3H	Espanha	Bovino	13	15	14	11	9.1	14	6.14.9	16	6
14	SP-03-NcSp4H	Espanha	Bovino	13	15	14	11	9.1	14	6.14.9	16	6
15	SP-03-NcSp5H	Espanha	Bovino	11	11	13	11	9.1	16	6.16.8	17	6
16	SP-03-NcSp6	Espanha	Bovino	15	17	15	13	9.1	12	6.13.9	16	6
17	SP-03-NcSp7	Espanha	Bovino	13	10	13	11	10	16	6.23.10	16	5
18	SP-03-NcSp8	Espanha	Bovino	15	15	13	12	18	15	6.18.10	15	6
19	SP-03-NcSp9	Espanha	Bovino	13	10	13	11	10	16	6.21.10	16	5
20	SP-06-NcSp10	Espanha	Bovino	13	9	18	12	13	16	6.21.10	16	6
21	SP-05-1	Espanha	Bovino	12	15	17	12	9.1	12	6.14.9	16	6
22	SP-03-2	Espanha	Bovino	14	18	15	12	9.1	14	6.14.9	16	6
23	SP-03-4	Espanha	Bovino	13	13	13	12	9.1	12	NA	15	6
24	SP-05-5	Espanha	Bovino	12	15	17	12	9.1	12	6.14.9	16	6
25	SP-05-6	Espanha	Bovino	13	15	15	11	9.1	12	6.14.8	16	6
26	SP-03-7	Espanha	Bovino	13	15	12	12	9.1	14	6.13.9	16	6
27	SP-10-8	Espanha	Ovelha	13	13	15	12	9.1	12	6.14.8	15	6
28	SP-08-10	Espanha	Bovino	12	15	17	12	9.1	12	6.14.9	16	6
29	SP-09-12	Espanha	Bovino	12	15	17	NA	9.1	12	6.14.9	16	6
30	SP-10-13	Espanha	Bovino	13	9	18	12	13	12	NA	16	6
31	SP-01-14	Espanha	Bovino	13	16	16	12	9.1	14	6.14.9	16	6
32	SP-01-16	Espanha	Bovino	12	17	15	11	9.1	14	6.13.9	16	6
33	SP-00-17	Espanha	Bovino	13	17	16	12	9.1	15	6.14.9	16	6
34	SP-01-19	Espanha	Bovino	12	16	15	11	9.1	15	7.13.8	15	6
35	SP-02-20	Espanha	Bovino	13	16	15	12	9.1	14	6.13.8	16	6
36	SP-01-21	Espanha	Bovino	13	17	16	12	9.1	13	6.14.9	16	6
37	SP-01-22	Espanha	Bovino	12	16	15	11	9.1	14	6.14.9	16	6
38	SP-01-23	Espanha	Bovino	13	16	14	12	9.1	13	6.13.9	16	6
39	SP-02-26	Espanha	Bovino	13	19	15	12	14	13	6.14.9	16	6
40	SP-04-27	Espanha	Bovino	13	15	NA	12	9.1	12	6.13.9	17	6
41	SP-04-28	Espanha	Bovino	12	18	17	11	9.1	15	6.13.9	16	6
42	SP-04-29	Espanha	Bovino	13	9	13	12	16	11	NA	15	6
43	SP-04-30	Espanha	Bovino	12	19	17	11	9.1	15	6.13.9	16	6

44	SP-05-31	Espanha	Bovino	11	9	13	11	13	14	6.15.8	15	6
45	SP-05-32	Espanha	Bovino	NA	17	16	13	9.1	13	6.15.9	16	6
46	SP-05-33	Espanha	Bovino	14	18	15	13	9.1	14	6.15.9	15	6
47	SP-05-34	Espanha	Bovino	13	15	15	11	9.1	14	6.13.9	16	6
48	SP-05-35	Espanha	Bovino	14	15	16	12	9.1	13	7.11.9	16	6
49	SP-05-36	Espanha	Bovino	14	18	16	13	9.1	13	6.15.9	16	6
50	SP-05-38	Espanha	Bovino	12	16	17	12	9.1	13	6.15.9	16	6
51	SP-05-39	Espanha	Bovino	14	16	15	12	9.1	13	6.14.10	16	6
52	SP-05-40	Espanha	Bovino	13	15	15	12	9.1	13	6.14.8	16	6
53	SP-05-41	Espanha	Bovino	10	9	13	11	11	12	6.20.8	14	6
54	SP-05-42	Espanha	Bovino	14	18	16	13	9.1	13	6.15.9	16	6
55	SP-06-43	Espanha	Bovino	11	13	12	11	14	11	6.15.8	15	6
56	SP-06-44	Espanha	Bovino	12	17	15	12	9.1	14	6.14.9	16	6
57	SP-06-45	Espanha	Bovino	12	18	17	11	9.1	15	6.13.9	16	6
58	SP-06-46	Espanha	Bovino	12	9	13	11	16	14	6.19.11	15	6
59	SP-06-47	Espanha	Bovino	13	15	15	12	9.1	12	6.14.9	16	6
60	SP-06-48	Espanha	Bovino	13	14	15	12	9.1	13	6.14.8	16	6
61	SP-07-49	Espanha	Bovino	15	19	15	12	9.1	14	6.15.9	16	6
62	SP-07-50	Espanha	Bovino	13	15	14	12	9.1	15	6.14.9	16	6
63	SP-07-51	Espanha	Bovino	12	12	15	12	9.1	14	6.14.9	16	5
64	SP-07-52	Espanha	Bovino	12	9	13	11	16	11	6.19.11	16	5
65	SP-07-53	Espanha	Bovino	12	16	15	13	9.1	13	6.14.10	14	6
66	ARG-04-1	Argentina	Bovino	13	17	15	12	9.1	13	6.15.8	16	6
67	ARG-05-3	Argentina	Bovino	13	10	NA	13	10	14	6.12.7	16	5
68	ARG-05-4	Argentina	Bovino	13	16	16	12	9.1	13	6.15.9	16	6
69	ARG-05-5	Argentina	Bovino	13	9	13	11	15	16	6.17.10	16	6
70	ARG-05-6	Argentina	Bovino	13	9	13	11	15	16	6.17.9	16	6
71	ARG-05-7	Argentina	Bovino	13	9	13	11	14	13	6.18.10	16	6
72	ARG-05-8	Argentina	Bovino	13	NA	16	12	9.1	13	5.15.9	16	6
73	ARG-07-9	Argentina	Bovino	13	9	14	11	14	16	6.17.11	16	6
74	ARG-07-10	Argentina	Bovino	11	14	15	12	9.1	12	6.15.9	16	6
75	ARG-07-12	Argentina	Bovino	13	9	13	11	16	16	6.18.10	16	6
76	ARG-08-14	Argentina	Bovino	13	9	16	12	16	13	6.15.9	16	6
77	ARG-08-15	Argentina	Bovino	12	15	14	12	9.1	12	6.15.9	16	6
78	SCOT-07-1	Escócia	Bovino	10	NA	15	12	12	12	6.25.9	16	6
79	SCOT-08-2	Escócia	Bovino	16	9	23	12	13	NA	6.25.10	16	6
80	SCOT-08-3	Escócia	Bovino	13	17	15	12	10.1	12	6.12.8	16	6
81	SCOT-08-4	Escócia	Bovino	11	10	13	11	9.1	17	6.16.8	17	6
82	SCOT-08-5	Escócia	Bovino	11	10	13	11	9.1	16	6.15.8	17	6
83	SCOT-08-6	Escócia	Bovino	13	9	13	11	15	11	6.20.10	15	6
84	SCOT-08-9	Escócia	Bovino	11	9	13	11	9.1	17	6.15.8	16	6
85	GER-00-1	Alemanha	Bovino	15	13	13	12	19	16	6.22.10	15	6
86	GER-08-2	Alemanha	Bovino	13	13	15	12	9.1	16	6.14.8	16	6
87	GER-08-3	Alemanha	Bovino	13	17	15	12	11	NA	6.13.9	16	6
88	GER-08-4	Alemanha	Bovino	11	11	13	11	9.1	16	6.15.8	17	6
89	GER-09-5	Alemanha	Bovino	15	15	13	12	18	13	6.19.10	15	6
90	GER-05-6	Alemanha	Bovino	11	9	13	11	13	14	6.15.8	15	6
91	GER-05-7	Alemanha	Bovino	12	9	13	13	11	NA	7.17.9	17	6
92	GER-09-8	Alemanha	Bovino	15	12	15	12	18	16	6.14.8	14	6
93	MEX-11-1	Mexico	Bovino	13	19	15	12	9.1	15	6.14.9	16	6
94	MEX-11-2	Mexico	Bovino	10	9	14	12	12	13	6.23.9	15	6

95	MEX-10-3	Mexico	Bovino	14	15	16	12	9.1	14	6.13.9	15	NA
96	MEX-10-8	Mexico	Bovino	14	15	15	12	9.1	13	6.28.9	16	6
97	MEX-10-10	Mexico	Bovino	14	15	15	12	9.1	13	6.28.9	16	6
98	MEX-11-12	Mexico	Bovino	12	NA	13	12	11	19	6.17.7	15	6
99	MEX-10-13	Mexico	Bovino	9	9	15	13	12	15	6.20.9	15	6
100	MEX-11-14	Mexico	Bovino	14	NA	13	12	9.1	13	6.15.9	16	6
101	MEX-11-15	Mexico	Bovino	10	9	15	12	12	13	6.22.9	15	NA
102	MEX-12-21	Mexico	Bovino	10	9	17	13	12	14	6.23.9	15	6
103	MEX-12-22	Mexico	Bovino	10	9	17	13	12	14	6.24.9	15	6
104	BRA-06-2-180	Brasil	Bovino	13	15	14	12	10	13	6.14.10	16	6
105	BRA-3-NC-SP1 (BRA-15)	Brasil	Bovino	13	19	15	12	9.1	13	6.14.10	16	6
106	BRA-12-4-BNC-PR4	Brasil	Bovino	14	15	15	12	9.1	13	6.13.9	16	6
107	ARG-16	Argentina	Cabra	14	15	16	12	9.1	13	5.14.8	16	7
108	SP-14-54	Espanha	Ovelha	15	16	15	12	9.1	13	6.14.9	16	6
109	ITA-14-5	Itália	Bovino	11	NA	15	12	8.1*	13	6.14.9	16	6
110	ITA-14-6	Itália	Bovino	14	9	19	12	14	16	NA	16	6
111	ITA-14-7	Itália	Bovino	14	9	20	12	14	16	6.22.10	16	6
112	ITA-14-10	Itália	Bovino	15	9	19	12	14	17	6.22.11	16	6
113	ITA-14-12	Itália	Bovino	13	15	15	12	10.1	13	6.14.9	16	6
114	ITA-14-14	Itália	Bovino	10	9	13	11	11	12	6.18.8	14	6
115	ITA-14-15	Itália	Bovino	10	9	13		11	12	6.18.8	14	6
116	ITA-14-16	Itália	Bovino	12	13	14	12	14	14	6.21.9	17	6
117	ITA-14-17	Itália	Bovino	13	18	14	11	10.1	13	6.14.11	16	6
118	ITA-14-18	Itália	Bovino	10	9	13	11	11	12	6.21.8	14	6
119	ITA-14-19	Itália	Bovino	15	9	20	12	14	16	6.23.11	15	6
120	ITA-14-20	Itália	Bovino	12	16	15	12	9.1	12	6.14.8	16	6
121	ITA-14-21	Itália	Bovino	11	NA	13	11	12	12	7.12.10	15	6
122	ITA-14-22	Itália	Bovino	11	10	12	13	13	13	9.23.8	16	6
123	ITA-15-24	Itália	Bovino	16	9	18	12	14	16	6.23.10	16	6
124	ITA-15-26	Itália	Bovino	14	11	15	12	12	19	5.18.9	15	6
125	ITA-15-27	Itália	Bovino	12	17	15	12	9.1	13	6.14.9	17	6
126	ITA-15-28	Itália	Bovino	9	10	13	11	10	14	NA	16	6
127	ITA-15-29	Itália	Bovino	13	14	13	12	10.1	13	6.14.9	16	6
128	ITA-15-30	Itália	Bovino	10	9	13	11	11	12	6.18.8	14	6
129	ITA-15-31	Itália	Bovino	13	15	15	12	9.1	14	6.15.9	16	6
130	ITA-15-33	Itália	Bovino	13	NA	15	12	8.1*	13	6.14.9	16	6
131	ITA-15-34	Itália	Bovino	12	9	13	13	11	14	7.19.9	16	6
132	ITA-15-35	Itália	Bovino	13	16	15	12	8.1*	13	6.14.9	16	6
133	ITA-16-36	Itália	Bovino	11	9	14	14	12	13	6.22.10	18	6
134	ITA-16-37	Itália	Bovino	14	9	20	12	14	16	6.26.11	16	6
135	ITA-16-38	Itália	Bovino	16	13	13	12	17*	16	6.20.10	15	6
136	ITA-16-39	Itália	Bovino	15	9	13	11	11	14	6.18.9	15	6
137	ITA-16-40	Itália	Bovino	15	9	19	12	14	16	6.23.11	16	6
138	ITA-16-41	Itália	Cabra	12	14	12	11	15	15	7.24.9	17	6
139	ARG-10-22	Argentina	Bovino	15	10	13	12	12	15	6.15.6	15	5
140	ARG-12-28	Argentina	Bovino	13	9	14	11	15	NA	6.15.10	17	6
141	ARG-14-37	Argentina	Bovino	13	16	16	12	9.1	13	6.16.9	18	6
142	ARG-14-39	Argentina	Bovino	13	15	13	12	9.1	13	6.15.9	16	6
143	ARG-14-40	Argentina	Bovino	14	14	13	12	9.1	13	5.14.9	16	6
144	ARG-15-47	Argentina	Bovino	10	14	12	11	9.1	15	NA	16	6

145	ARG-15-44	Argentina	Bovino	13	9	14	11	15	19	6.17.10	17	6
146	ARG-15-50	Argentina	Bovino	13	9	11	11	15	16	6.16.11	16	6
147	ARG-16-53	Argentina	Bovino	13	9	13	11	14	15	6.18.10	17	6
148	ARG-16-55	Argentina	Bovino	13	9	13	11	15	16	6.17.10	16	6
149	ARG-17-60	Argentina	Bovino	8	11	11	NA	10	13	7.16.7	16	5
150	ARG-17-61	Argentina	Bovino	13	9	13	11	15	17	6.17.10	16	6
151	ARG-17-62	Argentina	Bovino	13	9	13	11	14	15	6.18.10	16	6
152	ARG-18-64	Argentina	Bovino	12	9	13	11	13	16	NA	16	6
153	ARG-19-66	Argentina	Bovino	13	9	13	11	15	16	6.15.10	16	6
154	ARG-19-67	Argentina	Bovino	11	10	11	12	10	15	6.14.8	16	5
155	ARG-19-68	Argentina	Bovino	13	13	16	12	9.1	13	5.14.9	16	6
156	ARG-19-69	Argentina	Bovino	13	14	17	12	9.1	12	6.16.9	16	6
157	ARG-19-70	Argentina	Bovino	13	13	16	12	9.1	13	6.15.9	16	6
158	ARG-19-71	Argentina	Bovino	13	14	14	NA	9.1	13	6.15.9	16	6
159	Nc-UDI4	Brasil	Galinha	13	11	12	11	15	16	6.28.4	16	6

Apêndice C - Identificação das regiões que tiveram maior quantidade de SNPs.

Cromossomo	Região inicial	Região final	SNPs	Genes	Anotações
FR823380 (Ia)	2260000	227999	1006	-	No annotation
FR823381 (Ib)	1900000	1909999	127	-	No annotation
FR823382 (II)	0	29999	2013	NCLIV_004630	Threonine synthase
FR823383 (III)	1840000	184999	130	NCLIV_009150	Alpha-galactosidase (rhoptries)
				NCLIV_009170	Proteasome subunit beta (proteasome)
				NCLIV_009180	hypothetical protein
FR823384 (IV)	0	9999	306	NCLIV_009520	hypothetical protein (Golgi)
FR823386 (V)	940000	94999	223	NCLIV_013220	hypothetical protein
				NCLIV_013230	hypothetical protein
				NCLIV_013240	hypothetical protein (apicoplast)
				NCLIV_013250	hypothetical protein
FR823387 (VI)	60000	60999	236	NCLIV_015470	HIT-type domain-containing protein
				NCLIV_015480	GOLD domain-containing protein (Golgi)
	220000	239999	449	NCLIV_015690	hypothetical protein
				NCLIV_015700	hypothetical protein

				NCLIV_015710	RanBP2-type domain-containing protein (Nucleus)
				NCLIV_015720	SAG domain-containing protein (PM – peripheral)
					SAG-related sequence SRS22F
	3300000	3399999	136	NCLIV_015730	hypothetical protein
FR823388 (VIIa)	0	9999	274	NCLIV_019380	hypothetical protein
	40000	49999	182	NCLIV_019390	SWI2/SNF2 SRCAP/Ino80 (nucleus)
	630000	639999	166	NCLIV_019910	Membrane protein
	2010000	2019999	152	NCLIV_021540	hypothetical protein (PM – peripheral)
	2240000	2249999	185	NCLIV_021800	Dynein heavy chain family protein
FR823389 (VIIb)	0	19999	679	NCLIV_023850	hypothetical protein (cytosol)
FR823390 (VIII)	3340000	3349999	262	NCLIV_034260	Ion channel protein
				NCLIV_034250	hypothetical protein
				NCLIV_034240	Mitochondrial carrier superfamily protein
					SAG-related sequence SRS29A
					SAG-related sequence SRS29B
				NCLIV_034380	SAG-related sequence SRS29C
				NCLIV_034390	SAG domain-containing protein
				NCLIV_034381	SAG-related sequence SRS30D
	SAG-related sequence SRS30A				

					SAG-related sequence SRS30C
	6670000	6799999	598	-	No annotation
FR823385 (IX)	410000	419999	208	NCLIV_038810	Kinesin motor domain-containing protein (Apical)
				NCLIV_038830	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
				NCLIV_038820	Deacetylase sirtuin-type domain-containing protein
				NCLIV_038860	Myosin heavy chain, putative
	4390000	4399999	170	NCLIV_043730	hypothetical protein
				NCLIV_043740	KRUF family protein
				NCLIV_043750	hypothetical protein (apicoplast)
FR823391 (X)	0	99999	422	NCLIV_044840	hypothetical protein (mitochondria)
FR823393 (XII)	3410000	3419999	460	NCLIV_064500	hypothetical protein
				NCLIV_064560	hypothetical protein
				NCLIV_064570	UAS domain-containing protein (nucleus)
				NCLIV_064590	Apical membrane antigen 1 domain-containing protein
				NCLIV_064600	Aminotran_5 domain-containing protein (cytosol)
				NCLIV_064620	Rhoptry neck protein 2 (rhoptries)
				NCLIV_064520	hypothetical protein (rhoptries)

				NCLIV_064510	Nuclease, putative
	6400000	6499999	153	NCLIV_068710	hypothetical protein

Apêndice D - Identificação das regiões que tiveram maior quantidade de InDels.

Cromossomo	Região inicial	Região final	InDels	Genes	Anotação
FR823382 (II)	0	29999	47	NCLIV_004630	Threonine synthase
FR823384 (IV)	920000	939999	69	NCLIV_010680	Hypothetical protein
				NCLIV_010690	Hypothetical protein
				NCLIV_010700	Hypothetical protein
	2030000	2039999	44	NCLIV_011990	FG-GAP repeat-containing protein (Golgi)
				NCLIV_012000	Hypothetical protein
FR823386 (V)	0	9999	19	NCLIV_012220	Hypothetical protein (cytosol)
	430000	439999	17	NCLIV_015910	Diacylglycerol kinase, putative (ER)
FR823388 (VIIa)	2240000	2249999	44	NCLIV_021800	Dynein heavy chain family protein
	3900000	3909999	22	-	-
FR823389 (VIIb)	4900000	4909999	37	NCLIV_030020	hypothetical protein
				NCLIV_030030	WD repeat domain 35 family protein
FR823385 (IX)	0	9999	20	NCLIV_038310	hypothetical protein
FR823392 (XI)	2200000	2299999	30	NCLIV_055740	hypothetical protein
				NCLIV_055750	hypothetical protein
				NCLIV_055770	hypothetical protein (mitochondrion)
				NCLIV_055790	Hypothetical protein

					(nucleus)
				NCLIV_055800	serine/threonine protein phosphatase (cytosol)
				NCLIV_055820	DNA topoisomerase 2, putative (nucleus)
				NCLIV_055830	DNA-directed RNA polymerase III RPC11 (nucleus)
FR823393 (XII)	3410000	3419999	165	NCLIV_064500	hypothetical protein
				NCLIV_064510	Nuclease, putative
	6400000	6499999	26	NCLIV_068710	hypothetical protein

Apêndice E - Identificação e classificação das mutações não sinônimas

Identificação do gene de <i>N. caninum</i> (Nc)	Descrição do gene Nc	Tipo de polimorfismo	Identificação do gene de <i>T. gondii</i> (Tg) (ortologia e sintonia)	Descrição do gene Nc	Função	Referências
Crescimento e ciclo celular						
NCLIV_057190	hypothetical protein	Missense	TGME49_313990	CEBPZ/Mak21-like	Biogênese ribossomal	InterPro (IPR040155)
NCLIV_057360	hypothetical protein	Deleção	TGME49_314280	AAR2 protein	Proteína envolvida no splicing de pre-mRNA. Gene importante para o crescimento celular	InterPro (IPR038514)
NCLIV_051220	ImpB/MucB/SamB family protein, related	Missense	TGME49_237480	BRCA1 C Terminus (BRCT) domain-containing protein	Proteína responsável pelos <i>checkpoints</i> do ciclo celular e reparo de DNA	(FENOY et al., 2016)
Biosíntese, replicação, recombinação e reparo de ácido nucleico						
NCLIV_068140	Methyltransferase-like protein, related	Missense	TGME49_277860	hypothetical protein	Ligante de ácido nucleico	InterPro (IPR029063)

NCLIV_057470	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314410	hypothetical protein	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase responsável pelo metabolism de purinas.	(SHANMUGASUND RAM et al., 2013)
NCLIV_049130	putative XPG N-terminal domain containing protein	Nonsense	TGME49_212250	XPG N-terminal domain-containing protein	Nuclease envolvida na replicação, reparo e recombinação de DNA	(BERRY et al., 2018)
NCLIV_051870	putative DNA repair	Deleção	TGME49_214820	G-patch domain-containing protein	Reparo do DNA	(DENDOUGA; CALLEBAUT; TOMAVO, 2002)
NCLIV_005250	putative subtilisin-like serine protease	Deleção	TGME49_221830	subtilisin SUB12	TgSUB12 - proteólise	ToxoDB/InterPro
Metabolismo de RNA						
NCLIV_015740	conserved hypothetical protein	Missense	TGVEG_238880	RNA polymerase I specific transcription initiation factor RRN3	Componente da RNA polymerase I que inicia a transcrição de RRN3	InterPro (IPR007991)
NCLIV_004610	hypothetical protein	Missense	TGME49_321290	Prp18 domain-containing protein	Ribonucleoproteína envolvida no splicing de pre mRNA	InterPro (IPR036285)

NCLIV_039060	putative helicase	Missense	None	None	Processamento de RNA	Inter Pro (IPR036389)
NCLIV_057320	hypothetical protein	Missense	TGME49_314240	general transcription factor IIIC polypeptide 3 GTF3C3	Transcrição por RNA polimerase III	InterPro (IPR039340)
NCLIV_027320	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_259210	jmjC domain-containing protein C2orf60	Ligante de tRNA	ToxoDB (GO:0000049)
NCLIV_051757	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314480	hypothetical protein	Ligante de RNA	ToxoDB (GO:0003723)
NCLIV_057560	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314515	hypothetical protein	Transcrição por RNA polimerase II	InterPro (IPR013929)
NCLIV_057570	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314530	RPAP1 family, C-terminal protein	Transcrição por RNA polimerase II	InterPro (IPR013929)
NCLIV_015770	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238930	hypothetical protein	Atividade proteica de metiltransferase	InterPro (IPR038899)
NCLIV_039130	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_266930	general transcription factor IIH polypeptide 3 GTF2H3	Complexo proteico importante para o início da transcrição através da RNA polimerase II	(GREBER et al., 2019)
NCLIV_028950	conserved hypothetical protein	Nonsense	TGME49_284050	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	Processamento do RNA e regulação transcricional	(CHERRY; ANANVORANICH, 2014)

NCLIV_057540	hypothetical protein	Missense	TGME49_314480	hypothetical	Ligante de RNA	ToxoDB (GO:0003723)
NCLIV_039750	hypothetical protein	Nonsense	TGME49_265530	RNA recognition motif-containing protein	Ligante de RNA	InterPro (IPR035979)
Síntese, dobramento e modificação de proteínas						
NCLIV_000110	arabiNonegalactan protein, related	Missense	TGME49_293060	B30.2/SPRY domain-containing protein	Ligação proteica	ToxoDB (GO:0005515)
NCLIV_053290	ORF73, related	Missense	None	None	Ligação proteica	ToxoDB (GO:0005515)
NCLIV_043740	hypothetical protein	Missense	TGME49_292390	KRUF family	NcKRUF9 – Tradução de mRNA	ToxoDB (GO:0003743)
NCLIV_057420	putative WW domain-containing protein	Missense	TGME49_314358	hypothetical protein	Ligação proteica	ToxoDB (GO:0005515)
NCLIV_056700	26S proteasome regulatory subunit rpn1, related	Missense	TGME49_313410	26S proteasome regulatory subunit rpn1, related	Regulação de processos catabólicos	InterPro (IPR016024)
NCLIV_038320	unspecified product	Missense	None	None	Ligação proteica	ToxoDB (GO:0005515)
NCLIV_068220	conserved hypothetical protein	Deleção	TGME49_277740	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein	Ubiquitinação de proteínas	(MUÑOZ et al., 2015)
Modificação de histonas, cromatinas e estrutura de microtúbulos						
NCLIV_034250	hypothetical protein	Missense	None	None	Ligante histone H1/H5 essencial para a estrutura de croamtinias	ToxoDB

NCLIV_038820	Putative Sir2 domain-containing protein	Missense	TGME49_267360	histone deacetylase SIR2-like	Pertence a família Sir2 que está relacionada a atividades metabólicas e acetilação de histonas	(YU et al., 2021)
NCLIV_057080	Regulator of chromosome condensation RCC1 (Precursor), related	Missense	TGME49_313860	Regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein	Regulador da condensação cromossômica - Inibidor beta-lactamase	InterPro (IPR009091)
Sinalização celular						
NCLIV_069880	IQ calmodulin-binding motif domain-containing protein, putative	Deleção	TGME49_224610	GYF domain-containing protein	Ligante de cálcio que é um elemento importante para processos de invasão e egresso do parasito nas células hospedeiras	(KRISHNA et al., 2015)
NCLIV_040020	conserved hypothetical protein	Deleção	TGME49_265240	hypothetical protein		
NCLIV_056720	putative nucleoporin FG repeat-containing protein	Missense	TGME49_313430	hypothetical protein	Transporte nuclear	(BANDINI et al., 2016)
NCLIV_015710	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238510	conserved hypothetical protein	Transporte nuclear	InterPro (IPR001876)
Tráfego intracelular/transmembrana						
NCLIV_033050	conserved hypothetical protein	Missense/Deleção	TGME49_233245	hypothetical protein	Domínio REJ importante para o transporte de íons e homeostase	InterPro (IPR014010)

NCLIV_040610	Virulent strain associated lipoprotein, related	Missense	TGME49_264420	lipoprotein	Transferência de lipídeos	ToxoDB
NCLIV_056870	hypothetical protein	Missense	TGME49_313590	hypothetical protein	CLEC16A (C-Type Lectin Domain Containing 16A) contribuiu para o transporte transmembrana e tráfico de flavonóides no apicoplasto.	InterPro (IPR039272)/ToxoDB
NCLIV_061220	putative cation-transporting ATPase	Deleção	None	None	Complexo enzimático responsável por transporte de íons nas membranas	ToxoDB
NCLIV_064140	KIAA0415, related	Nonsense	TGME49_248150	hypothetical protein	Putative orthologue of the zeta subunit of the adapter protein 5 complex	(WOO et al., 2015)

Energia e metabolismo

Metabolismo de lipídeos

NCLIV_015680	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein, related	Missense	TGME49_238400	Endonuclease/Exonuclease/Phosphatase domain-containing protein	Metabolismo de inositol	(SHANMUGASUNDRAM et al., 2013)
NCLIV_056880	hypothetical protein	Missense	TGME49_313600	DDHD domain-containing protein	Reciclagem de fosfolipídeos	(SHANMUGASUNDRAM et al., 2013)

Metabolismo de aminoácidos

NCLIV_048230	hypothetical protein	Missense	TGME49_224460	aminopeptidase n, putative	Peptidase da família M1 (aminopeptidase N) dependents da atividade do íon zico/catalisa a clivagem de aminoácidos	(ESCOTTE-BINET et al., 2018)
--------------	----------------------	----------	---------------	----------------------------	---	------------------------------

Metabolismo redox

NCLIV_015430	hypothetical protein	Missense	TGME49_238040	Thioredoxin-like protein	Atividade redox	ToxoDB
--------------	----------------------	----------	---------------	--------------------------	-----------------	--------

Metabolismo de vitaminas, cofatores e outros substratos

NCLIV_063390	putative ABC1 family beta-lactamase	Deleção	TGME49_246600	ABC1 family protein	Quinase que participa do metabolismo de ubiquinona	ToxoDB
--------------	-------------------------------------	---------	---------------	---------------------	--	--------

Metabolismo de carboidratos

NCLIV_057410	Putative sodium-and chloride-dependent neutral and basic amino acid transporter	Missense/Deleção	TGME49_314340	Sodium:neurotransmitter symporter family protein	-	(SHANMUGASUNDRAM et al., 2013)
--------------	---	------------------	---------------	--	---	--------------------------------

Relacionados a resposta imune

NCLIV_015050	Proteophosphoglycan ppg4, related	Missense	TGME49_285140	hypothetical protein	Proteína de superfície celular	(FAVILA et al., 2015)
--------------	-----------------------------------	----------	---------------	----------------------	--------------------------------	-----------------------

Adesão/invasão/sobrevivência***Adesão e invasão celular***

NCLIV_002450	hypothetical protein	Deleção	None	None	Proteína que contém LRRs (Leucine-rich repeat domain). Presente em proteínas virais e eucarióticas que auxilia em interações proteína-proteína	InterPro (IPR032675)
NCLIV_034391	SRS domain-containing protein	Missense	None	None	Antígenos de superfície	(RICO-SAN ROMÁN et al., 2020)/ToxoDB
NCLIV_038960	SRS domain-containing protein	Missense	TGME49_267140	SAG-related sequence SRS38B		
NCLIV_020092	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_025185	SAG domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_038970	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_020080	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_020100	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_010040	SRS domain-containing protein	Missense	TGVEG_320230	SAG-related sequence SRS15C		

NCLIV_020093	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_034430	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_010720	SRS domain-containing protein	Missense	TGME49_319350	SAG-related sequence SRS17B		
NCLIV_015720	conserved hypothetical protein	Missense	TGGT1_361050	SAG-related sequence protein SRS22I		
NCLIV_020091	SRS domain-containing protein	Missense	None	None		
NCLIV_017780	conserved hypothetical protein	Missense/Deleção	TGME49_242790	Putative Trichohyalin	Proteína do complex apical annuli proteico 1 (AAP1). Em <i>T. gondii</i> participa do complexo interno de membrana (IMC).	(ENGELBERG et al., 2020)
NCLIV_056770	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_313480	hypothetical protein		
NCLIV_029340	putative EGF-like domain-containing protein	Missense	TGME49_255460	EGF-like domain-containing protein, putative	Proteínas que contém domínios EGF ou TSR que tem propriedades de adesão. Proteínas que contém esses domínios estão envolvidas em processos de invasão.	(HUYNH; BOULANGER; CARRUTHERS, 2014)
NCLIV_015660	hypothetical protein	Missense	TGME49_238380	hypothetical		ToxoDB - LOPIT

NCLIV_028800	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_255160	hypothetical protein	Proteína do complexo apical	
NCLIV_030100	DHHC zinc finger domain-containing protein	Deleção	TGME49_029160	DHHC zinc finger domain-containing protein	DHHC12 – Importante para invasão do parasito.	(FRÉNAL et al., 2013)
NCLIV_001270	conserved hypothetical protein	Deleção	TGME49_305020	hypothetical protein	Proteína HSP20 que participa do complexo interno de membrana	(DE NAPOLI et al., 2013)
NCLIV_033570	putative protein kinase (incomplete catalytic triad)	Nonsense	TGME49_274170	protein kinase (incomplete catalytic triad)	Papel importante na proliferação, diferenciação e patogênese de <i>T. gondii</i> .	Wei et al., 2013
NCLIV_056660	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_313370	hypothetical protein	Complexo interno de membrana	(XUE et al., 2017)
<i>Proteínas de roptrias</i>						
NCLIV_057550	unspecified product	Missense	TGME49_314500	subtilisin SUB2	Roptria	ToxoDB (12890015)
NCLIV_046970	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_225860	conserved hypothetical protein	Roptria	(CAMEJO et al., 2014)
<i>Proteínas de grânulos denso</i>						
NCLIV_013180	GM04207p, related	Missense	TGME49_213067	hypothetical protein	Grânulo denso 35 (GRA36)	(GUITON et al., 2017)
NCLIV_062680	hypothetical protein	Missense	TGME49_200010	hypothetical protein	Grânulo denso 20 (GRA20)	(BAI et al., 2018)
NCLIV_042680	hypothetical protein	Missense	TGME49_290700	hypothetical protein	Grânulo denso 25 (GRA25)	(NADIPURAM et al., 2016)

NCLIV_062690	hypothetical protein	Missense	TGME49_245432	hypothetical protein	Grânulo denso 19 (GRA19)	(MERCIER; CESBRON-DELAUW, 2015)
<i>Sobrevivência do parasito</i>						
NCLIV_015760	hypothetical protein	Missense	TGME49_238915	hypothetical	Importante no estágio de merozoitos	(FARHAT et al., 2020)
NCLIV_027600	conserved hypothetical protein	Nonsense	TGME49_258870	conserved hypothetical protein	Proteína da parede de cistos	(TU et al., 2020)
Proteínas transmembrana						
NCLIV_021540	conserved hypothetical protein	Deleção	TGVEG_203400	putative transmembrane protein		ToxoDB
NCLIV_045610	conserved hypothetical protein	Missense	TGVEG_227780	putative transmembrane protein		
NCLIV_056810	hypothetical protein	Missense	TGVEG_313540	putative transmembrane protein		
NCLIV_069520	hypothetical protein	Missense	TGVEG_213480	putative transmembrane protein		
NCLIV_064270	conserved hypothetical protein	Deleção	TGVEG_248300	putative transmembrane protein		
Outros						
NCLIV_014290	conserved hypothetical protein	Missense/Deleção	None	None	Tranmissão sináptica	ToxoDB

NCLIV_015690	hypothetical protein	Missense	TGME49_238410	conserved hypothetical protein	Rubredoxina, ligante de ferro.	ToxoDB
NCLIV_015510	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238140	hypothetical protein	Domínio WD40/YVTN ligante proteico	InterPro (IPR015943)
Hipotéticas						
NCLIV_035110	hypothetical protein	Deleção	None	None		
NCLIV_015470	conserved hypothetical protein	Nonsense	TGME49_238080	hypothetical protein		
NCLIV_069530	hypothetical protein	Deleção	TGME49_213460	hypothetical protein		
NCLIV_049380	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_234165	conserved hypothetical protein		
NCLIV_015700	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238420	conserved hypothetical protein		
NCLIV_017920	unspecified product	Missense	TGME49_243120	Toxoplasma gondii family A protein		
NCLIV_046070	hypothetical protein	Missense	None	None		
NCLIV_057440	conserved hypothetical protein	Missense/Deleção	TGME49_314370	hypothetical protein		
NCLIV_015750	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238895	conserved hypothetical protein		
NCLIV_057090	putative zinc finger (C3HC4 type RING finger) protein	Missense/Deleção	None	None		
NCLIV_017951	unspecified product	Missense	TGME49_243160	Toxoplasma gondii family A protein		
NCLIV_057290	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314110	conserved hypothetical protein		

NCLIV_015540	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238170	conserved hypothetical protein
NCLIV_017911	hypothetical protein	Missense	None	None
NCLIV_015670	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238390	conserved hypothetical protein
NCLIV_017940	unspecified product	Missense	TGME49_243140	Toxoplasma gondii family A protein
NCLIV_017970	unspecified product	Missense	TGME49_243180	Toxoplasma gondii family A protein
NCLIV_039580	unspecified product	Missense	None	unspecified product
NCLIV_055700	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_312065	conserved hypothetical protein
NCLIV_015420	hypothetical protein	Missense	TGME49_238020	conserved hypothetical protein
NCLIV_017941	unspecified product	Missense	TGME49_243150	Toxoplasma gondii family A protein
NCLIV_056780	conserved hypothetical protein	Nonsense	TGME49_313495	conserved hypothetical protein
NCLIV_062700	hypothetical protein	Missense	TGME49_245440	hypothetical protein
NCLIV_060290	hypothetical protein	Missense	None	None
NCLIV_015730	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_238870	hypothetical protein
NCLIV_017950	unspecified product	Missense	TGGT1_243150	Toxoplasma gondii family A protein
NCLIV_049320	hypothetical protein	Missense	TGME49_212030	hypothetical protein
NCLIV_057210	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314020	hypothetical protein
NCLIV_057310	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_314220	hypothetical protein
NCLIV_057370	hypothetical protein	Missense	None	None

NCLIV_062670	hypothetical protein	Missense	TGVEG_245428	hypothetical protein
NCLIV_038410	predicted hydrolases or acyltransferases	Missense	TGME49_279380	hypothetical protein
NCLIV_049390	conserved hypothetical protein	Missense	TGME49_234180	hypothetical protein
NCLIV_023390	hypothetical protein	Nonsense	TGME49_281440	hypothetical protein
NCLIV_000260	conserved hypothetical protein	Deleção	None	None
NCLIV_012940	conserved hypothetical protein	Deleção	TGME49_212810	hypothetical protein
NCLIV_042550	conserved hypothetical protein	Deleção	TGME49_290460	hypothetical protein
NCLIV_039620	conserved hypothetical protein	Deleção	TGME49_266300	hypothetical protein
NCLIV_007720	conserved hypothetical protein	Missense	None	None
NCLIV_030220	conserved hypothetical protein	Missense	None	None

BAI, Meng-Jie; WANG, Jin-Lei; ELSHEIKHA, Hany M.; LIANG, Qin-Li; CHEN, Kai; NIE, Lan-Bi; ZHU, Xing-Quan. **Functional Characterization of Dense Granule Proteins in Toxoplasma gondii RH Strain Using CRISPR-Cas9 System** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00300>.

BANDINI, Giulia; HASERICK, John R.; MOTARI, Edwin; OUOLOGUEM, Dinkorma T.; LOURIDO, Sebastian; ROOS, David S.; COSTELLO, Catherine E.; ROBBINS, Phillips W.; SAMUELSON, John. O-fucosylated glycoproteins form assemblies in close proximity to the nuclear pore complexes of Toxoplasma gondii. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 113, n. 41, p. 11567 LP – 11572, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1613653113. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/113/41/11567.abstract>.

BERRY, Laurence et al. Toxoplasma gondii chromosomal passenger complex is essential for the organization of a functional mitotic spindle: a prerequisite for productive endodyogeny. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [S. l.], v. 75, n. 23, p. 4417–4443, 2018. DOI: 10.1007/s00018-018-2889-6.

CAMEJO, Ana; GOLD, Daniel A.; LU, Diana; MCFETRIDGE, Kiva; JULIEN, Lindsay; YANG, Ninghan; JENSEN, Kirk D. C.; SAEIJ, Jeroen P. J. Identification of three novel Toxoplasma gondii rhostry proteins. **International journal for parasitology**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 147–160, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.08.002.

CHERRY, Ahmed Adnan; ANANVORANICH, Sirinart. Characterization of a homolog of DEAD-box RNA helicases in Toxoplasma gondii as a marker of cytoplasmic mRNP stress granules. **Gene**, Netherlands, v. 543, n. 1, p. 34–44, 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.04.011.

DE NAPOLI, M. G.; DE MIGUEL, N.; LEBRUN, M.; MORENO, S. N. J.; ANGEL, S. O.; CORVI, M. M. N-terminal palmitoylation is required for Toxoplasma gondii HSP20 inner membrane complex localization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1833, n. 6, p. 1329–1337, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913000803>.

DENDOUGA, Najoua; CALLEBAUT, Isabelle; TOMAVO, Stanislas. A novel DNA repair enzyme containing RNA recognition, G-patch and specific splicing factor 45-like motifs in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **European journal of biochemistry**, England, v. 269, n. 14, p. 3393–3401, 2002. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02993.x. ENGELBERG, Klemens; CHEN, Chun-Ti; BECHTEL, Tyler; SÁNCHEZ GUZMÁN, Victoria; DROZDA, Allison A.; CHAVAN, Suyog; WEERAPANA, Eranthie; GUBBELS, Marc-Jan. The apical annuli of *Toxoplasma gondii* are composed of coiled-coil and signalling proteins embedded in the inner membrane complex sutures. **Cellular microbiology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. e13112, 2020. DOI: 10.1111/cmi.13112.

ESCOTTE-BINET, Sandie; HUGUENIN, Antoine; AUBERT, Dominique; MARTIN, Anne-Pascaline; KALTENBACH, Matthieu; FLORENT, Isabelle; VILLENA, Isabelle. Metallopeptidases of *Toxoplasma gondii*: in silico identification and gene expression TT - Métallopeptidases de *Toxoplasma gondii*: identification in silico et expression génique. **Parasite (Paris, France)**, [S. l.], v. 25, p. 26, 2018. DOI: 10.1051/parasite/2018025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29737275>.

FARHAT, Dayana C. et al. A MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories and sexual commitment. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 570–583, 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-0674-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0674-4>.

FAVILA, Michelle A.; GERACI, Nicholas S.; JAYAKUMAR, Asha; HICKERSON, Suzanne; MOSTROM, Janet; TURCO, Salvatore J.; BEVERLEY, Stephen M.; MCDOWELL, Mary Ann. Differential Impact of LPG-and PG-Deficient *Leishmania major* Mutants on the Immune Response of Human Dendritic Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e0004238, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004238>.

FENOY, Ignacio M.; BOGADO, Silvina S.; CONTRERAS, Susana M.; GOTTIFREDI, Vanesa; ANGEL, Sergio O. The Knowns Unknowns: Exploring the Homologous Recombination Repair Pathway in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 7, p. 627, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00627. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199954>.

FRÉNAL, Karine; TAY, Chwen L.; MUELLER, Christina; BUSHHELL, Ellen S.; JIA, Yonggen; GRAINDORGE, Arnault; BILLKER, Oliver; RAYNER, Julian C.; SOLDATI-FAVRE, Dominique. Global analysis of apicomplexan protein S-acyl transferases reveals an enzyme essential for invasion. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 895–911, 2013. DOI: 10.1111/tra.12081.

GREBER, Basil J.; TOSO, Daniel B.; FANG, Jie; NOGALES, Eva. The complete structure of the human TFIID core complex. **eLife**, [S. l.], v. 8, 2019. DOI: 10.7554/eLife.44771. GUITON, Pascale S.; SAGAWA, Janelle M.; FRITZ, Heather M.; BOOTHROYD, John C. An in vitro model of intestinal infection reveals a developmentally regulated transcriptome of *Toxoplasma* sporozoites and a NF- κ B-like signature in infected host cells. **PloS one**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. e0173018–e0173018, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0173018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28362800>.

HUYNH, My-Hang; BOULANGER, Martin J.; CARRUTHERS, Vern B. A conserved apicomplexan microneme protein contributes to *Toxoplasma gondii* invasion and virulence. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 82, n. 10, p. 4358–4368, 2014. DOI: 10.1128/IAI.01877-14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25092910>.

KRISHNA, Ritesh et al. A large-scale proteogenomics study of apicomplexan pathogens-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **Proteomics**, [S. l.], v. 15, n. 15, p. 2618–2628, 2015. DOI: 10.1002/pmic.201400553.

MERCIER, Corinne; CESBRON-DELAUW, Marie-France. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? **Trends in parasitology**, England, v. 31, n. 2, p. 60–71, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2014.12.002.

MUÑOZ, Christian; SAN FRANCISCO, Juan; GUTIÉRREZ, Bessy; GONZÁLEZ, Jorge. Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, p. 141526, 2015. DOI: 10.1155/2015/141526. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/141526>.

NADIPURAM, Santhosh M.; KIM, Elliot W.; VASHISHT, Ajay A.; LIN, Andrew H.; BELL, Hannah N.; COPPENS, Isabelle; WOHLSCHEGEL, James A.; BRADLEY, Peter J. In Vivo Biotinylation of the *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Reveals Novel Dense Granule Proteins Important for Parasite Growth and Pathogenesis. **mBio**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2016. DOI: 10.1128/mBio.00808-16.

RICO-SAN ROMÁN, Laura; HORCAJO, Pilar; REGIDOR-CERRILLO, Javier; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, Mercedes; COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther; GUTIÉRREZ-BLÁZQUEZ, Dolores; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, María Luisa; SAEIJ, Jeroen P. J.; ORTEGA-MORA, Luis Miguel. Comparative tachyzoite proteome analyses among six

- Neospora caninum isolates with different virulence. **International journal for parasitology**, England, v. 50, n. 5, p. 377–388, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.02.003.
- SHANMUGASUNDRAM, Achchuthan; GONZALEZ-GALARZA, Faviel F.; WASTLING, Jonathan M.; VASIEVA, Olga; JONES, Andrew R. Library of Apicomplexan Metabolic Pathways: a manually curated database for metabolic pathways of apicomplexan parasites. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 41, n. Database issue, p. D706-13, 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1139.
- TU, Vincent et al. The *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Interactome. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e02699-19, 2020. DOI: 10.1128/mBio.02699-19. Disponível em: <http://mbio.asm.org/content/11/1/e02699-19.abstract>.
- WOO, Yong H. et al. Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. **eLife**, [S. l.], v. 4, p. e06974, 2015. DOI: 10.7554/eLife.06974.
- XUE, Junxin; JIANG, Wei; CHEN, Yongjun; GONG, Fengju; WANG, Minyan; ZENG, Peng; XIA, Can; WANG, Quan; HUANG, Kehe. Thioredoxin reductase from *Toxoplasma gondii*: an essential virulence effector with antioxidant function. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 31, n. 10, p. 4447–4457, 2017. DOI: 10.1096/fj.201700008R.
- YU, ZhengQing et al. Histone deacetylase SIR2 in *Toxoplasma gondii* modulates functions of murine macrophages in vitro and protects mice against acute toxoplasmosis in vivo. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 154, p. 104835, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104835>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021001078>.

ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa de Animais (CBEA)



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



CERTIFICADO

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

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

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

Uberlândia, 24 de novembro de 2016.

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