

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Análise transcriptômica das vias de interferon em macrófagos durante a  
infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***

**Mariana Teresa Coser**

**Uberlândia**  
**2023**

**MARIANA TERESA COSER**

**Análise transcriptômica das vias de interferon em macrófagos durante a infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo.

**Uberlândia**

**2023**

**MARIANA TERESA COSER**

**Análise transcriptômica das vias de interferon em macrófagos durante a  
infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - Orientador**

---

**Profa. Dra. Caroline Martins Mota**

---

**Profa. Dra. Bruna Barbosa de Sousa Simamoto**

**Uberlândia**

**2023**

***“Na vida, não existe nada a  
temer, mas a entender.”***

***- Marie Curie***

## **Agradecimentos...**

Primeiramente agradeço a Deus e ao universo por me proporcionar oportunidades, as quais desfrutei e pude adquirir conhecimentos pra ser quem eu sou hoje e aprendizados que levarei pra minha vida.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, por estarem presentes, apesar da distância, e por acreditarem sempre em mim, me ajudando alcançar todos os meus objetivos. Especialmente agradeço à minha Mãezinha, minha irmã Juliana e minha sobrinha Ana Julia, por estarem presentes na felicidade e na dificuldade, em todos os momentos quando eu mais precisei.

Às minhas amigas, que compartilharam essa jornada comigo, que me trouxeram outras visões de mundo e de certo modo contribuíram para meu crescimento pessoal. À minha melhor amiga Gabriela Ferreira, que durante todos esses anos de amizade sempre esteve ao meu lado nos piores e melhores momentos, me escutando, me apoiando e surtando comigo. Às minhas amigas Maria Thereza e Isabella Moura pelos momentos compartilhados, pelos conselhos e pela disposição em me acolher. E todas as outras pessoas que conheci nessa jornada que carrego um pedacinho de cada um, especialmente Sophia, Sara Lemes, Gabriel, Mallu, Alexia, Zé Eduardo, Viviane, Rafael Rosa, Ruth, Ana Paula.

Ao meu orientador Dr. Tiago Mineo, pela oportunidade de aprendizado, por todo o conhecimento compartilhado e pelo auxílio nos momentos de dúvidas.

Ao meu coorientador do coração, Me. Jhoan David Aguillón Torres (vulgo João Davi) pela amizade nos melhores e piores dias, pela paciência e por toda a ajuda que me foi prestada durante todo o tempo.

Agradeço a todos integrantes do laboratório, pelos auxílios nos experimentos, pelas conversas diárias e calorosas e me tirarem várias risadas. Levarei um pouco de cada um pra minha vida.

Por fim, agradeço à minha psicanalista Bruna Stéfany, por me fazer enxergar o que realmente quero e contribui para meu crescimento pessoal e emocional.

## RESUMO

*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* são parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa e apresentam notável similaridade em suas características biológicas e estruturais. A neosporose tem como principal alvo os bovinos e os cães, e é reconhecida como uma das principais causas de abortos em bovinos e perdas econômicas no setor pecuário e de laticínios. Atualmente não é classificada como uma doença zoonótica. Por outro lado, a toxoplasmose é uma zoonose com distribuição global, sendo que na maioria dos casos é assintomática. No entanto, quando adquirida durante a gestação, pode acarretar consequências graves. Sabe-se que o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) desempenha um papel fundamental na resposta imune contra esses parasitos. Entretanto, existem poucos ou nenhuns dados sobre o papel das vias do interferon tipo I e III no controle dessas infecções. Dessa forma, nosso estudo teve como objetivo comparar, por meio da análise do transcriptoma, a expressão gênica diferencial das vias do interferon tipo I, II e III durante a infecção por *T. gondii* e *N. caninum*. Para isso, realizamos análises de RNASeq em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados com ambos os parasitos, por um período de 6 horas, e comparamos a expressão gênica das vias alvo utilizando valores de TPM (transcritos por milhão). Por meio dessa abordagem, descobrimos que a expressão da maioria dos genes nas vias do interferon foi aumentada durante a infecção por *N. caninum*, em comparação com os genes não perturbados ou regulados negativamente, os quais destacam-se *Tbk1*, *Irf1* and *Tram1*. Observamos um perfil distinto de resposta à infecção por *T. gondii*, com um maior percentual de genes que não apresentaram alterações na expressão. Esse fenótipo foi especialmente notado nas vias do interferon tipo I e III. A análise do mapa de calor de genes individuais, segmentados por vias, corroborou ainda mais essas observações. Esses resultados ressaltam que, apesar das semelhanças filogenéticas entre esses parasitos, existem diferenças marcantes nas interações entre o parasita e o hospedeiro, o que pode explicar suas distintas patogêneses e virulência em camundongos e outros hospedeiros.

**PALAVRAS CHAVES:** Imunidade inata; Apicomplexa; RNAseq; *Neospora caninum*; *Toxoplasma gondii*;

## Sumário

RESUMO.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJETIVOS:.....	10
3.1 OBJETIVO GERAL:.....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
Obtenção e montagem do transcriptoma por sequenciamento de nova geração ..	11
Análises comparativas de expressão gênica .....	12
5. RESULTADOS: .....	13
Distribuição dos genes estudados nas vias de Interferon I, II e III. ....	13
Análise de perturbação das vias de interferon tipo I, II e III mediante a infecção de macrófagos por <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> . ....	15
Comparação da expressão gênica das vias de Interferon durante as infecções pelos protozoários filogeneticamente relacionados <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> .....	20
6. DISCUSSÃO: .....	27
7. CONCLUSÃO:.....	30
8. REFERÊNCIAS:.....	31

## 1. INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um parasito coccídeo identificado como causador da neosporose, doença que resulta em disfunção neurológica em animais recém-nascidos e abortos em ruminantes no cenário mundial (WANG *et al.*, 2021). Não há vacinas comercialmente disponíveis para prevenção desse patógeno, as medidas de controle são baseadas no manejo e diagnóstico do rebanho (ZHAO *et al.*, 2022). O ciclo biológico desse parasita é heteróximo, no qual os canídeos são descritos como seus hospedeiros definitivos, enquanto uma gama de outros animais são hospedeiros intermediários (por exemplo, bovinos, ovinos, equinos) (DONAHOE *et al.*, 2015). A transmissão desse parasita, pode ocorrer de forma horizontal, vertical ou transplacentário. A forma horizontal está relacionada com a ingestão de oocistos esporulados através da alimentação. A infecção vertical ocorre pela via transplacentária, que por sua vez se divide em endógena (animais persistentemente infectados) ou exógenas (animais infectados primários) e desempenha papel importante na manutenção do parasita no rebanho (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017; SONG *et al.*, 2022).

*Toxoplasma gondii* é um parasita filogeneticamente relacionado ao *N. caninum*, que possui a capacidade de afetar uma ampla variedade de animais, incluindo mamíferos, aves e seres humanos (DONAHOE *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2020). Em relação às suas características, esses parasitos demonstram uma notável similaridade em todos os estágios de seu desenvolvimento, incluindo taquizoítos, bradizoítos e oocistos. Além de que, não apenas compartilham características fenotípicas semelhantes, mas também apresentam várias semelhanças em relação aos aspectos de infecção e patogênese (FEREIG, OMAR e ALSAYEQH, 2022). Entretanto, estudos apontam que *T. gondii* demonstra uma virulência maior em relação às células hospedeiras e é amplamente considerado mais patogênico quando comparado a *N. caninum* (AL-BAJALAN *et al.*, 2017). A toxoplasmose, a infecção causada por esse parasita, pode ocorrer de maneira congênita ou adquirida. No caso da transmissão da infecção adquirida, esta ocorre principalmente através da ingestão de oocistos presentes no ambiente ou do consumo de carne mal cozida que contenha cistos teciduais infectados. Já a transmissão congênita ocorre quando há a infecção primária durante a gestação (ALMERIA e DUBEY, 2021; MARUGAN-HERNANDEZ *et al.*, 2017).

A localização intracelular de *N. caninum* promove resposta imune adaptativa do tipo Th1 (linfócitos T helper 1) robusta e clássica e é considerada primordial para a resistência do hospedeiro pois, promove a liberação de IL-12, TNF e IFN- $\gamma$ . Inicialmente, as células inatas expressam os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) do tipo *Toll like receptors (TLRs)* que reconhecem o parasita através dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e leva à uma sinalização intracelular por meio de moléculas adaptadoras, principalmente fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88). A sinalização leva à ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e fatores de transcrição como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), consequentemente leva à transcrição de mediadores pró-inflamatórios clássicos, que irão promover a produção de fatores como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos e células NK. Por outro lado, a via dependente de TLR3-TRIF, ao reconhecer o material genético do parasito, ativa fatores reguladores de interferon 3 (IRF3), resultando na produção de interferon tipo I (IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$ ), que também pode potencializar a produção de fatores pró-inflamatórios e ativam a fosforilação de AKT e ERK, que por sua vez, induzem a produção de IL-12p40 (MINEO *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021). Do mesmo modo, as citonas de IFN II são crucial na resposta imune contra *T. gondii*. De outra forma, esse parasito, ao contrário de *N. caninum*, suprime a produção de IFN I (BEITING *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2019)

Os interferons (IFNs) apresentam estrutura  $\alpha$ -helicoidal, que podem ser classificados em três categorias principais: IFN do tipo I (IFN-I, principalmente representadas por IFN- $\alpha$  e - $\beta$ ), IFN do tipo II (IFN-II, representado por IFN- $\gamma$ ) e IFN do tipo III (IFN-III, principalmente representadas por IFN- $\lambda$ ). Essa classificação é baseada na homologia de sequência, que reflete a relação evolutiva, o uso de receptores e a atividade funcional dessas citocinas. Durante esse processo, os IFNs estabelecem interações com os receptores localizados na superfície celular e sua sinalização canônica ocorre por meio da ativação da via JAK/STAT. Como resultado, ocorre a regulação da transcrição de centenas de genes regulados por interferons (ISG, Interferon stimulated genes) (SCHNEIDER *et al.*, 2014; PHILLIPS *et al.*, 2022).

IFN-I constituem a maior classe de IFNs. Em humanos, essa classe abrange os IFNs- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  e IFN- $\omega$ . Quase todas as células são capazes de produzir IFN- $\alpha/\beta$ . No entanto, durante o curso de uma infecção, células especializadas

do sistema imune, conhecidas como células dendríticas plasmocitoides, são os maiores responsáveis pela produção do IFN- $\alpha$ . Os diferentes subtipos de IFN-I exibem expressão tecidual diferenciada e afinidades de ligação ao complexo receptor IFNAR1/2. Consequentemente, esses subtipos distintos resultam em diversas atividades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras. Em relação aos IFN-II, sua produção é amplamente restrita aos linfócitos T e células NK e pode levar à geração de uma resposta imune polarizada composta por Th1, T CD4+ T CD8+. Essa via de IFNs desempenha um papel fundamental na regulação da função imunológica e serve como uma ponte entre as respostas imunes inata e adaptativa. Por fim, a via dos IFN-III são representados por IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3, ou IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente, que estão intimamente relacionadas às respostas virais. A sinalização desse complexo receptor é semelhante ao complexo receptor do IFN do tipo I e induz a expressão de muitos dos mesmos ISG (GRIFFITHS *et. al.*, 2015; LAZEAR, SCHOGGINS E DIAMOND, 2019; MARTIN-HIJANO E SAINZ, 2020).

## **2. JUSTIFICATIVA**

O presente projeto proporcionará um melhor entendimento da resposta imune inata envolvida nas infecções por *N. caninum* e *T. gondii*, principalmente no que se está relacionado à produção e indução das vias de Interferon. Até então, sabe-se que o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) desempenha um papel fundamental na resposta imune contra esses parasitos, porém existem poucos ou nenhuns dados sobre o papel das vias do interferon tipo I e III no controle dessas infecções. Deste modo, com a melhor compreensão obtida por parte da análise da resposta imune contra *N. caninum* e *T. gondii*, será possível o desenvolvimento de métodos preventivos e terapêuticos contra esses parasitos.

## **3. OBJETIVOS:**

### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Identificar expressão gênica diferencial nas vias de Interferons durante as infecções de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) por *N. caninum* e *T. gondii*.

## 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1 Identificar e compilar os genes que estão presentes nas vias de interferon I,II e III;

3.2.2. Categorizar os genes e classificá-los como indutores de Interferon ou induzidos por Interferon;

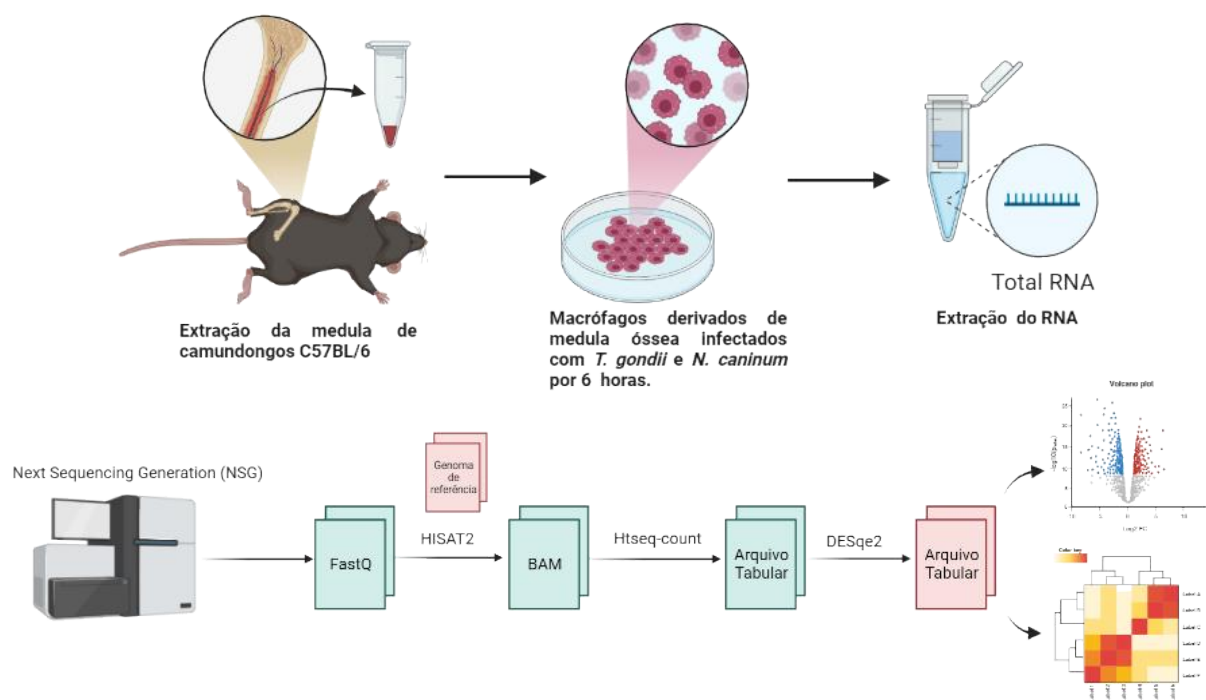
3.2.3. Comparar, através do Transcriptoma, a expressão dos genes das vias de IFN de BMDMs infectados com *N. caninum* e *T. gondii*, com análises quantitativas e qualitativas;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e montagem do transcriptoma por sequenciamento de nova geração

As sequências em formato FastaQ foram obtidas através da parceria internacional a Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Massachusetts Institute of Technology (MIT), financiado pelo CNPq, por meio do laboratório do Dr. Jeroen Saeij, hoje na Universidade da Califórnia, Davis (UCDAVIS).

Para a obtenção do RNA-Seq, BMDMs de camundongos C57BL/6 WT foram infectados com *N. caninum* (isolado Liverpool) e *T. gondii* (cepa RH) por 6 horas, com MOI (multiplicidade de infecção) igual a 3 (3 parasitos para cada célula), e as células infectadas foram coletadas para a extração do respectivo mRNA. O mRNA foi analisado por sequenciamento de nova geração (Illumina) por leituras de fragmentos de 150 pares de base, posteriormente convertidos em formato “fastq”, e foram processados pela plataforma online Galaxy (<https://galaxyproject.org/>) usando o genoma GCRm38 de *Mus musculus* como referência. Utilizando as ferramentas do Galaxy, foi verificada a qualidade das sequências através do “FastQC”, junto da opção “Trimmomatic” e “HISAT2” que alinha as sequências de acordo com o genoma de referência. Em seguida, a opção “HTSeq” determina os níveis de expressão de cada gene e transcrito, e determina uma leitura para cada condição. Por fim, a ferramenta DESq2 reúne os transcriptomas e quantifica a expressão diferencial gênica (*fold Change*) e o *P-value*. **(Fig. 1)**



**Figura 1:** Representação esquemática do processo de obtenção dos valores de fold change e p-value.

A expressão gênica foi representada em valores de TPM (Transcripts Per Million), levando em consideração as contagens de leituras mapeadas para cada gene ou transcrição. Foram selecionadas as opções apropriadas para o cálculo dos valores de TPM, como a normalização por tamanho de biblioteca ou fatores de escala.

## Análises comparativas de expressão gênica

Para as análises comparativas, foi realizado uma identificação e classificação dos genes participante das vias de interferon do tipo I, II e III. A compilação desses genes foram baseadas nos dados obtidos pelas plataformas “Kegg” ([www.kegg.jp](http://www.kegg.jp)) e “Pubmed” ([www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)).

O Diagrama de Venn foi criado utilizando a plataforma ([bioinfogp.cnb.csic.es](http://bioinfogp.cnb.csic.es)) por meio da ferramenta Venny 2.1. Esse diagrama foi gerado a partir da compilação dos genes que participam das vias de interferon, sendo que esses genes foram rotulados de acordo com a via específica em que atuam. Através do diagrama, é possível identificar os genes que são coexistentes em todas as vias, bem como aqueles que atuam exclusivamente em uma das vias.

Os gráficos de Vulcão (Volcano plots) foram criados utilizando o software *GraphPad Prism 9.0*. Os dados utilizados para sua construção foram os valores em

$\log_2$  de *foldchange*, no eixo X, e os valores  $-\log_{10}$  de P-value, no eixo Y. Na escala de cor adotada, os genes transcritos, representados por pontos no gráfico, foram considerados diferencialmente expressos quando o valor absoluto do *foldchange* foi superior a 0,5 (perturbação positiva) ou inferior a -0,5 (perturbação negativa) em relação aos BMDMs não infectados. Os genes perturbados positivamente foram representados na cor vermelha, enquanto os genes perturbados negativamente foram representados na cor azul. Os genes que não apresentaram expressão diferencial, ou seja, valores próximos a 0, foram designados como não perturbados e receberam a cor cinza nos gráficos.

Os gráficos de calor (*heat maps*) foram gerados utilizando a plataforma "SRplot" (disponível em: [www.bioinformatics.com.cn/](http://www.bioinformatics.com.cn/)), utilizando os valores de TPM de BMDMs não infectados e infectados por cada um dos dois protozoários. Durante a geração dos mapas de calor, os dados foram submetidos a um processo de clusterização automática pelo algoritmo da plataforma, no qual os genes com perfis de expressão semelhantes foram agrupados e comparados entre si, a fim de identificar padrões e relações entre eles.

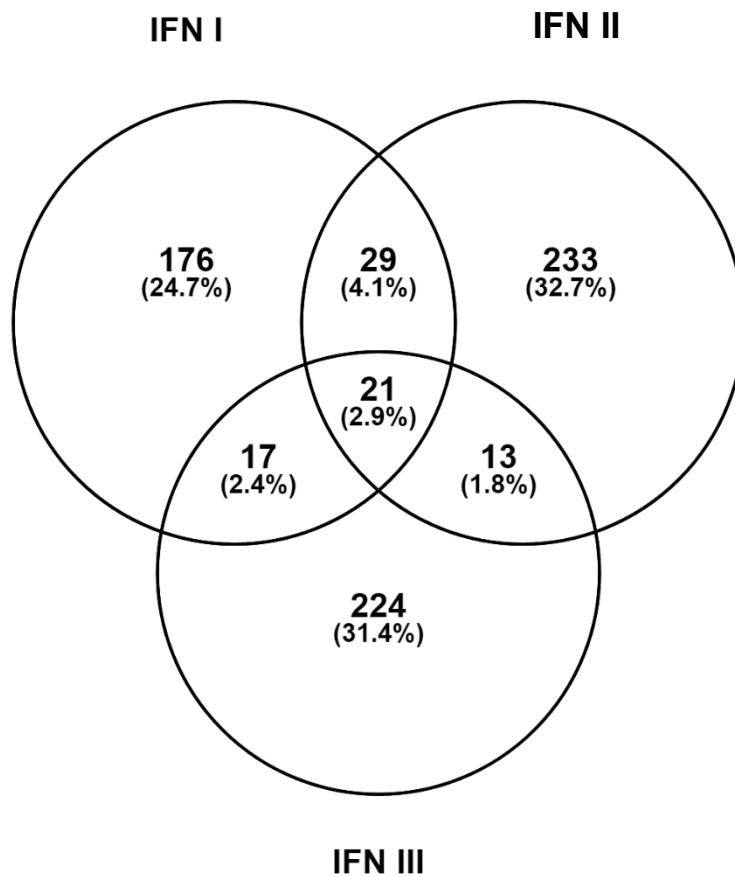
A fim de calcular a diferença de expressão gênica entre as infecções, foi realizado o teste t para proporções. Esse teste tem como objetivo calcular a proporção entre dois grupos. Já o valor-p indica a probabilidade de se observar uma diferença significativamente maior do que a que foi observada sob a hipótese nula ( $H_0$ ), determinado através do seu valor de proporcionalidade. O cálculo de proporcionalidade foi realizado utilizando a plataforma "[www.statskingdom.com](http://www.statskingdom.com)", utilizando o nível de significância igual a 0,5.

## 5. RESULTADOS:

### **Distribuição dos genes estudados nas vias de Interferon I, II e III.**

Analisando o total de genes contidos nas 3 vias de interferon, foi gerado um Diagrama de Venn (Figura 2), com a intenção de se visualizar a presença de genes compartilhados nestas vias. Identificou-se que um total de 21 genes (Tabela 1) comuns para as 3 vias em estudo, dentre esses destacam-se *Stat1*, *Stat2*, *Stat3*, *Jak1* e *Socs3*. Observou-se também que outros 17 genes são compartilhados pelas vias de IFN I e IFN III, enquanto 29 genes são comuns às vias de IFN I e II, e, por fim, 13 genes são compartilhados pelas vias de IFN II e III. Em suma, o diagrama de Venn

evidência que a maioria dos genes apresenta exclusividade para cada via analisada, com um total de 176, 233 e 224 genes exclusivos para as vias de IFN I, II e III, respectivamente.



**Figura 2:** Diagrama de Venn representando a quantidade e a proporção de genes que são compartilhados ou exclusivos entre os três grupos de interferons. A diferença nos valores refere-se às diferentes formas de representação o mesmo gene, o cálculo foi feito com base no ID do gene.

**Tabela 1:** Lista de genes em comum nas vias de IFN.

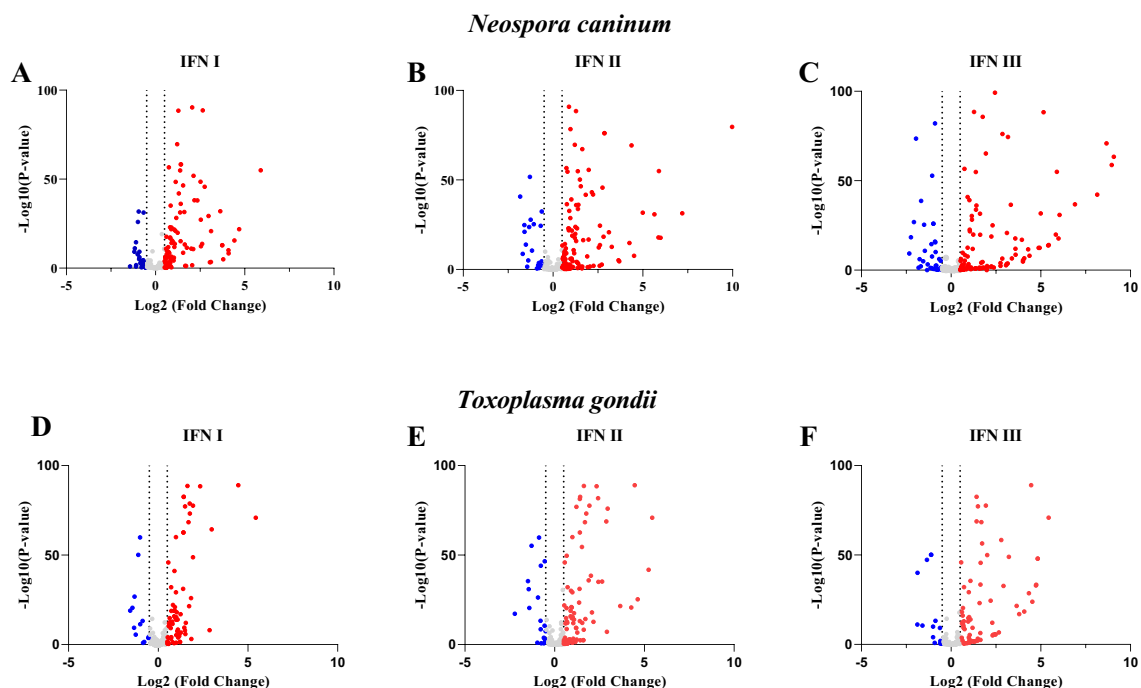
<b>ID</b>	<b>Gene</b>
ENSMUSG00000024349	Sting1
ENSMUSG00000027164	Traf6
ENSMUSG00000028163	Nfkb1
ENSMUSG00000025498	Irf7
ENSMUSG00000018899	Irf1
ENSMUSG00000053113	Socs3
ENSMUSG00000038037	Socs1
ENSMUSG00000000386	Mx1
ENSMUSG00000034459	Ifit1
ENSMUSG00000045932	Ifit2
ENSMUSG00000035692	Isg15
ENSMUSG00000029417	Cxcl9
ENSMUSG00000004040	Stat3
ENSMUSG00000010358	Ifi35
ENSMUSG00000040033	Stat2
ENSMUSG00000026896	Ifih1
ENSMUSG00000025746	Il6
ENSMUSG00000017830	Dhx58
ENSMUSG00000028037	Ifi44
ENSMUSG00000064215	Ifi27
ENSMUSG00000028530	Jak1

### **Análise de perturbação das vias de interferon tipo I, II e III mediante a infecção de macrófagos por *N. caninum* e *T. gondii*.**

Dos 252 genes relacionados a via de IFN I, constatamos que mediante a infecção por *N. caninum* 109 genes sofreram perturbação positiva, ou seja, aumentaram sua expressão, enquanto 29 genes exibiram perturbação negativa, 97 genes não demonstraram alteração nos níveis de expressão e a expressão de 17 genes não foi detectada. Dentre os genes que sofreram perturbação positiva nesta via, destacam-se *Viperin*, *Socs3* e *Ifitm1*, já os que sofreram maior regulação negativa, pode-se destacar os genes *Susd3*, *Rpl21*, *Tlr4* que são induzidos mediante a sensibilização do receptor por IFN I (Fig. 3-A). Para a via de interferon do tipo II, dos 298 genes identificados, 133 foram regulados positivamente após 6 horas da infecção de macrófagos por *N. caninum*, 42 não foram expressos, 25 foram perturbados negativamente e 97 não apresentaram modificação no perfil de expressão. Entre os genes com maior expressão mediante a infecção, destacam-se *Srsf1*, *Cxcl10* e *Stc1*

e de menor expressão *Stard8*, *Map2k7*, *Sla*. (Fig. 3-B). Por fim, para a via de interferon do tipo III, analisamos 279 genes dos quais 119 foram regulados positivamente, 39 foram perturbados negativamente, 79 não sofreram alteração de expressão e não se detectou a expressão de 43 genes relacionados a via. Entre os genes mais expressos, destacam-se *Serpinb2*, *Mme* e *Ackr3* e os genes menos expressos *Clec4d*, *CCL3* e *Ticam2* (Fig. 3-C).

Foi realizado o mesmo processo para a infecção com *T. gondii*, onde para a via de IFN I detectamos que do total de genes, 19 genes não foram expressos, 13 genes foram perturbados negativamente, 138 genes não apresentaram diferença de expressão, e 79 genes sofreram perturbação positiva. Dentre os genes que apresentaram maior perturbação positiva, destaca-se *Socs3*, *Gpb5* e *Ifi205*. Já os que apresentaram maior regulação negativa *Idh1*, *Tlr7*, *Susd3* (Fig. 3-D). Para a via de interferon do tipo II, do total de genes identificados, 48 não foram expressos durante a infecção, 19 apresentaram perturbação negativamente, 133 não foram perturbados e 96 sofreram perturbação positiva. Os genes que apresentaram maior perturbação positiva foram *Cish*, *Socs3*, *Pdcd1lg2*. E os genes que se destacam em relação à perturbação negativa são: *Card11*, *Cxcr4* e *Stard8* (Fig. 3-E). Por último, para o total de genes captados para a via de interferon do tipo III, 47 genes não apresentaram expressão, 15 apresentaram perturbação negativa, dos quais podem-se destacar *Arap3*, *Rab7b*, *E2f2*. Enquanto, 130 genes não apresentaram perturbação e 87 genes sofreram perturbação positiva, dentro os quais estão *Ccl2*, *Ccl22*, *Il1rn* (Fig. 3-F).

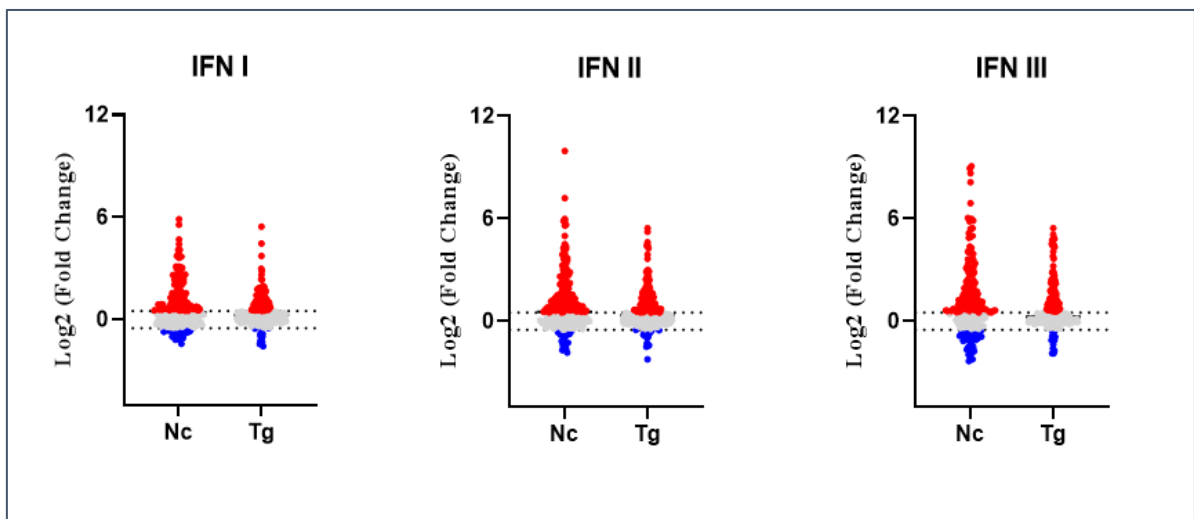


**Figura 3:** Gráficos de Vulcão representando a variação de expressão (*fold change*) de todos os genes catalogados nas vias de interferon tipo I (A e D), II (B e E) e III (C e F), sendo cada gene representado por pontos classificados com base nos valores de corte (*Cutoff*, linhas verticais pontilhadas), em que os genes com valores inferiores a -0,5 são categorizados como perturbados negativamente e exibidos na cor azul, os genes com valores superiores a 0,5 são classificados como perturbados positivamente e apresentados na cor vermelha, enquanto os genes com valores entre esses limites são considerados não perturbados e exibidos na cor cinza. O eixo X representa o valor de variação de expressão (Fold change), enquanto o eixo Y representa os valores de significância estatística desta variação de expressão (P ajustado).

Em conjunto, foi feita a análise estatística para constatar observação das diferenças quantitativas de perturbação gênica durante as infecções. As proporções de perturbação foram calculadas com base nos valores totais de genes nas respectivas vias de Interferon (IFN) e no número de genes que apresentaram alterações tanto na regulação positiva quanto na negativa, em cada infecção individualmente. Em todas as análises realizadas, foram identificadas diferenças quantitativas significativas entre as vias, com exceção da via IFN II, que está associada apenas à perturbação negativa e não apresentou diferença em relação ao número total de genes. (Tabela 2)

Para avaliar as diferenças quantitativas estatísticas na expressão gênica das infecções, foi realizado o teste t de proporção. A hipótese nula (H0) previa que não

haveria diferenças significativas entre os valores das amostras, ou seja,  $p\text{-valor} > \alpha$ , enquanto a hipótese alternativa ( $H_1$ ) sugeria que os valores de  $p\text{-valor}$  seriam menores que  $\alpha$ . Ao analisar as três vias de interferon, verificou-se que os valores de  $p\text{-valor}$  foram inferiores a  $\alpha$ , o que levou à rejeição de  $H_0$  em todas as vias analisadas. Em outras palavras, a diferença observada nas proporções para ambos parasitos nas amostras é estatisticamente significativa, indicando uma diferença expressiva na expressão gênica entre as infecções. (Tabela 3)



**Figura 4:** Os gráficos retratam as proporções de genes para cada infecção, sendo que cada ponto corresponde a um gene. Os genes são classificados em três categorias: perturbados positivamente (representados pela cor vermelha), perturbados negativamente (representados pela cor azul) e não perturbados (representados pela cor cinza). No eixo X estão representados os parasitos *Neospora caninum* (Nc) e *Toxoplasma gondii* (Tg), enquanto no eixo Y estão os valores de *Foldchange*.

**Tabela 2:** os valores relacionados às proporções gênicas. A primeira parte mostra a proporção de todos os genes alterados, os quais foram calculados a partir do valor total de genes alterados em relação ao número total de genes. A segunda parte da tabela, mostra a proporção apenas dos genes perturbados positivamente em relação ao número de genes total. A terceira parte se refere a proporção de genes perturbados negativamente em relação ao número de genes totais.

**Proporção de todos genes alterados**

<b>Via</b>	<b><i>T. gondii</i></b>	<b><i>N. caninum</i></b>	<b><i>p- value</i></b>
IFN I	0.365079365	0.5476	0.000039006
IFN II	0.38590604	0.530201342	0.000407529
IFN III	0.365591398	0.566308244	0.000002010

**Proporção dos genes perturbados positivamente**

<b>Via</b>	<b><i>T. gondii</i></b>	<b><i>N. caninum</i></b>	<b><i>p- value</i></b>
IFN I	0.313492063	0.432539683	0.00572357
IFN II	0.322147651	0.446308725	0.00183427
IFN III	0.311827957	0.426523297	0.00499855

**Proporção dos genes perturbados negativamente**

<b>Via</b>	<b><i>T. gondii</i></b>	<b><i>N. caninum</i></b>	<b><i>p- value</i></b>
IFN I	0.051587302	0.115079365	0.0099192
IFN II	0.063758389	0.083892617	0.347272
IFN III	0.053763441	0.139784946	0.000589285

**Tabela 3:** A proporção de genes alterados em relação ao número total de genes, nas infecções por *N. caninum* e *T. gondii* nas vias de interferon.

Via	Tg	Nc
IFN I	37%	55%
IFN II	39%	53%
IFN III	37%	57%

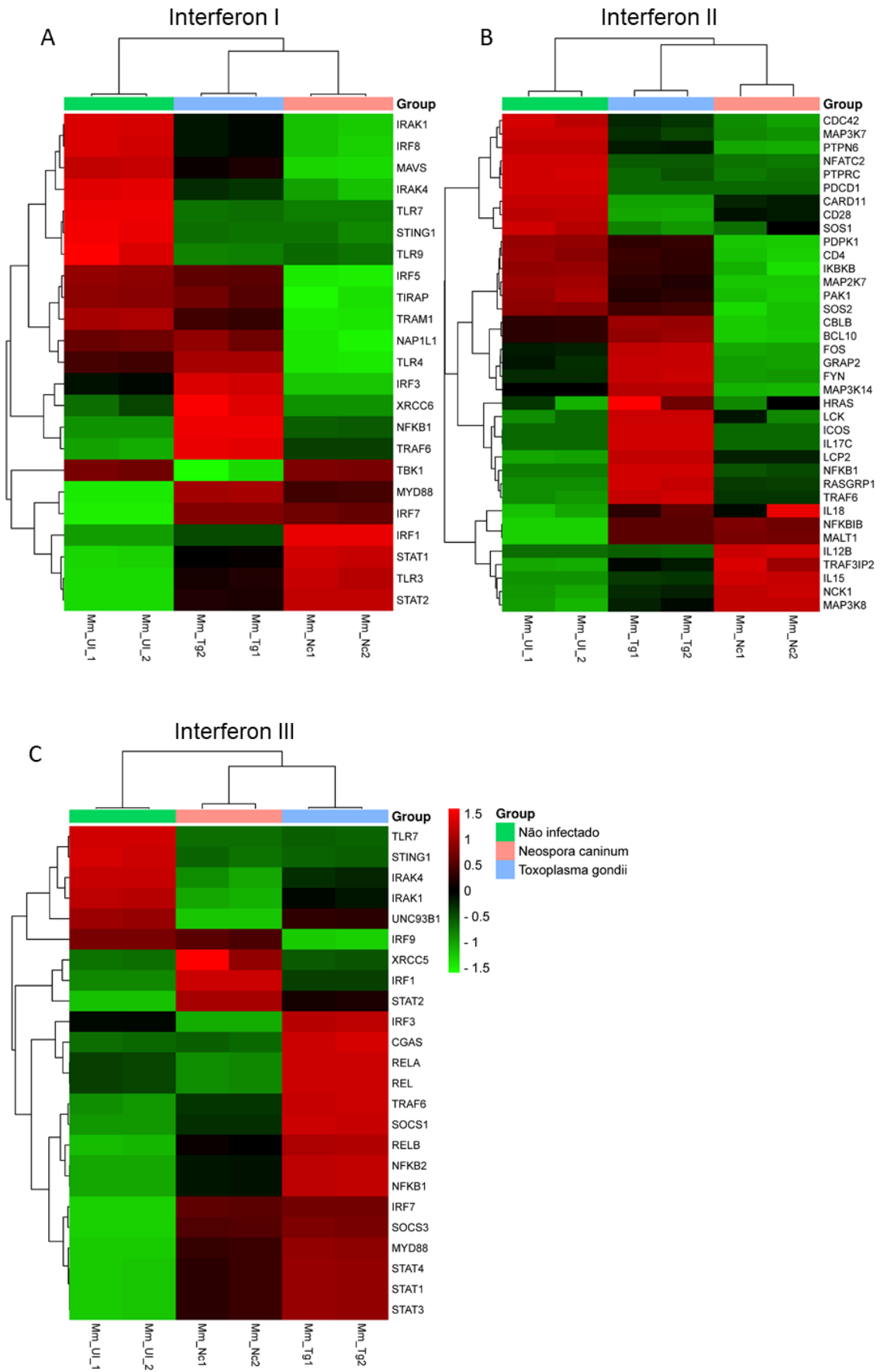
### **Comparação da expressão gênica das vias de Interferon durante as infecções pelos protozoários filogeneticamente relacionados *N. caninum* e *T. gondii***

Mediante análise de mapas de calor das vias selecionadas, observamos diferenças relevantes na expressão dos genes envolvidos na via de indução das citocinas dos grupos de Interferons em macrófagos murinos infectados por *T. gondii* ou *N. caninum*.

Quando comparamos a expressão de genes que participam da via de indução das citocinas de IFN tipo 1, há uma clara distinção entre os padrões de expressão gênica induzidos pelos diferentes parasitos. Enquanto *N. caninum* induz um aumento de expressão significativo dos genes *Tlr3*, *Irf1*, *Stat1* e *Stat2* nos macrófagos infectados por 6 horas comparados aos controles não infectados, a infecção destas células por *T. gondii* induz outro set de genes presentes na via de indução das citocinas pertencentes ao grupo IFN tipo I, representados por *Tlr4*, *Irf3*, *Xrcc6*, *Nfkb1* e *Traf6* (Fig 5-A). Na figura 5-B, estão os genes relacionados à via de indução de citocinas de IFN tipo II. É possível identificar através da análise do mapa, diversas diferenças significativas nas expressões dos genes entre as infecções. O parasito *N. caninum* apresentou um aumento significativo em um bloco de genes comparados às outras condições, dentre esses estão *Il-18*, *Nfkb1b*, *IL-12b*, *Nck1*. Enquanto podemos observar para *T. gondii* um aumento de expressão para os genes *Cblb*, *Fos*, *Grap2*, *Fyn*, *Il-17c*, *Lcpz*. Por fim, a Figura 5-C, é possível observar um bloco maior

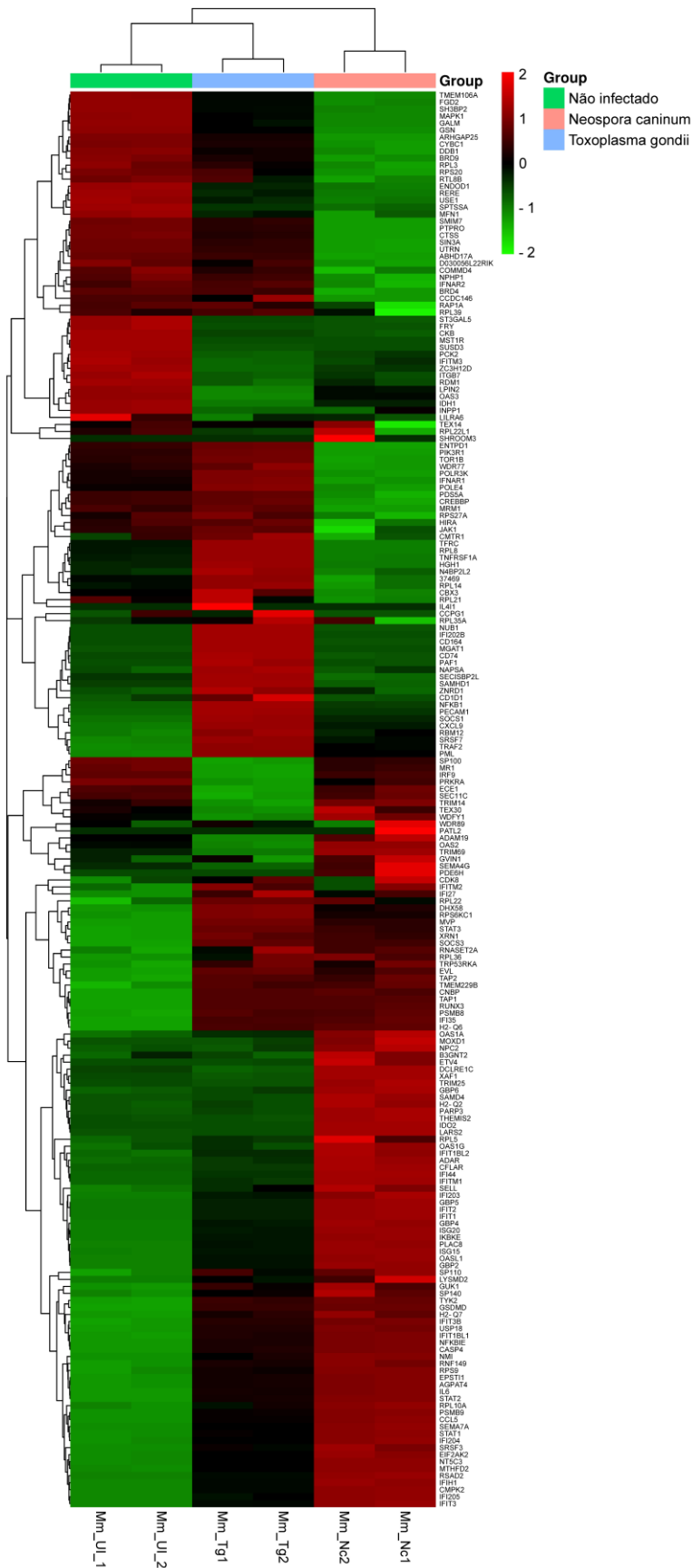
evidenciando um aumento de expressão significativo para a infecção por *T. gondii*. Dentre desse set de genes podemos observar *Irf3*, *cGas*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *RelA*, *Rel*, *Traf6*, *Socs3*, *MyD88*, *Stat4*, *Stat1*, *RelB*. Já para a infecção por *N. caninum*, o bloco contendo os genes que aumentaram sua expressão em relação às outras condições foi menor, contendo os genes *Xrcc5*, *Irf1* e *Stat2*.

Nas análises contendo os genes que são induzidos pelas citocinas de interferon (Figura 6), também observam-se diferenças gênicas significativas entre as infecções. Para IFN tipo I (fig. 6-A), um agrupamento de genes apresentou expressão aumentada na infecção por *T. gondii*, diferindo das outras condições, o que engloba os genes *Nub*, *Ifi202b*, *Cd164*, *Mgat1*, *Cd74*, *Paf1*, *Napsa*, *Znrd1*, *Nfkb1*. Já para *N. caninum*, o bloco que apresentou diferenças de expressão aumentada, contém os genes *Oas1a*, *Moxd1*, *Npc2*, *B3gnt2*, *Etv4*, *Dclre1c*, *Xaf1*, *Trim25*, *Gbp6*, *Samd4*, *Ido2*. Na análise envolvendo a expressão de genes estimulada por IFN II (Fig. 6-B), obteve-se dois blocos principais apresentando diferenças entre as infecções. Para *T. gondii* o bloco com expressão aumentada contém *Mad2l2*, *Mfsd14b*, *Sla*, *Scfd2*, *Gm2a*, *Mras*, *Ly6e*, *Pelp1*, *Cmtr1*, *Ifngr2*, *Irf2*, *Klhl10*, *Tmbim1*, *Acsl5*, *Atad1*, *Pmaip1*, *Ciita*, *Ccl2*, *Nub1*, enquanto para o parasito *N. caninum* apresentou outro set de genes incluindo *Tmtc1*, *Nxph3*, *Prox1*, *Plscr1*, *Ikzf4*, *C1qtnf1*, *Gng11*, *Fhl1*, *Masp1*, *C1ra*, *Exoc3l4*, *Irak2*, *Pstpip2*, *Parp12*, *Cd38*, *Ifit2*, *Ifit1*, *Adar*, *Il15*, *Irf1*, *Clic5*. Por fim, para a via de IFN tipo III (Fig. 6-C), os blocos que obtiveram maior diferencial de expressão para *T. gondii* estão os genes *Diras2*, *Lta*, *Jph4*, *Tlr5*, *Tlr4*, *Lrmp*, *Chst3*, *Sbk1*, *Abcg2*, *Tmcc2*, *Ddx5*, *Evi2a*, *Dhx9*, *Ltb*, *Lrrc1*, *Enkd1*, *C4b*, *Cd300lb*, *Ifnar1*, *Fhad1*, *Lsr*, *Ccl24*, *Osm*, *Clec10a*, *Ccl22*. Já o bloco destacado na infecção por *N. caninum* destacam-se os genes *Adam19*, *Lbp*, *Srgap1*, *Pdk4*, *Slit2*, *Arsi*, *Dbn1*, *Cxcl12*, *Fhl1*, *P1tprm3*, *Mme*, *Fstl1*, *Serpib2*, *Ackr3*, *Serpine1*, *Ddx24*, *Tnf*, *Ebf4*, *Il27*, *Shb*.



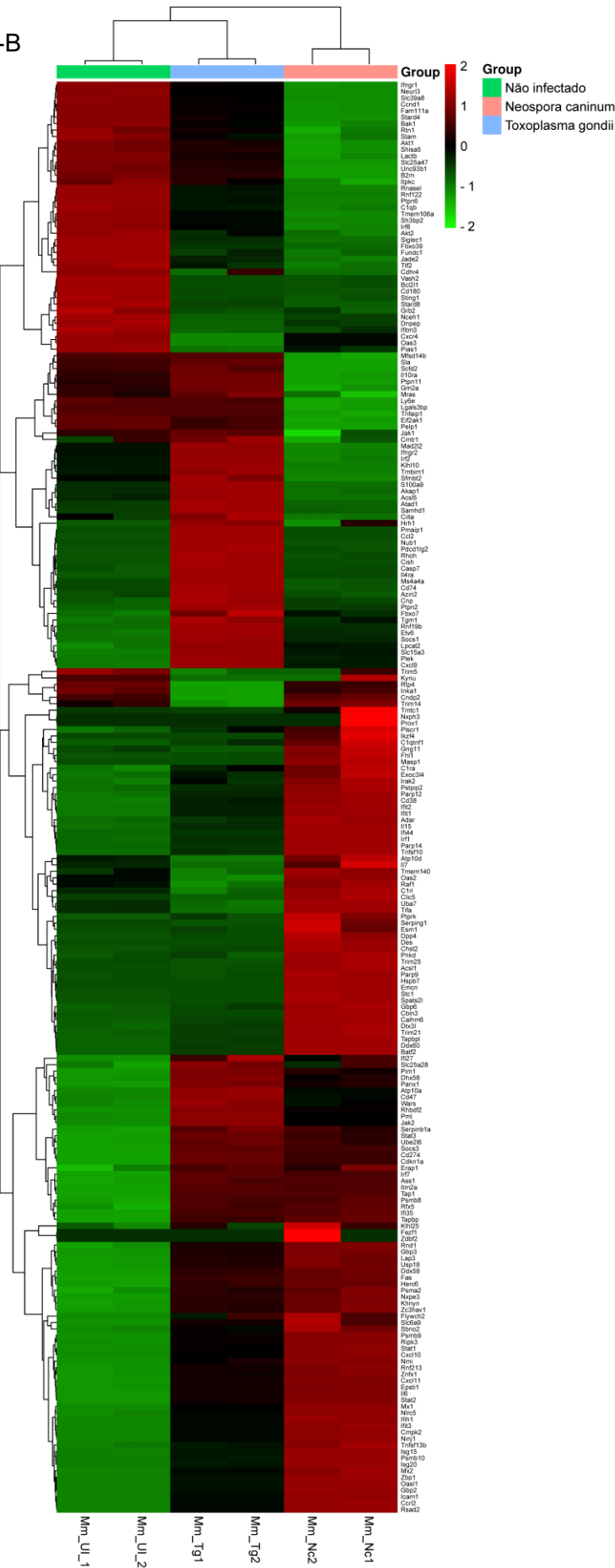
**Figura 5:** Os mapas de calor foram gerados utilizando os valores de TPM (transcripts per million) para representar o z-score da expressão dos genes relacionados à via de indução do interferon. Os mapas de calor foram construídos para três condições: macrófagos murinos não infectados, infecção por *Neospora caninum* e infecção por *Toxoplasma gondii*. A Figura 3A representa os genes da via de interferon tipo I, a Figura 3B representa os genes da via de interferon tipo II, e a Figura 3C representa os genes da via de interferon tipo III.

Fig. 6-A



**Figura 6:** Os mapas de calor foram gerados utilizando os valores de TPM (transcripts per million) para representar o z-score da expressão dos genes induzidos pelas citocinas de Interferon. As colunas estão representadas na seguinte ordem e em replicatas: expressão dos macrófagos murinos não infectados, expressão na infecção por *T. gondii* e expressão na infecção por *N. caninum*. A- Interferon Tipo I; B- Interferon tipo II; C- Interferon Tipo III;

Fig. 6-B





## 6. DISCUSSÃO:

*N. caninum* e *T. gondii* são protozoários filogeneticamente ligados, apresentando diversas características estruturais e biológicas similares (FEREIG *et. al.*, 2022). As infecções por *N. caninum* causam consideráveis perdas econômicas para as indústrias de laticínios e bovinos, devido a abortos e mortalidade neonatal ocasionados pelo parasita. Até o presente momento, tem-se conhecimento de que as citocinas pertencentes à família do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) são tradicionalmente associadas à infecção por tais protozoários (SOKOL-BORRELLI, COOMBS e BOYLE *et. al.*, 2020). Apesar das analogias existentes entre os parasitos, constata-se que o *T. gondii* é substancialmente mais virulento quando comparado ao *N. caninum* (AL-BAJALAN *et. al.*, 2017). Com a finalidade de se compreender as disparidades iniciais da resposta de macrófagos entre as infecções por *N. caninum* e *T. gondii*, foram examinadas as diferenças de expressão de genes das três vias conhecidas de IFNs. No geral, notamos que apesar da semelhança entre esses parasitos, as análises indicaram haver diferenças significativas na expressão de genes das vias de Interferon, o que pode ressaltar em suas particularidades de virulência.

Os receptores de interferon transduzem o sinal por meio do transdutor de sinal *Jak* e ativam a sinalização via *Stat*. Embora os interferons possuam receptores distintos, sua ativação resulta principalmente na indução do mesmo conjunto de ISGs (STARK e DARNELL JE *et. al.*, 2012). Sabe-se também que diversos promotores de ISGs exigem uma sequência específica, conhecido como elemento da resposta estimulado por interferon, nesse caso ocorre o reconhecimento pelo complexo *Isgf3*, ativado apenas por IFN tipo I. (BOLKO *et. al.*, 2021) Com base nisso, apesar da grande similaridade na ativação e nas respostas das vias de interferon, elas apresentam características individuais, ou seja, a maioria dos genes presentes é exclusivo de cada via. Isso por sua vez pode contribuir para o aumento da produção da resposta imune, bem como abranger particularidades promovendo o aumento dessas respostas

Vários estudos anteriores demonstraram que há uma notável similaridade entre os parasitos *N. caninum* e *T. gondii*, sendo que eles são ontologicamente sintênicos e compartilham mais de 90% do genoma (BEITING *et. al.*, 2014). No entanto, estudos referentes a esses Apicomplexa revelaram a existência de estruturas genômicas

nucleares, principalmente relacionado ao genoma mitocondrial, que ainda são poucos estudadas, a qual têm o potencial de conter variedades de respostas entre cepas da mesma espécie. Dentro disso, a investigação dos mecanismos dessa variabilidade possui o poder de fornecer perspectivas sobre os fundamentos moleculares das características relacionadas à virulência (BERNA *et. al.*, 2021) Em nossos achados, observamos que, ao analisar as vias de interferon durante a infecção pelos parasitos, foram identificadas diferenças nos valores de expressão. Ao analisar essas diferenças, fica evidente que existem disparidades significativas na expressão gênica inicial induzida pelos dois protozoários. Este fato sugere que, apesar das semelhanças substanciais entre os parasitos estudados, as respostas induzidas possuem variações notáveis, sendo que estas podem caracterizar o padrão de virulência induzida por cada um deles.

Sobre as diferenças de virulência entre os parasitos, sabe-se que eles possuem várias estratégias de evasão do sistema imunológico. Algumas proteínas de roptrias interferem na sinalização do hospedeiro. Nesse contexto, foi observado que *N. caninum* codifica menos dessas proteínas de roptrias associadas à virulência em comparação com *T. gondii* (NOLAN *et. al.*, 2015) Sabe-se portanto, que há diferenças de fosforilação de proteínas da célula hospedeira para cada infecção. Na infecção por *T. gondii*, a proteína ROP18 está ligada como principal fator de virulência desse parasita, e essa possui a capacidade de fosforilar GTPases relacionadas à imunidade (IRGs), enquanto *N. caninum* não apresenta essa capacidade devido à pseudogenização dessa proteína (LEI *et. al.*, 2014; AI-BAJALAN *et. al.*, 2017).

A análise mais detalhada dos níveis de expressão dos genes de macrófagos mediante a infecção com cada protozoário leva a observações mais específicas quanto às disparidades de resposta induzidas. Em particular, para a via de interferon do tipo I, o gene *Tbk1* se destacou. É conhecido que *Tbk1* desempenha um papel importante na via de sinalização *Sting-Tbk1* quinase. Após a fosforilação do *Irf3* por *Tbk1*, ocorre a translocação deste para o núcleo, resultando na indução de genes específicos do hospedeiro favoráveis à infecção por *T. gondii*. Isso, por sua vez, leva à patologia e à morte do hospedeiro (MAJUMDAR *et. al.*, 2015). Em nossas observações, constatamos que, ao comparar as infecções, as expressões de *Tbk1* estão aumentadas tanto em células não estimuladas quanto infectadas por *N. caninum*, enquanto estão diminuídas em *T. gondii*. Já a expressão de *Irf3* apresentou-se

aumentado na infecção por *T. gondii*. A alteração de cenário na expressão gênica aumentada para *N. caninum*, é observado para *Tlr3*, corroborando com os achados anteriores do nosso grupo de pesquisa que observou o mecanismo de interação de *N. caninum* com a via TLR3-TRIF, onde viu que *N. caninum* foi capaz de induzir a translocação nuclear de IRF3, ao contrário de *T. gondii* (MIRANDA *et al.*, 2019). Por outro lado, os genes *Nfkb1* e *Irf3* apresentaram um aumento significativo na expressão em resposta a *T. gondii*, sendo que em estudos anteriores foi visto que NFKB1 desempenha um papel intrínseco na imunidade contra esse parasita (HARRIS *et al.*, 2010). Além de que, *Tbk1/Irf3*, está envolvida nos eventos de infecção por *T. gondii* (GAO *et al.*, 2021)

Quanto ao envolvimento dos genes de indução na via de Interferon do tipo II, destaca-se os genes *Bcl10* e *Traf6*. Sabe-se até então, que *Bcl10* está envolvido na expressão do interferon tipo I em resposta à infecção por DNA viral (YANG *et al.*, 2023). Além disso, é conhecido que a molécula adaptadora *Traf6* está envolvida em vias de sinalização do TLR e se associa a quinases de serina/treonina envolvidas na ativação das vias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que são cruciais para a sinalização de macrófagos induzida por *T. gondii* (YANG *et al.*, 2015). Ambos os genes atuam como reguladores da sinalização de NF-κB e apresentaram maior expressão durante a infecção por *T. gondii* em comparação com *N. caninum*. É importante notar que, no mapa de calor, a expressão de *Il-12b* permanece inalterada entre células não infectadas e infectadas por *T. gondii*, enquanto aumenta na presença de *N. caninum*. A citocina IL-12 desempenha um papel importante e predominantemente pró-inflamatório/estimulatório, contribuindo para papéis-chave no desenvolvimento de células Th1 (VIGNALI e KUCHROO, 2012), e está intimamente relacionada à resposta imunológica desses protozoários.

Já quanto aos genes de indução na via de interferon do tipo III, destaca-se os genes relacionados à via *Nf-kb*, que quando observados no mapa de calor apresentam maior perturbação positiva na infecção por *N. caninum*. Em estudos anteriores, foi visto que a infecção por *N. caninum* ativa a via de NF-κb, e essa capacidade está intimamente relacionado com proteínas de grânulos densos NcGRA6, NcGRA7 e NcGRA14 (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2020). Já para a infecção por *T. gondii*, vários estudos, revelaram uma resposta com ligação robusta canônica de NF-κb, porém a

via de sinalização ainda é profundamente desconhecida (FEREIG *et. al.*, 2017). Além disso, é conhecido que a infecção por *T. gondii* inibe de maneira similar a atividade de *Stat1* e a expressão gênica primariamente induzida por IFN- $\gamma$  em diversos tipos de células, incluindo macrófagos murinos (KIM, FOUTS e BOOTHROYD, 2007; ROSOWSKI *et al.*, 2013). No entanto, ao analisar o gráfico, é evidente que a infecção por *N. caninum* resultou em uma expressão aumentada dos genes *Stat1/Stat2*, enquanto *Stat3* apresentou-se mais expresso na infecção por *T. gondii*.

## **7. CONCLUSÃO:**

As análises do transcriptoma revelam diferenças marcantes na expressão gênica relacionadas às vias de indução e induzidas pelos diferentes tipos de Interferon durante as infecções pelos protozoários *N. caninum* e *T. gondii*. Esses resultados ressaltam que, apesar das similaridades filogenéticas entre esses parasitos, existem diferenças significativas nas interações entre o parasita e o hospedeiro, tanto quantitativa quanto qualitativa, principalmente referente aos genes *Irf1, Tbk1, Stat1, Nfkb, Cxcl10*, o que pode explicar os distintos padrões de patogenicidade em camundongos e outros hospedeiros. Tendo em vista essas diferenças, o estudo aprofundado das mesmas, podem identificar fatores específicos da infecção e os processos de invasão desses parasitos. Através da melhor compreensão das respostas induzidas por estes protozoários, pode-se desenvolver métodos preventivos e terapêuticos mais eficientes.

## 8. REFERÊNCIAS:

AL-BAJALAN MMM, XIA D, ARMSTRONG S, RANDLE N, WASTLING JM. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* induce different host cell responses at proteome-wide phosphorylation events; a step forward for uncovering the biological differences between these closely related parasites. *Parasitol Res.* 2017 Oct;116(10):2707-2719.

ALMERIA S, DUBEY JP. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. *Res Vet Sci.* Mar;135:371-385. 2021.

BARROS, P. DA S. C., MOTA, C. M., MIRANDA, V. D. S., FERREIRA, F. B., RAMOS, E. L. P., SANTANA, S. S., COSTA, L. F., MARQUES PAJUABA, A. C. A., ROBERTO MINEO, J., & MINEO, T. W. P. (2019). Inducible Nitric Oxide Synthase is required for parasite restriction and inflammatory modulation during *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology.* 2019. 276(108990), 108990.

BEITING DP, PEIXOTO L, AKOPYANTS NS, BEVERLEY SM, WHERRY EJ, CHRISTIAN DA, HUNTER CA, BRODSKY IE, ROOS DS. Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species. *PLoS One.* 2014 Feb 5;9(2):e88398.

BERNÁ L, MARQUEZ P, CABRERA A, GREIF G, FRANCIA ME, ROBELLO C. Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. *Genome Res.* 2021 May;31(5):823-833.

BOLKO L, JIANG W, TAWARA N, LANDON-CARDINAL O, ANQUETIL C, BENVENISTE O, ALLENBACH Y. The role of interferons type I, II and III in myositis: A review. *Brain Pathol.* 2021 May;31(3):e12955.

DONAHOE, S. L., LINDSAY, S. A., KROCKENBERGER, M., PHALEN, D., & ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife,* 4(2), 216–238. 2015.

DUARTE PO, OSHIRO LM, ZIMMERMANN NP, CSORDAS BG, DOURADO DM, BARROS JC, ANDREOTTI R. Serological and molecular detection of *Neospora*

*caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Sci Rep*. 2020 Jun 3;10(1):9043.

FEREIG RM, OMAR MA, ALSAYEQH AF. Exploiting the Macrophage Production of IL-12 in Improvement of Vaccine Development against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Infections. *Vaccines (Basel)*. 2022 Dec 6;10(12):2082.

GAO FF, QUAN JH, CHOI IW, LEE YJ, JANG SG, YUK JM, LEE YH, CHA GH. FAF1 downregulation by *Toxoplasma gondii* enables host IRF3 mobilization and promotes parasite growth. *J Cell Mol Med*. 2021 Oct;25(19):9460-9472.

GARCÍA-SÁNCHEZ M, JIMÉNEZ-PELAYO L, HORCAJO P, COLLANTES-FERNÁNDEZ E, ORTEGA-MORA LM, REGIDOR-CERRILLO J. *Neospora caninum* infection induces an isolate virulence-dependent pro-inflammatory gene expression profile in bovine monocyte-derived macrophages. *Parasit Vectors*. 2020 Jul 25;13(1):374.

GRIFFITHS SJ, DUNNIGAN CM, RUSSELL CD, HAAS JG. The Role of Interferon- $\lambda$  Locus Polymorphisms in Hepatitis C and Other Infectious Diseases. *J Innate Immun*. 2015;7(3):231-42.

HARRIS TH, WILSON EH, TAIT ED, BUCKLEY M, SHAPIRA S, CAAMANO J, ARTIS D, HUNTER CA. NF-kappaB1 contributes to T cell-mediated control of *Toxoplasma gondii* in the CNS. *J Neuroimmunol*. 2010 May;222(1-2):19-28.

KIM SK, FOUTS AE, BOOTHROYD JC. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):5154-65.

LAZEAR HM, SCHOGGINS JW, DIAMOND MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):907-923.

LEI T, WANG H, LIU J, NAN H, LIU Q. ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *PLoS One*. 2014 Jun 13;9(6):e99744.

MAJUMDAR T, CHATTOPADHYAY S, OZHEGOV E, DHAR J, GOSWAMI R, SEN GC, BARIK S. Induction of interferon-stimulated genes by IRF3 promotes replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2015 Mar 26;11(3):e1004779.

MARTIN-HIJANO L, SAINZ B JR. The Interactions Between Cancer Stem Cells and the Innate Interferon Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2020 Mar 31;11:526.

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

MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. *Veterinary Parasitology*, v. 159, n. 2, p. 149-153, 2009.

MIRANDA VDS, FRANÇA FBF, DA COSTA MS, SILVA VRS, MOTA CM, BARROS PDSC, PARREIRA KS, SANTIAGO FM, MINEO JR, MINEO TWP. Toll-Like Receptor 3-TRIF Pathway Activation by *Neospora caninum* RNA Enhances Infection Control in Mice. *Infect Immun.* 2019 Mar 25;87(4):e00739-18.

NOLAN SJ, ROMANO JD, LUECHTEFELD T, COPPENS I. *Neospora caninum* Recruits Host Cell Structures to Its Parasitophorous Vacuole and Salvages Lipids from Organelles. *Eukaryot Cell.* 2015 May;14(5):454-73.

PHILIPS RL, WANG Y, CHEON H, KANNO Y, GADINA M, SARTORELLI V, HORVATH CM, DARNELL JE JR, STARK GR, O'SHEA JJ. The JAK-STAT pathway at 30: Much learned, much more to do. *Cell.* 2022 Oct 13;185(21):3857-3876.

ROSOWSKI EE, NGUYEN QP, CAMEJO A, SPOONER E, SAEIJ JP. *Toxoplasma gondii* Inhibits gamma interferon (IFN- $\gamma$ )- and IFN- $\beta$ -induced host cell STAT1 transcriptional activity by increasing the association of STAT1 with DNA. *Infect Immun.* 2014 Feb;82(2):706-19.

SCHNEIDER WM, CHEVILLOTTE MD, RICE CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45.

SOKOL-BORRELLI SL, COOMBS RS, BOYLE JP. A Comparison of Stage Conversion in the Coccidian Apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, and *Neospora caninum*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Dec 3;10:608283.

- SONG X, YANG X, YING Z, WU K, LIU J, LIU Q. Regulation of Mitochondrial Energy Metabolism by Glutaredoxin 5 in the Apicomplexan Parasite *Neospora caninum*. *Microbiol Spectr*. 2023 Feb 14;11(1):e0309122.
- STARK GR, DARNELL JE JR. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012 Apr 20;36(4):503-14.
- VIGNALI DA, KUCHROO VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012 Jul 19;13(8):722-8.
- WANG, F., WANG, X., SONG, X., MA, L., YANG, J., LIU, Q., & LIU, J.. Function of *Neospora caninum* dense granule protein 7 in innate immunity in mice. *Parasitology Research*, 120(1), 197–207. 2021.
- YANG CS, YUK JM, LEE YH, JO EK. *Toxoplasma gondii* GRA7-Induced TRAF6 Activation Contributes to Host Protective Immunity. *Infect Immun*. 2015 Nov 9;84(1):339-50.
- YANG D, PEI G, DONG S, ZHANG W, DENG H, ZHAO X, LI P, LIN X. Bcl10 phosphorylation-dependent droplet-like condensation positively regulates DNA virus-induced innate immune signaling. *Sci China Life Sci*. 2023 Feb;66(2):283-297.
- ZHAO, S.-S., TAO, D.-L., CHEN, J.-M., CHEN, X., GENG, X.-L., WANG, J.-W., YANG, X., SONG, J.-K., LIU, Q., & ZHAO, G.-H. *Neospora caninum* infection activated autophagy of caprine endometrial epithelial cells via mTOR signaling. *Veterinary Parasitology*, 304(109685), 2022.
- ZHANG, X., LI, X., GONG, P., WANG, X., ZHANG, N., CHEN, M., ZHANG, X., & LI, J. Host defense against *Neospora caninum* infection via IL-12p40 production through TLR2/TLR3-AKT-ERK signaling pathway in C57BL/6 mice. *Molecular Immunology*. 2021. 139, 140–152.