

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

IASMIN LETÍCIA ANTONIO PARIZ

**PROTEÍNA DE GRÂNULO DENSO 48 (GRA48) DE *Neospora caninum* ATUA NA
FASE CRÔNICA DA NEOSPOROSE EXPERIMENTAL**

Uberlândia

2023

IASMIN LETÍCIA ANTONIO PARIZ

**PROTEÍNA DE GRÂNULO DENSO 48 (GRA48) DE *Neospora caninum* ATUA NA
FASE CRÔNICA DA NEOSPOROSE EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Caroline Martins Mota

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca
Mineo

Uberlândia

2023

IASMIN LETÍCIA ANTONIO PARIZ

**PROTEÍNA DE GRÂNULO DENSO 48 (GRA48) DE *Neospora caninum* ATUA NA
FASE CRÔNICA DA NEOSPOROSE EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Uberlândia, novembro de 2023.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Caroline Martins Mota - Ibttec/UFU

Dr. Marcos Paulo Oliveira Almeida

Dr. Samuel Cota Teixeira – Icbim/UFU

Dedico este trabalho aos meus pais, meus maiores
e melhores orientadores na vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar força e orientação ao longo dessa jornada acadêmica. Sem Sua graça e orientação, nada disso seria possível.

Aos meus pais, quero dedicar um agradecimento especial. Seu apoio incondicional, incentivo e amor constante foram a força motriz por trás de todas as minhas conquistas. Cada sacrifício que fizeram em prol da minha educação não foi em vão, e este TCC é a prova viva disso. Vocês são os verdadeiros heróis da minha jornada acadêmica.

À minha querida irmã, avós, primos, tios e tias, agradeço por todo o carinho, apoio e compreensão que demonstraram ao longo dos anos. Suas palavras de encorajamento e amor inabalável foram um grande impulso para mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Caroline Martins Mota, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, sou imensamente grata por sua orientação, paciência e expertise. Vocês foram pilares essenciais na condução deste trabalho e no meu crescimento acadêmico.

Aos meus companheiros de laboratório, em particular ao David Aguilón, quero expressar minha gratidão pelo ensinamento, paciência e compreensão que demonstraram. Trabalhar ao lado de vocês foi uma experiência enriquecedora e inspiradora.

À Ruth Awoyinka, agradeço por ser um "ombro amigo" nos momentos de dúvidas e incertezas. Sua amizade e apoio foram inestimáveis.

E a todos aos meus amigos/colegas de curso e tantos outros, agradeço pelas conversas enriquecedoras, ajuda mútua e companheirismo ao longo desta jornada.

Este TCC representa não apenas minha dedicação e esforço, mas também o apoio inestimável de todos vocês. Estou profundamente grata por fazer parte de uma comunidade tão incrível de amigos, familiares e mentores. Obrigada por serem parte essencial do meu sucesso acadêmico e por tornarem esta jornada inesquecível.

“Às vezes, apenas levantar e seguir em frente é
corajoso e magnífico.”
(CHARLIE MACKESY)

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário parasita que causa aborto em bovinos em todo o mundo. Esses abortos resultam em perdas econômicas significativas para a indústria pecuária. A invasão das células hospedeiras por *N. caninum* é seguida pela formação de um vacúolo parasitóforo (PV). Algumas proteínas granulares densas de *N. caninum* (NcGRAs) são essenciais para a formação do PV, o que é fundamental para a virulência do parasita. Nesse contexto, o objetivo principal deste estudo foi determinar o papel da proteína de grânulo denso 48 (GRA48) de *N. caninum* na virulência e regulação da resposta imune do hospedeiro. Camundongos C57BL/6 foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* das cepas NcLiv (WT), NcLiv Δ gra48 ou não-infectados (NI) via intraperitoneal para avaliar o peso corporal e, adicionalmente, a carga parasitária durante fase crônica e aguda. Foi avaliado o perfil de citocinas IFN- γ e IL-12p40 durante a fase aguda da infecção no macerado do baço, do lavado peritoneal e soro desses animais infectados e NI das amostras coletadas. Além disso, IL-10 e IL-12p40 do sobrenadante da cultura de macrófagos derivadas da medula óssea (BMDMs) infectados com NcLiv (WT), NcLiv Δ gra48 ou NI foram analisados. Camundongos infectados com a cepa NcLiv Δ gra48 apresentaram menor perda de peso e menor parasitismo cerebral na fase crônica da infecção, entretanto, não houve diferenças na fase aguda. As citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-12p40, não apresentaram diferenças significativas entre as cepas WT e NcLiv Δ gra48 durante a fase aguda no baço e soro. Em macrófagos, a ausência de NcLiv Δ gra48 resultou em uma diminuição significativamente de IL-12p40 e IL-10, indicando seu papel na modulação da resposta imune. Dessa forma, os resultados aqui contidos demonstram que a proteína GRA48 de *N. caninum* pode desempenhar um papel importante na biologia do parasito, afetando na virulência do parasito e na resposta imunológica.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, GRA48, parasitismo, resposta imune, virulência.

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan parasite that causes abortion in cattle worldwide. These abortions result in significant economic losses for the livestock industry. *N. caninum* invasion of host cells are followed by the formation of a parasitophorous vacuole (PV). Some *N. caninum* dense granular proteins (NcGRAs) are essential for PV formation, which is essential for the virulence of the parasite. In this context, the main objective of this study was to determine the role of *N. caninum* dense granule protein 48 (GRA48) in virulence and regulation of the host immune response. C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with *N. caninum* tachyzoites from the NcLiv (WT), NcLiv Δ gra48 or non-infected (NI) to evaluate body weight and, additionally, parasitic load during chronic and acute phase. The cytokine profile of IFN- γ and IL-12p40 was evaluated by ELISA during the acute infection in the spleen, peritoneal lavage, and serum of infected and NI mice. In addition, IL-10 and IL-12p40 from supernatant of the culture of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) infected with NcLiv (WT), NcLiv Δ gra48 or NI were analyzed. Mice infected with the NcLiv Δ gra48 showed less weight loss and brain parasitism during chronic phase of the infection, however, there were no differences in the acute phase. Pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ and IL-12p40, did not show significant differences between the WT and NcLiv Δ gra48 during the acute phase in the spleen and serum. In macrophages, the absence of GRA48 resulted in a significantly decreased IL-12p40 and IL-10, indicating its role in modulating the immune response. Thus, the results demonstrated that *N. caninum* GRA48 may play role in the parasite biology and immune response.

Keywords: *Neospora caninum*, GRA48, parasitism, immune response, virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo Biológico de <i>N. caninum</i>	11
Figura 2 -	Principais estruturas e componentes de <i>N. caninum</i>	16
Figura 3 -	Influência da GRA48 de <i>N. caninum</i> em parâmetros da infecção <i>in vivo</i>	24
Figura 4 -	Influência da GRA48 de <i>N. caninum</i> na produção de citocinas <i>in vitro</i>	26

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1	<i>Neospora caninum</i>	10
1.2	Prevalência da infecção por <i>N. caninum</i>	12
1.3	Ciclo lítico de <i>N. caninum</i>	13
1.4	Resposta imune protetora frente infecção por <i>N. caninum</i>	14
1.5	Proteínas de grânulo denso de <i>N. caninum</i> (NcGRAs)	14
2.	JUSTIFICATIVA.....	17
3.	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo Geral.	18
3.2	Objetivos Específicos.	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Obtenção e manejo dos camundongos.....	19
4.2	Cultura de células	19
4.3	Cultura de parasitos	19
4.4	Infecção por <i>N. caninum in vivo</i>	20
4.5	Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	20
4.6	Infecção por <i>N. caninum in vitro</i>	21
4.7	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	21
4.8	PCR em tempo real.....	22
4.9	Análise estatística	22
5.	RESULTADOS.....	23
5.1	GRA48 de <i>N. caninum</i> desempenha papel na biologia do parasito durante a fase crônica da infecção.....	23
5.2	GRA48 de <i>N. caninum</i> diminui a produção de citocinas pró-inflamatória e imunoregulatória <i>in vitro</i>	25
6.	DISCUSSÃO.....	27
7.	CONCLUSÃO	29
8.	REFERÊNCIAS.....	30
	ANEXO I	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum*

Neospora caninum, um parasita protozoário intracelular obrigatório do filo Alveolata (subfilo Apicomplexa), compartilha várias características estruturais e biológicas com o parasita protozoário *Toxoplasma gondii* (Fereig; Omar; Alsayeqh, 2022; Velásquez *et al.*, 2022). Antes de 1988, a neosporose era erroneamente diagnosticado como toxoplasmose. A partir de sua primeira identificação em cães na Noruega, em 1984, e da descrição do novo gênero e espécie *N. caninum*, a neosporose tornou-se uma doença séria que afeta bovinos e cães em todo o mundo (Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007). *N. caninum* apresenta ciclo biológico heteroxeno, ou seja, o ciclo se desenvolve em hospedeiros distintos, subdivididos em fases sexuada e assexuada. A reprodução sexuada ocorre em canídeos (cão, coiote, dingo australiano, lobo) que são considerados hospedeiros definitivos (Snak *et al.*, 2018), enquanto a reprodução assexuada ocorre em vários hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, galinhas, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (Manca *et al.*, 2022).

O ciclo de vida complexo do *N. caninum* compreende três estágios infecciosos distintos (Figura 1): (i) os oocistos (estágio sexual) contendo esporozoítos, que se formam no intestino dos hospedeiros definitivos (canídeos), e são eliminados nas fezes para o ambiente; (ii) os taquizoítos, responsáveis pela fase aguda da infecção de alta replicação e indução de doenças; e (iii) os bradizoítos, responsáveis pela fase crônica que se multiplicam lentamente e formam cistos teciduais, podendo persistir por longos períodos de tempo sem provocar reações inflamatórias (Anghel *et al.*, 2021). A transmissão da neosporose para hospedeiros intermediários, como os bovinos, pode ocorrer de duas maneiras principais. Primeiro, por meio da ingestão de oocistos que estão no ambiente. Segundo, por transmissão vertical, que envolve a transmissão transplacentária ou congênita de uma fêmea grávida infectada para seu feto. A transmissão vertical é considerada a via predominante e mais eficiente, responsável por cerca de 80% das transmissões de *Neospora* em rebanhos bovinos. Os fetos infectados por *N. caninum* podem enfrentar diversas consequências, incluindo aborto em qualquer idade gestacional, reabsorção, mumificação, autólise ou nascimento com infecção persistente. Além disso, devido à estreita associação de cães e bovinos em rebanhos há probabilidade de transmissão significativamente maior. Isso ocorre porque os parasitas podem ser mantidos e propagados

entre os hospedeiros definitivos e intermediários por um longo período dentro do mesmo rebanho. Alimentos e água também podem servir como fontes de transmissão para os hospedeiros intermediários, como o gado, quando ingerem oocistos esporulados presentes nesses substratos contaminados. Portanto, tanto a transmissão horizontal quanto a vertical desempenham papéis importantes na disseminação da *Neospora* em diferentes populações de hospedeiros (Khan *et al.*, 2020; Nazari *et al.*, 2023).

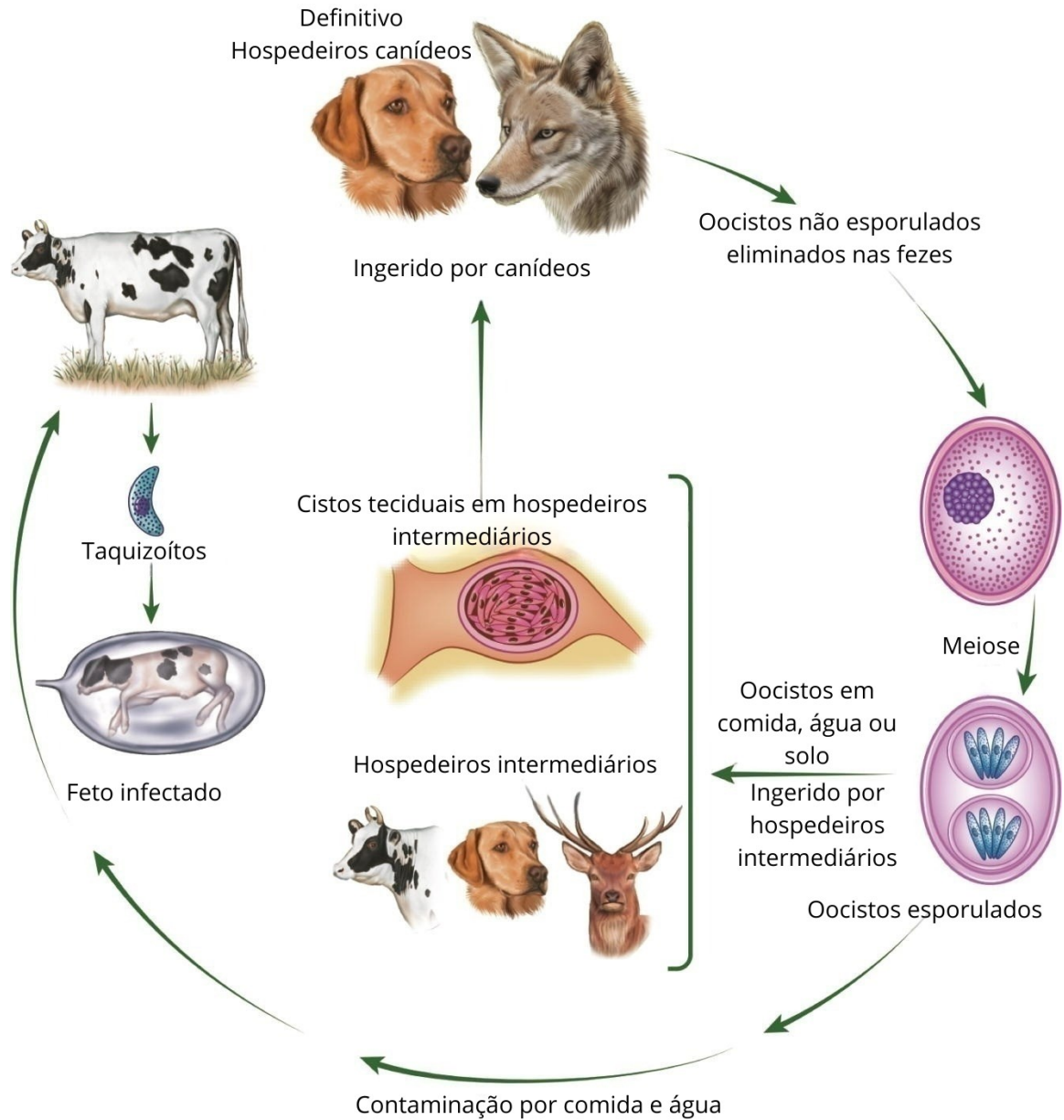


Figura 1: Ciclo Biológico de *Neospora caninum*. Os cães atuam como hospedeiros definitivos, eliminando o parasita nas fezes. Os bovinos se infectam ingerindo alimentos contaminados, desencadeando o ciclo. A transmissão horizontal ocorre quando cães consomem tecidos contaminados de animais infectados, ampliando o ciclo. No hospedeiro intermediário, os cistos se formam nos tecidos, perpetuando a infecção. A transmissão vertical, de mãe para filho, é possível, aumentando o risco em rebanhos. Adaptado de Khan e Shaik (2020).

1.2 Prevalência da infecção por *N. caninum*

Enquanto o parasita *T. gondii* possui a capacidade de infectar uma variada gama de vertebrados de sangue quente, abrangendo aproximadamente um terço da população global, *N. caninum*, em contrapartida, apresenta uma especificidade de hospedeiros mais restrita, direcionando-se predominantemente a ruminantes e cães (Lindsay; Dubey, 2020). Este último é reconhecido como uma das principais origens de abortos em bovinos em nível mundial, gerando consequentes prejuízos econômicos substanciais para a indústria pecuária (Mineo *et al.*, 2022).

As infecções causadas por *N. caninum* foram documentadas em várias regiões ao redor do mundo, abrangendo países como Austrália, Nova Zelândia, países europeus, Coreia, Japão, Tailândia e diversas nações das Américas. Relatos de aborto em bovinos associados à neosporose, bem como altas taxas de mortalidade neonatal, foram registrados em diferentes locais, incluindo Argentina, Austrália, Bélgica, Brasil e outras nações. Embora *N. caninum* tenha sido reconhecido pela primeira vez na década de 1980, a maioria dos relatos na América do Sul foram obtidos nas últimas décadas, quando foi identificada pela primeira vez em um feto abortado de uma fazenda leiteira com histórico de aborto (Moore, 2005). Em muitos países, a perda econômica mais significativa causada pela neosporose é a falha reprodutiva do gado. Além dos custos diretos da perda fetal, os custos indiretos incluem assistência profissional e encargos para estabelecer um diagnóstico, reprodução, perda potencial de produção de leite e custos de reposição se vacas abortadas forem abatidas (Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007).

Estudos quantitativos realizados no Brasil revelaram que aproximadamente 39,1% dos fetos abortados em rebanhos de gado leiteiro estavam infectados com *N. caninum* (Dubey, 2003). Em outro estudo, foi constatado que a infecção de bovinos leiteiros por *N. caninum* é generalizada na região estudada da Amazônia Ocidental, com percentuais de prevalência de anticorpos anti- *N. caninum* em cerca de 47,36% (Venturoso *et al.*, 2021). Também foram encontradas associação entre soropositividade para *N. caninum* e aborto, com vacas soropositivas tendo 3,3 vezes mais probabilidade de abortar do que vacas soronegativas em estudo realizado no sul do Brasil (Corbellini *et al.*, 2002).

Sob uma perspectiva epidemiológica, um estudo identificou que o contato entre bovinos e cães representa um fator de risco considerável que requer uma investigação aprofundada. Nele, foi observado que cães residentes em áreas periurbanas ou rurais apresentaram uma probabilidade significativamente maior de contrair infecção por *N. caninum* em comparação

com cães que vivem em ambientes urbanos, como indicado em estudos realizados em Minas Gerais (MG). Esse fator de risco costuma estar relacionado à proximidade dos cães com o gado, bem como ao acesso e ao consumo de membranas fetais, carcaças e presas (Cerqueira-Cézar et al., 2017). Dessa forma, desenvolver estratégias de controle e prevenção mais eficazes é importante para a saúde animal e aos fatores de risco associados à saúde pública.

O tratamento da neosporose é geralmente difícil e de eficácia variável. Em alguns casos, pode ser necessário um tratamento prolongado, e o prognóstico pode ser ruim. O tratamento é mais eficaz nos estágios iniciais da infecção. O medicamento mais utilizado para o tratamento da neosporose é a clindamicina, uma lincosamida que tem atividade antiprotozoária. A clindamicina é eficaz contra os taquizoítos de *N. caninum*, que são as formas infectantes do parasito. Apesar disso, a maioria dos protocolos de tratamento da neosporose concentra-se no controle das manifestações clínicas, e não na cura parasitológica (Silva; Machado, 2016).

1.3 Ciclo lítico de *N. caninum*

A invasão e lise celular são os principais eventos na patogênese da infecção por *N. caninum*, os quais envolvem processos complexos, por apresentarem uma maquinaria dedicada em seus complexos apicais, os quais são compostos por micronemas, roptrias e grânulos densos, utilizados pelos parasitas durante o processo de adesão e invasão de células hospedeira (Buxton; Mcallister; Dubey, 2002; Li et al., 2015).

Durante a fase de invasão, a forma evolutiva taquizoíto se adere à superfície da célula hospedeira, envolvendo a atuação de antígenos de superfície imunodominantes (SAG) e se introduz em seu citoplasma por meio de uma invaginação membranosa. Em seguida, o parasita em um vacúolo parasitóforo (PV) inicia a fase de replicação intracelular. Durante essa fase, o parasita se replica assexuadamente dentro do PV, para a formação do PV várias proteínas de micronemas (MIC) são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão de modo irreversível, uma estrutura que se forma na superfície do parasita após a adsorção à célula hospedeira e que impede o seu desprendimento. Em sequência, inicia-se o movimento de invasão celular, que o força para dentro do PV (Li et al., 2015). A membrana plasmática da célula hospedeira é usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MPV), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos. A segunda etapa é caracterizada pela secreção de proteínas de roptrias (ROP), que são liberadas dentro do PV e estendem a MPV para induzir a associação com organelas do hospedeiro. Na última etapa,

proteínas de grânulos densos (GRAs) modificam a MPV e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo, com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento e sobrevivência do parasito (Buxton; Mcallister; Dubey, 2002).

1.4 Resposta imune protetora frente infecção por *N. caninum*

A imunidade inata desempenha um papel essencial tanto na patogênese quanto na proteção contra infecções por protozoários, como indicam estudos imunológicos *in vitro* e *in vivo* por exemplo, na utilização de parasitas transgênicos (Tedla; Every; Scheerlinck, 2019).

As células epiteliais atuam como uma barreira física contra os patógenos, sendo a primeira linha de defesa do hospedeiro (Günther; Seyfert, 2018). Além disso, a interação das moléculas de *N. caninum* com os receptores imunes inatos estabelece vias de sinalização intracelular, como por exemplo a via Toll-like receptor (TLR) e vias de reconhecimento de padrões (PRR) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e desencadeiam uma resposta inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas (Barros *et al.*, 2019). As células T auxiliar (Th), especificamente as Th1, são cruciais na resposta imunológica protetora contra *N. caninum*, produzindo interleucina-12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ) e óxido nítrico (NO) em sequência. Esses produtos químicos são secretados principalmente por macrófagos e desempenham um papel importante no controle da disseminação tecidual de *N. caninum* e na sobrevivência do hospedeiro, destacando a importância da produção de anticorpos IgG2 e de respostas celulares eficientes (Mota *et al.*, 2016). Em algumas ocasiões, *N. caninum* é capaz de impedir a morte de macrófagos e utilizar sua proliferação e transmissão para estabelecer com sucesso uma infecção e se espalhar para os órgãos-alvo (García-Sánchez *et al.*, 2020). Conforme demonstrado anteriormente, as GRAs desempenham um papel essencial na resposta imune do hospedeiro, desencadeando mecanismos associados a ativação de genes dependentes em macrófagos associados a respostas inflamatórias (Lima; Lodoen, 2019), bem como a ativação de fatores de transcrição e a indução da produção de citocinas inflamatórias (Wang *et al.*, 2019).

1.5 Proteínas de grânulo denso de *N. caninum* (NcGRAs)

N. caninum apresenta três organelas distintas que são responsáveis por liberar efetores durante o processo de invasão celular, micronemas, roptrias e grânulos densos (Figura 2)

(Maruhan-Hernandez, 2017). Em estudos realizados anteriormente, a GRA23 e GRA14 foram descritas como proteínas que modificam o microambiente dentro dos PVs, influenciando na sobrevivência e replicação intracelular do parasita, manipulando as respostas imunes do hospedeiro (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Após a invasão da célula hospedeira, há uma secreção aumentada de GRAs, seguida de uma secreção contínua em níveis mais baixos. Dessa forma, essas proteínas são consideradas como importantes para a relação parasita-hospedeiro e para a obtenção de nutrientes (Leineweber *et al.*, 2017). Em estudo realizado para avaliar a carga de parasitas e o grau de necrose nos cérebros de camundongos infectados com o parasita deficiente em NcGRA7, foram encontrados resultados de número e grau menores em comparação com os da cepa parental. Em suma, o estudo demonstrou que a ausência de GRA7 resultou em uma diminuição da virulência do parasita em camundongos, evidenciando a relevância do GRA7 na patogênese da neosporose (Nishikawa *et al.*, 2018).

Em *N. caninum*, foram identificadas várias proteínas GRA que apresentam semelhanças com proteínas correspondentes em *T. gondii*, em um estudo prévio demonstrou a localização e a função de genes específicos associados a proteínas secretadas por estes parasitas. Como parte desse estudo, foram examinados dois genes de interesse, sendo um deles o *Neospora* GRA48. O resultado revelou que o *Neospora* GRA48 está situado no vacúolo, comportando-se de maneira semelhante à observada na proteína granular densa de *T. gondii*. Contudo, o estudo ressalta que, apesar da identificação da localização e da ativação demonstrada por outra GRA, o papel da GRA48 no desenvolvimento dos taquizoítos e/ou em sua interação com o hospedeiro permanece um enigma. Portanto, segundo o artigo, é imperativo conduzir estudos complementares sobre o NcGRA48, a fim de esclarecer o papel desempenhado pelo GRA48 na biologia do parasita, permitindo uma comparação com proteínas ortólogas (Mineo *et al.*, 2022).

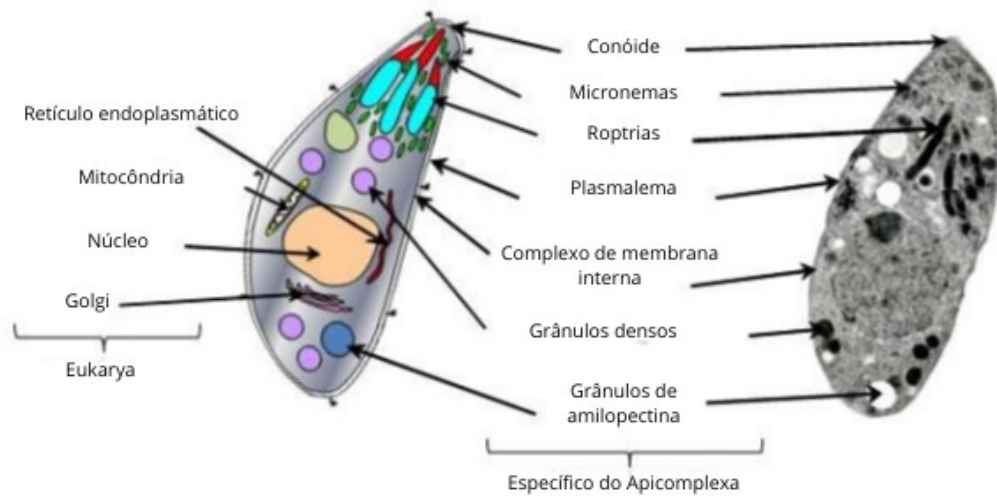


Figura 2: Principais estruturas e componentes de *Neospora caninum*. Micronemas: Estruturas especializadas na extremidade apical, essenciais para a aderência e invasão celular. Roptrias: Organelas secretoras cruciais na formação do vacúolo parasitóforo, permitindo a replicação intracelular. Grânulos Densos: Contêm proteínas efetoras que desempenham papel na modulação da resposta imune do hospedeiro. Adaptado de Marugan-Hernandez (2017).

Desse modo, o objetivo deste trabalho é aprofundar o entendimento do papel da proteína de grânulo denso 48 (GRA48) na resposta imune do hospedeiro durante infecções por *N. Caninum*, através de uma análise abrangente da interação entre a GRA48 e os mecanismos imunológicos do hospedeiro, para que possam contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento para a neosporose.

2. JUSTIFICATIVA

N. caninum é um parasita intracelular obrigatório que infecta animais como cães e bovinos. A neosporose, causada por este parasita, é uma doença que causa alto impacto na economia agropecuária. Esses impactos, em muitos países, são causados por perdas econômicas significativas aos produtores rurais, incluindo custos diretos e indiretos no cuidado do gado leiteiro. O tratamento da neosporose é geralmente difícil e de eficácia incerta, e o sucesso depende do estágio da infecção e da gravidade da doença.

As GRAs, ao modificar o microambiente dentro dos PVs, influenciam na sobrevivência e replicação intracelular do parasita, desempenhando assim um papel essencial na resposta imune do hospedeiro e na relação parasita-hospedeiro.

Dessa forma, este estudo justifica-se pela necessidade de compreender o papel da GRA48 de *N. caninum* na interação parasito-hospedeiro. A compreensão do papel de NcGRA48 na biologia do parasita e na resposta imune do hospedeiro pode contribuir para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos e profiláticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de NcGRA48 na virulência e regulação da resposta imune de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados por *N. caninum*.

3.2 Objetivos Específicos

A. Avaliar a carga parasitária e peso corporal em camundongos C57BL/6 inoculados com dose não letal do parasito *N. caninum* geneticamente depletado para GRA48 (NcLiv Δ *gra48*) e selvagem (NcLiv WT) durante a fase crônica e aguda.

B. Avaliar o perfil de citocinas em células do lavado peritoneal, baço e soro em camundongos C57BL/6 inoculados com dose não letal do parasito *N. caninum* geneticamente depletado para GRA48 (NcLiv Δ *gra48*) e selvagem (NcLiv WT) durante a fase aguda.

C. Avaliar o perfil de citocinas em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) infectados com os parasitos NcLiv Δ *gra48* e NcLiv WT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e manejo dos camundongos

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram obtidos e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em condições padronizadas de criação. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 1991).

Os protocolos para utilização dos animais foram previamente aprovados pelo nosso Comitê de Ética Animal institucional (CEUA / UFU - 109/16 – ANEXO I).

4.2 Cultura de células

Células NIH/3T3 foram mantidas no Laboratório de Imunoparasitologia Mário Endsfieldz Camargo, na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e cultivados em frascos de cultura de tecidos de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C até atingirem a confluência.

4.3 Cultura de parasitos

No presente estudo foram utilizados taquizoítos de *N. caninum* das variantes parental - NcLivΔ*hxgpr*Δ*ku80* (WT) e depletada geneticamente para *gra48* - NcLivΔ*gra48* (Mineo *et al.*, 2022). Os parasitos de *N. caninum* foram mantidos em cultura celular das células NIH/3T3, e foram utilizadas para experimentos *in vivo* e *in vitro*. As células foram infectadas e mantidas através de passagens sequenciais em meio RPMI contendo 2% de soro fetal bovino, a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por passagens forçadas através de uma agulha 13 x 4 mm e centrifugação rápida a 45 x g, por 1 minuto, para remover os resíduos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 800 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento final da suspensão parasitária foi reconstituído em RPMI, e os parasitos foram contados em uma câmara de Neubauer, utilizando o corante vital azul de Tripan a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para preparação dos inóculos.

4.4 Infecção por *N. caninum* *in vivo*

No âmbito dos experimentos *in vivo* conduzidos neste estudo de fase crônica de infecção, camundongos fêmeas C57BL/6 (5 animais por grupo) foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* da cepa NcLiv do tipo selvagem (WT) ou NcLiv Δ *gra48*. A carga parasitária foi avaliada 30 dias pós-infecção (dpi) no cérebro dos camundongos eutanasiados e o peso corporal de todos os camundongos infectados foram monitorados diariamente durante os 30 dias.

Para exame da carga parasitária e detecção das citocinas IFN- γ e IL-12p40 durante a fase aguda da infecção, camundongos C57BL/6 (5 animais por grupo) foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* da cepa NcLiv do tipo selvagem (WT) ou NcLiv Δ *gra48* ou não-infectados. Todos os camundongos foram eutanasiados 3 dpi e coletados as células e sobrenadante do lavado peritoneal, soro e baço. Os animais foram submetidos à sangria por punção do plexo retro-orbital e amostras de sangue foram coletadas com tubo capilar e submetidas a centrifugação e armazenamento a -70°C . As células do lavado peritoneal foram usadas para determinar a carga parasitária, enquanto o sobrenadante, soro e o baço foram usados para detectar as citocinas IFN- γ e IL-12p40.

4.5 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Camundongos C57BL/6 foram eutanasiados e higienizados com álcool 70% e seus ossos do fêmur e tíbia foram obtidos e separados. Foram feitos cortes nas articulações, bem como na junção do quadril, sem causar danos às extremidades dos ossos, os quais foram transferidos para tubos contendo meio RPMI 1640 incompleto. Em uma câmara de fluxo laminar, os ossos foram imersos em álcool 70% e suas extremidades foram cortadas com instrumentos esterilizados.

A cavidade medular dos ossos foi lavada com meio RPMI 1640 incompleto usando uma seringa e uma agulha de calibre 26G até que toda a medula óssea fosse desalojada. A suspensão celular resultante foi centrifugada a $400 \times g$ por 10 minutos a 4°C e reconstituída em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina, L-glutamina e meio condicionado das células L929 (Marim et al., 2010).

A suspensão celular foi distribuída igualmente em placas de Petri e incubada em uma estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após quatro dias, o meio condicionado foi adicionado às placas e mantidas na estufa por mais três dias. No sétimo dia, o sobrenadante foi descartado e PBS

estéril gelado foi adicionado às placas. Após 10 minutos de incubação a 4°C, os macrófagos foram removidos pipetando suavemente o PBS através da placa.

As células foram centrifugadas e o sedimento resultante foi reconstituído em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino. As células foram contadas e plaqueadas em placas de cultura.

4.6 Infecção por *N. caninum* in vitro

1×10^6 BMDMs/mL foram plaqueados em placa de 96 poços, e incubadas por 18 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS - 500ng/mL) por 3 horas e infectadas com taquizoítos de *N. caninum* da cepa NcLiv do tipo selvagem (WT) ou NcLiv Δ gra48 no *Multiplicity Of Infection* (MOI) 0,5 ou não-infectadas. Após 24 horas de infecção o sobrenadante foi coletado para posterior mensuração das citocinas IL-12p40 e IL-10.

4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foram mensuradas as citocinas IFN- γ e IL-12p40 do baço e do lavado peritoneal de camundongos infectados das amostras coletadas a 3 dpi, assim como IL-10 e IL-12p40 do sobrenadante da cultura de células. Foram realizadas utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) de citocinas (conjunto Mouse OptEIA ELISA; BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes. Brevemente, foram utilizadas placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®), que foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura durante 18 horas a 4°C. Após a lavagem das placas com PBS-Tween e o bloqueio com soluções bloqueadoras específicas para cada análise, as amostras foram adicionadas. Foram realizadas curvas padrões das citocinas murinas recombinantes em diluições duplo-seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas novamente e incubadas com anticorpos de detecção biotinizados e conjugado estreptavidina-peroxidase. Após lavagem final das placas, as revelações foram desenvolvidas com substrato enzimático (tetrametilbenzidina [TMB]) e a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm. Os valores foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão.

4.8 PCR em tempo real

DNA de *N. caninum* no cérebro e das células do lavado peritoneal de camundongos desafiados foi quantificado por PCR em tempo real, através do sistema de detecção SYBR green, como anteriormente descrito (Cardoso *et al.*, 2011; Wahab *et al.*, 2010). Foram utilizados os seguintes pares de primers: Forward: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; Reverse: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3' (Prodimol Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, MG), para detecção da região Nc5 de *N. caninum*. A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido cerebral ou 10^6 células do lavado peritoneal utilizando o kit de purificação de DNA genômico (Wizard®, Promega Co., Madison, EUA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e ajustada para 200 ng com água estéril e livre de DNase.

Os ensaios para quantificar a carga parasitária cerebral foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a contagem de parasitos foi calculada por interpolação de uma curva padrão que foram incluídas em cada análise. Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito/200 ng de DNA total.

4.9 Análise estatística

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados em dois e três experimentos independentes. Para a análise estatística e a construção dos gráficos, foi utilizado o *software GraphPad Prism 9.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) e os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Os dados foram analisados pelo teste *t Student* e *one-way ANOVA*, conjuntamente com o *post-test* de comparação múltipla de Bonferroni para comparar pares selecionados de grupos. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significantes para um nível de $p < 0,05$. Nenhuma significância é indicada pela sigla “ns”.

O cálculo de variação corporal dos camundongos foi realizado a partir do dia 0, ou seja, no momento da infecção, pelo software Excel. A partir desse dia, foi monitorada a porcentagem de perda de peso dos animais.

5. RESULTADOS

5.1 GRA48 de *N. caninum* desempenha papel na biologia do parasita durante a fase crônica da infecção

Os camundongos infectados com a cepa NcLiv Δ *gra48* apresentaram uma menor perda de peso (Figura 3A) durante os 30 dias pós infecção (dpi) e menor grau de parasitismo no cérebro após 30 dpi (Figura 3B) quando comparados com o controle de animais tipo selvagem (NcLiv WT).

Para avaliar os efeitos da depleção da GRA48 na carga parasitária durante a fase aguda da infecção, camundongos infectados com NcLiv, NcLiv Δ *gra48* e não-infectados foram eutanasiados 3 dpi e a carga parasitária nas células do lavado peritoneal foram determinadas por PCR quantitativo (Figura 3C). No entanto, não houve diferença significativa no parasitismo entre as cepas WT e NcLiv Δ *gra48* durante a fase aguda da infecção.

Adicionalmente, o perfil de citocinas foi avaliado durante a fase aguda (3dpi) desses animais infectados com NcLiv WT, NcLiv Δ *gra48* ou não-infectados. Os resultados demonstram que não houve diferença significativa na produção de IFN- γ (Figura 3D) e IL-12p40 (Figura 3E) no baço entre as cepas NcLiv WT e NcLiv Δ *gra48* e como esperado *N. caninum* induziu no baço a produção de citocina pró-inflamatória quando comparado com o grupo não-infectado (Figura 3D). As citocinas IFN- γ e IL-12p40 também foram avaliadas em amostras de soro (Figura 3F e 3G) e lavado peritoneal (Figura 3H e 3I). No entanto, nenhuma diferença significativa nas concentrações destas citocinas foi observada entre os grupos WT e NcLiv Δ *gra48*, exceto na diminuição da produção de IFN- γ em células do lavado peritoneal.

Os resultados *in vivo* sugerem que GRA48 pode ter um papel no processo de cronificação da infecção atuando na biologia do parasito, uma vez que durante a fase crônica o grupo infectado com o parasito que expressa *gra48* teve uma maior carga parasitária. Enquanto, o grupo com infecção aguda com NcLiv que apresenta *gra48* (WT) e o depletado para *gra48* (NcLiv Δ *gra48*) não apresentaram diferenças na carga parasitária ou alterações consideráveis na produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-12p40.

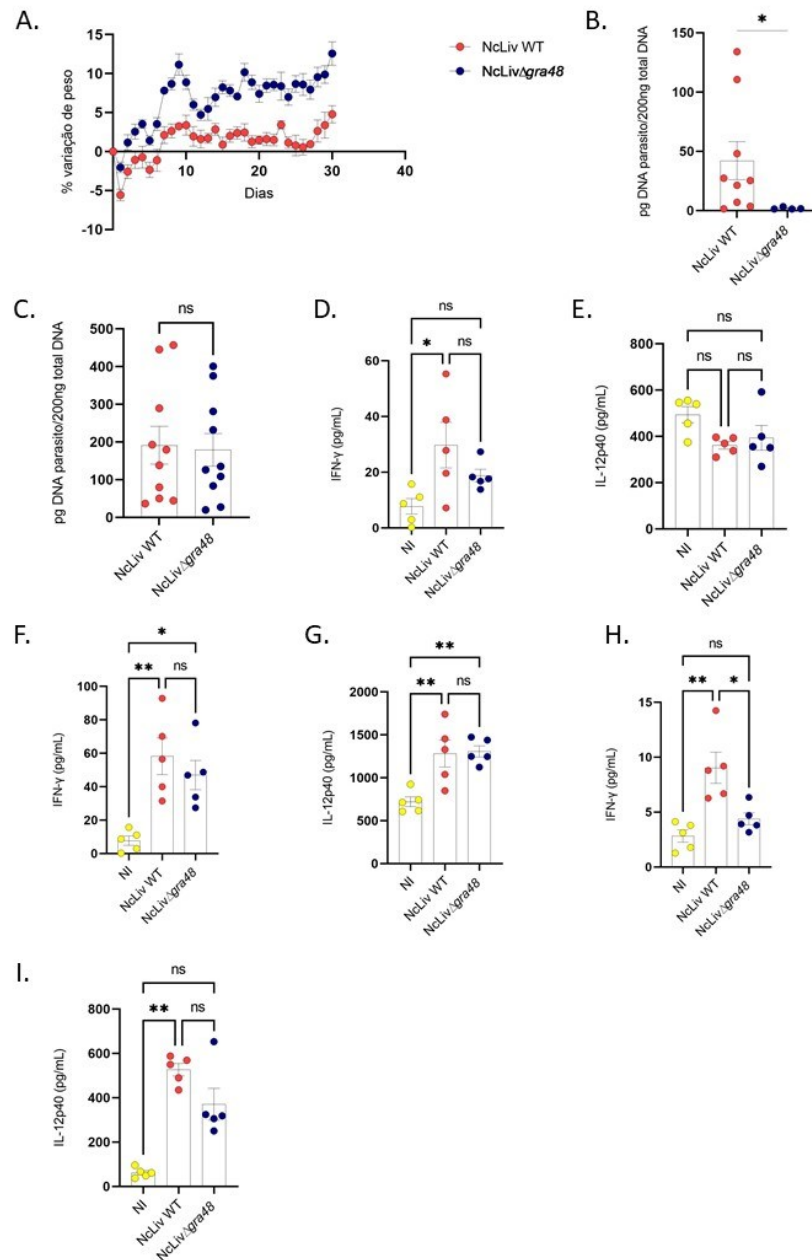


Figura 3: Influência da GRA48 de *N. caninum* em parâmetros da infecção *in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com NcLiv (WT), NcLiv $\Delta gra48$ ou não-infectados (NI) via intraperitoneal (ip). (A) Camundongos foram infectados com 1×10^6 (n=5 camundongos/grupo) e após 30 dpi a morbidade foi avaliada pela variação do peso corporal (% do peso corporal inicial). (B) Após 30 dpi, os animais foram eutanasiados e o cérebro foi coletado para análise do parasitismo por PCR quantitativo. (C) Camundongos foram infectados com 1×10^6 (n=5 camundongos/grupo) e após 3 dpi foi avaliada a carga parasitária por PCR nas células do lavado peritoneal. Baço, soro e células do lavado peritoneal foram coletados para avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias por ELISA. Os baços foram coletados para avaliar a produção de IFN- γ (D) e IL-12p40 (E). Amostras de soro também foram coletadas para dosar IFN- γ (F) e IL-12p40 (G). E sobrenadante do lavado peritoneal foi obtido para mensuração de IFN- γ (H) e IL-12p40 (I). Dados foram expressos como média \pm desvio padrão. *indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$; teste *t Student* e ANOVA com comparação múltipla de Bonferroni).

5.2 GRA48 de *N. caninum* diminui a produção de citocinas pró-inflamatória e imunoregulatória *in vitro*

Para melhor avaliar o papel de GRA48 de *N. caninum* na resposta imune inata, BMDMs foram primados com LPS e infectados com NcLiv (WT), NcLiv Δ *gra48* ou não-infectados (NI). O perfil das citocinas IL-12p40 (Figura 4A) e IL-10 (Figura 4B) por ELISA foram analisados.

As células infectadas com a cepa NcLiv Δ *gra48* apresentaram uma redução significativa na produção de IL-12p40 (Figura 4A) e IL-10 (Figura 4B) após 24 horas de infecção. Em adição, ao analisar a relação de IL-12p40 com IL-10 observamos que a cepa WT possui um perfil mais inflamatório (Figura 4C), enquanto a depleção de *gra48* reduz citocina pró-inflamatória e imunoregulatória. Ainda, como esperado, a infecção com *N. caninum* induziu a produção das citocinas IL-12p40 (Figura 4A) e IL-10 (Figura 4B) nos macrófagos, quando comparada ao grupo não-infectado.

Desse modo, nossos dados sugerem que GRA48 tem um papel na indução de citocinas durante a infecção de *N. caninum*.

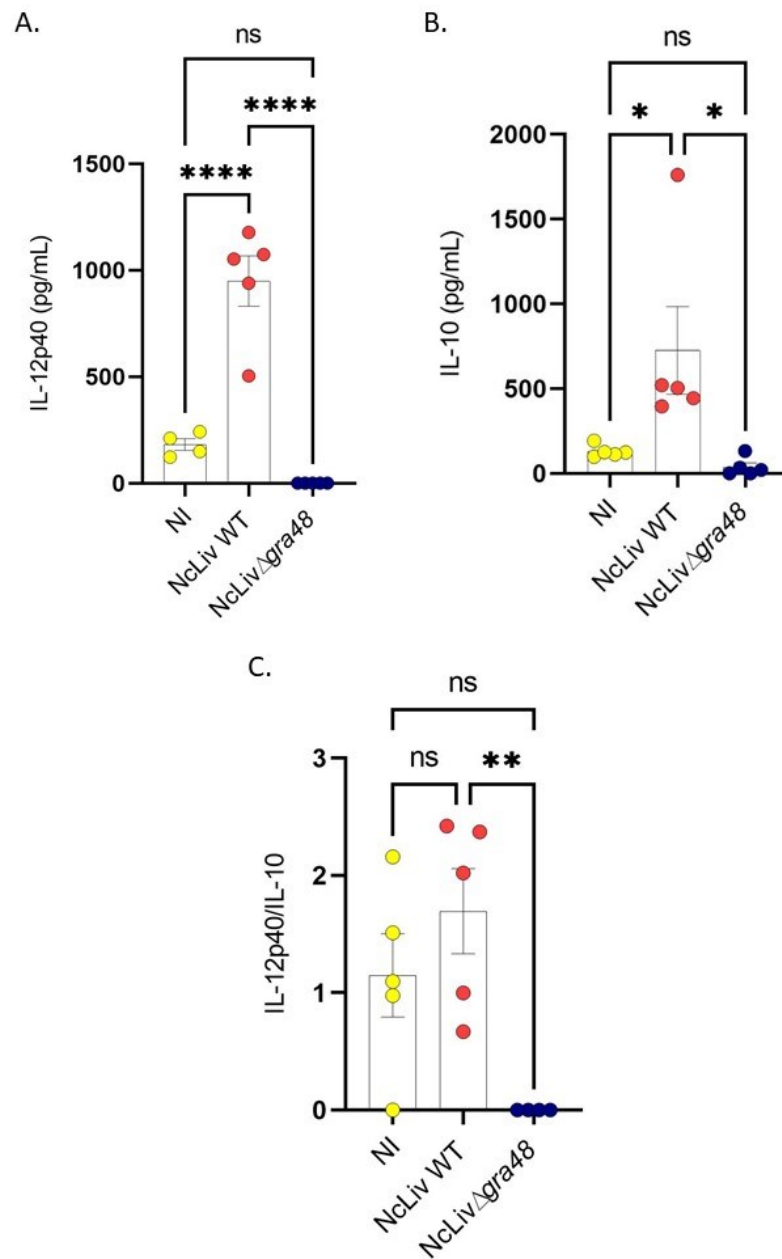


Figura 4: Influência da GRA48 de *N. caninum* na produção de citocinas *in vitro*. (A) Produção de IL-12p40 e (B) IL-10 no sobrenadante de BMDMs infectados com NcLiv (WT), NcLiv Δ gra48 ou não-infectados (NI). (C) A razão entre IL-12p40/IL-10 também é demonstrada. Sobrenadantes de cultura foram coletados e analisados após 24 horas de infecção. Dados são expressos como média \pm desvio padrão. *indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

N. caninum é o causador da neosporose, sendo reconhecido como importante causa de doenças neuromusculares em cães e aborto em bovinos em todo o mundo. Portanto, esses abortos provocam um sério impacto econômico nas indústrias de corte e de leite (Reichel; Ellis, 2009).

De modo a controlar eficazmente a neosporose, é essencial entender o parasito e os mecanismos imunológicos utilizados por ele. Com esse objetivo, o presente trabalho buscou avaliar o papel da proteína de grânulo denso 48 (GRA48) de *N. caninum* na modulação da resposta imunológica e infecção de camundongos em testes *in vivo* e *in vitro*, com o intuito de estabelecer uma melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro. As GRAs são proteínas secretoras importantes para a patogênese de *T. gondii* e *N. caninum*, e têm sido amplamente estudadas em ambos os parasitas. Trabalhos nos últimos anos estabeleceram que as proteínas GRA são essenciais para a invasão e manutenção de *N. caninum*, modulando a resposta imune à infecção, um processo vital para a sobrevivência do parasita, mas os mecanismos subjacentes são ainda pouco compreendidos (Fereig; Nishikawa, 2020). Um estudo recente demonstrou que várias proteínas de GRA da cepa Nc-1 de taquizoítos de *N. caninum* possuem atividade imunoprotetora em camundongos (Wang *et al.*, 2021), dessa forma essas proteínas parecem ser capazes de reduzir a carga parasitária e melhorar a resposta imune à infecção.

Os resultados do presente trabalho sugerem que GRA48 de *N. caninum* tem um papel importante durante a infecção crônica, pois os animais com NcLiv depletados geneticamente para *gra48* reduz significativamente a carga parasitária. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que mostraram que *gra48* de *Toxoplasma gondii* também é mais expressa durante a infecção crônica (Pittman; Aliota; Knoll, 2014). Pittman e colaboradores (2014) por análise de transcriptoma demonstram que *gra48* de *T. gondii* (TGME49_267740) é mais expresso durante a infecção crônica corroborando com os dados *in vivo* ter fenótipo somente durante a fase crônica da infecção.

A perda de peso é um sintoma comum da infecção por *N. caninum*, que pode ser causada por uma combinação de fatores, incluindo: ataque direto do parasita às células do hospedeiro, ativação do sistema imunológico e alterações no metabolismo. A menor perda de peso observada na cepa NcLiv Δ *gra48* sugere que a proteína GRA48 pode estar envolvida na perda de peso associada à infecção por *N. caninum*. A proteína GRA48 é uma proteína secretada pelo parasita que pode estar interagindo e modulando o sistema imunológico do hospedeiro. A

ausência da proteína *gra48* em *N. caninum* pode estar modulando a ativação do sistema imunológico promovendo um ambiente menos inflamatório e, conseqüentemente, reduzindo perda de peso. Pois, *N. caninum* induz uma exacerbação inflamatória que podem estar relacionadas as características imunopatológicas da doença (Mota *et al.*, 2020). Adicionalmente, a menor carga parasitária observada na cepa NcLiv Δ *gra48* sugere que a proteína GRA48 pode estar envolvida na replicação e na biologia do parasita. Porém, mais experimentos são necessários para confirmar a hipótese de que a proteína GRA48 está envolvida na replicação do parasita.

As citocinas IL-12 e IFN- γ foram identificadas como essenciais para a imunidade protetora contra a infecção por *N. caninum* (Zhang *et al.*, 2022). Os resultados do presente estudo indicam que a cepa NcLiv Δ *gra48* apresentou menor produção de IFN- γ em células do lavado peritoneal do que os camundongos do grupo WT. IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que pode estimular a ativação de macrófagos e células T, e ajuda a matar células infectadas. A menor produção de IFN- γ na cepa NcLiv Δ *gra48* sugere que a proteína GRA48 pode estar envolvida na regulação da resposta imune inata contra *N. caninum*. A proteína GRA48 pode induzir a produção de IFN- γ , o que pode levar a uma exacerbação a resposta imune durante infecção. No entanto, é importante notar que os resultados do presente estudo são preliminares e mais pesquisas são necessárias para confirmar a hipótese de que a proteína GRA48 está envolvida na regulação da resposta imune inata contra *N. caninum* e outros tempos de infecção devem ser melhor analisados.

Para avaliar o perfil de citocinas *in vitro*, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) infectados com os parasitos NcLiv*gra48* e NcLiv WT demonstraram que a produção de IL-12p40 nas culturas de macrófagos infectados com o parasita deficiente em NcGRA48 foi significativamente menor do que nas culturas de células infectadas com o parasita selvagem (NcLiv WT). Esses resultados estão em concordância com os achados de um estudo, em que foi demonstrado que o NcGRA7 ativa de forma robusta as vias de sinalização do hospedeiro, como as vias Toll-like receptor (TLR) e de reconhecimento de padrões (PRR), especialmente a produção de citocinas e quimiocinas. Em macrófagos, a produção da citocina inflamatória IL-12p40 é regulada pelo NcGRA7 (Nishikawa *et al.*, 2018).

Desse modo, nossos dados sugerem que NcGRA48 tem um papel na biologia do parasita e pode modular a resposta imune do hospedeiro a seu favor. Além disso, mais estudos são necessários para melhor avaliar o papel de GRA48 na biologia do parasito *N. caninum* e perfil de citocinas durante a infecção por *N. caninum*.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que a proteína de grânulo denso 48 (GRA48) de *N. caninum* desempenha um papel durante a infecção *in vivo* e *in vitro*. As GRAs são conhecidas por serem proteínas secretoras importantes para a patogênese de *T. gondii* e *N. caninum*, e este estudo contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes envolvidos nesse processo.

Em suma, o estudo demonstrou que a ausência de GRA48 resultou em uma diminuição da virulência do parasita em camundongos, evidenciando a relevância do GRA48 na patogênese da neosporose. No entanto, ainda há muitos aspectos a serem explorados, e pesquisas adicionais são necessárias para uma compreensão completa dos mecanismos subjacentes a esses efeitos.

8. REFERÊNCIAS

- ANGHEL, Nicoleta *et al.* Endochin-like quinolones (ELQs) and bumped kinase inhibitors (BKIs): Synergistic and additive effects of combined treatments against *Neospora caninum* infection in vitro and in vivo. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S. l.], v. 17, p. 92–106, 2021. DOI: 10.1016/J.IJPDDR.2021.08.007.
- 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**, [S. l.], v. 276, p. 108990, 2019. DOI: 10.1016/J.VETPAR.2019.108990.
- BUXTON, David; MCALLISTER, Milton M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 546–552, 2002. DOI: 10.1016/S1471-4922(02)02414-5.
- CARDOSO, Mariana R. D. *et al.* ArtinM, a d-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**, [S. l.], v. 29, n. 49, p. 9183–9193, 2011. DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.09.136.
- CERQUEIRA-CÉZAR, Camila Koutsodontis; CALERO-BERNAL, Rafael; DUBEY, Jitender Prakash; GENNARI, Solange Maria. All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 253–279, 2017. DOI: 10.1590/S1984-29612017045.
- CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. E.; GONDIM, L. F. P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 103, n. 3, p. 195–202, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00600-8.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 1, 2003. DOI: 10.3347/KJP.2003.41.1.1.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 323–367, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00031-06/ASSET/7C519195-D832-41FC-A9E6-45C2A6E34735/ASSETS/GRAPHIC/ZCM0020722030003.JPEG.
- 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**, [S. l.], v. 9, n. 5, 2020. DOI: 10.3390/PATHOGENS9050384.
- FEREIG, Ragab M.; OMAR, Mosaab A.; ALSAYEQH, Abdullah F. Exploiting the Macrophage Production of IL-12 in Improvement of Vaccine Development against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Infections. **Vaccines**, [S. l.], v. 10, n. 12, 2022. DOI: 10.3390/VACCINES10122082.

GARCÍA-SÁNCHEZ, Marta; JIMÉNEZ-PELAYO, Laura; HORCAJO, Pilar; COLLANTES-FERNÁNDEZ, Esther; ORTEGA-MORA, Luis Miguel; REGIDOR-CERRILLO, Javier. Neospora caninum infection induces an isolate virulence-dependent pro-inflammatory gene expression profile in bovine monocyte-derived macrophages. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/S13071-020-04239-3.

GÜNTHER, Juliane; SEYFERT, Hans Martin. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 555, 2018. DOI: 10.1007/S00281-018-0701-1.

KHAN, Asis; SHAIK, Jahangheer S.; SIKORSKI, Patricia; DUBEY, Jitender P.; GRIGG, Michael E. Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. **Engineering**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 10–19, 2020. DOI: 10.1016/J.ENG.2019.02.010.

LEINEWEBER, Margret; SPEKKER-BOSKER, Katrin; INCE, Vanessa; SCHARES, Gereon; HEMPHILL, Andrew; ELLER, Silvia K.; DÄUBENER, Walter. First Characterization of the Neospora caninum Dense Granule Protein GRA9. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/6746437.

LI, Wensheng; LIU, Jing; WANG, Jing; FU, Yong; NAN, Huizhu; LIU, Qun. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in Neospora caninum. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 114, n. 8, p. 2893–2902, 2015. DOI: 10.1007/S00436-015-4490-3/FIGURES/5.

LIMA, Tatiane S.; LODOEN, Melissa B. Mechanisms of human innate immune evasion by Toxoplasma gondii. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. MAR, p. 103, 2019. DOI: 10.3389/FCIMB.2019.00103/BIBTEX.

LINDSAY, David S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 205–222, 2020. DOI: 10.1016/J.CVFA.2019.11.004.

LIU, Gongzhen; CUI, Xia; HAO, Pan; YANG, Daoyu; LIU, Jing; LIU, Qun. GRA 14, a novel dense granule protein from Neospora caninum. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, [S. l.], v. 45, n. 7, p. 607–609, 2013. DOI: 10.1093/ABBS/GMT036.

MANCA, Raffaella; CICCARESE, Giuseppina; SCALTRITO, Domenico; CHIRIZZI, Daniela. Detection of Anti-Neospora caninum Antibodies on Dairy Cattle Farms in Southern Italy. **Veterinary Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2022. DOI: 10.3390/VETSCI9020087.

MARIM, Fernanda M.; SILVEIRA, Tatiana N.; LIMA, Djalma S.; ZAMBONI, Dario S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PloS one**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 1–8, 2010. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0015263.

MARUGAN-HERNANDEZ, V. Neospora caninum and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 157, n. 2–3, p. 193–200, 2017. DOI: 10.1016/J.JCPA.2017.08.001.

MINEO, Tiago W. P.; CHERN, Jessica H.; THIND, Amara C.; MOTA, Caroline M.; NADIPURAM, Santhosh M.; TORRES, Juan A.; BRADLEY, Peter J. Efficient Gene Knockout and Knockdown Systems in *Neospora caninum* Enable Rapid Discovery and Functional Assessment of Novel Proteins. **mSphere**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2022. DOI: 10.1128/msphere.00896-21.

MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 127, n. 2, p. 87–97, 2005. DOI: 10.1016/J.VETPAR.2004.10.001.

MOTA, Caroline M. et al. *Neospora caninum* Activates p38 MAPK as an Evasion Mechanism against Innate Immunity. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. SEP, 2016. DOI: 10.3389/FMICB.2016.01456.

MOTA, Caroline M. et al. Interplay Between Reactive Oxygen Species and the Inflammasome Are Crucial for Restriction of *Neospora caninum* Replication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 512712, 2020. DOI: 10.3389/FCIMB.2020.00243/BIBTEX.

NAZARI, Naser; KHODAYARI, Mohammad Taghi; HAMZAVI, Yazdan; RAEGHI, Saber; KARAMATI, Seyed Ahmad; FALAHI, Shahab; BOZORGOMID, Arezoo; SAJEDI, Mohammad Taha. Systematic Review and Meta-analysis of Role of Felids as Intermediate Hosts in the Life Cycle of *Neospora caninum* Based on Serological Data. **Acta Parasitologica**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 266–276, 2023. DOI: 10.1007/S11686-023-00661-6/FIGURES/5.

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, 2018. DOI: 10.1128/AEM.01350-18.

PITTMAN, Kelly J.; ALIOTA, Matthew T.; KNOLL, Laura J. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–19, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-806/TABLES/6.

REICHEL, Michael P.; ELLIS, John T. *Neospora caninum* – How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 1173–1187, 2009. DOI: 10.1016/J.IJPARA.2009.05.007.

SILVA, Rodrigo C.; MACHADO, Gustavo P. Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. **Veterinary Medicine : Research and Reports**, [S. l.], v. 7, p. 59, 2016. DOI: 10.2147/VMRR.S76969.

SNAK, Alessandra; GARCIA, Felipe Gustavo; LARA, Arielle Aparecida; PENA, Hilda Fátima Jesus; OSAKI, Silvia Cristina. *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 51–59, 2018. DOI: 10.1590/S1984-29612018001.

TEDLA, Mebrahtu G.; EVERY, Alison L.; SCHEERLINCK, Jean Pierre Y. Investigating immune responses to parasites using transgenesis. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1186/S13071-019-3550-4/TABLES/1.

VELÁSQUEZ, Zahady D.; ROJAS-BARÓN, Lisbeth; LARRAZABAL, Camilo; SALIERMO, Marcelo; GÄRTNER, Ulrich; PERVIZAJ-ORUQAJ, Lerta; HEROLD, Susanne; HERMOSILLA, Carlos; TAUBERT, Anja. Neospora caninum Infection Triggers S-phase Arrest and Alters Nuclear Characteristics in Primary Bovine Endothelial Host Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 10, p. 1, 2022. DOI: 10.3389/FCELL.2022.946335/FULL.

VENTUROSO, Poliana de Jesus Souza *et al.* Risk factor analysis associated with *Neospora caninum* in dairy cattle in Western Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. e023020, 2021. DOI: 10.1590/S1984-296120201088.

WAHAB, Tara; EDVINSSON, Benjamin; PALM, Daniel; LINDH, Johan. Comparison of the AF146527 and B1 Repeated Elements, Two Real-Time PCR Targets Used for Detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 591, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01113-09.

WANG, Fei; WANG, Xianmei; SONG, Xingju; MA, Lei; YANG, Jing; LIU, Qun; LIU, Jing. Function of *Neospora caninum* dense granule protein 7 in innate immunity in mice. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 120, n. 1, p. 197–207, 2021. DOI: 10.1007/S00436-020-06961-4/FIGURES/5.

WANG, Peiyan *et al.* The GRA15 protein from *Toxoplasma gondii* enhances host defense responses by activating the interferon stimulator STING. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 294, n. 45, p. 16494, 2019. DOI: 10.1074/JBC.RA119.009172.

WANG, Weirong; GONG, Pengtao; WANG, Pu; DONG, Jingquan; WANG, Xiaocen; YANG, Zhengtao; LI, Jianhua; ZHANG, Xichen. A novel dense granule protein NcGRA23 in *Neospora caninum*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, [S. l.], v. 50, n. 7, p. 727–729, 2018. DOI: 10.1093/ABBS/GMY054.

ZHANG, Xu *et al.* *Neospora caninum* Evades Immunity via Inducing Host Cell Mitophagy to Inhibit Production of Proinflammatory Cytokines in a ROS-Dependent Manner. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 13, p. 827004, 2022. DOI: 10.3389/FIMMU.2022.827004/FULL.

ANEXO I



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
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 **11 de Outubro de 2022**.

(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 october 11th, 2022).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 31/12/2023
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	REBIR - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Alteração Realizada: Alteração na data término de 31/12/2022 para 31/12/2023.

Uberlândia, 11 de outubro de 2022.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Comissão de Ética na Utilização de Animais
 Coordenador da CEUA
 Portaria R.Nº 3151/2022