



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

ARTHUS LUIZ FERREIRA

**EDIÇÃO GENÔMICA POR CRISPR/Cas9 APLICADA À
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA
PROTEÍNA DE GRÂNULO DENSO 5 DE *Neospora caninum***

Uberlândia
2026

ARTHUS LUIZ FERREIRA

**EDIÇÃO GENÔMICA POR CRISPR/Cas9 APLICADA À
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA
PROTEÍNA DE GRÂNULO DENSO 5 DE *Neospora caninum***

Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II) apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), como parte das obrigatoriedades para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Parasitologia e Biologia Molecular.

Discente: Arthus Luiz Ferreira.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo.

Coorientador: Dr. Jhoan David Aguillón Torres.

ARTHUS LUIZ FERREIRA

**EDIÇÃO GENÔMICA POR CRISPR/Cas9 APLICADA À
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA
PROTEÍNA DE GRÂNULO DENSO 5 DE *Neospora caninum***

Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II)
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Biomedicina, do Instituto de
Ciências Biomédicas, da Universidade
Federal de Uberlândia (UFU), como parte
das obrigatoriedades para obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Parasitologia e
Biologia Molecular.

Uberlândia, 6 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo – Orientador (UFU)

Dr^a. Mariana Ferreira Silva (Universidade de Glasgow)

Prof. Dr. Samuel Cota Teixeira (UFU)

Uberlândia
2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me concedido saúde, força, discernimento, perseverança e amparo espiritual ao longo de toda minha trajetória, especialmente nos momentos de maior desafio, tornando possível a conclusão deste trabalho.

À minha família, Amilson, Roneide, Arthur, Monnara, Monnalisa, Amilton, Olidia e Maria do Carmo, que do céu ilumina meus caminhos, expresso a minha profunda gratidão pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, pela paciência, por todos os incentivos, investimentos e sacrifícios realizados para eu pudesse concluir mais essa etapa, vocês são meu alicerce. À minha namorada Júlia, agradeço o companheirismo, a compreensão e o apoio incondicional ao longo da minha jornada, obrigado por estar comigo nos momentos de dificuldade e de conquista.

Às minhas amigas de graduação, Angélica e Rafaela, agradeço a parceria, amizade e troca de conhecimento durante todo o curso. Caminhar ao lado de vocês tornou essa trajetória mais leve, enriquecedora e significativa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, expresso meus sinceros agradecimentos pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela oportunidade concedida, pela orientação segura e rigorosa que tanto contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

Registo um agradecimento especial ao meu coorientador, Dr. Jhoan David Aguillón Torres, cuja dedicação, disponibilidade, conhecimento técnico e orientação criteriosa foram determinantes para o desenvolvimento e a execução deste trabalho. Obrigado David, por todos os puxões de orelha, pela cobrança e por acreditar em mim.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Ruth, Melissa, Jotinha, Luís Felipe, Beatriz, Tayane, Shiraz, Marya, Eduardo, Higor e Isabel, agradeço o convívio diário, a colaboração, as discussões científicas, o apoio técnico e pelos encontros alegres, que contribuíram de forma direta para realização desse trabalho e para meu enriquecimento pessoal.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), ao Laboratório de Imunoparasitologia "Dr. Mário Endsfeldz Camargo", e aos técnicos que o integram, expresso meus sinceros agradecimentos pela infraestrutura, pelo suporte e pelas primorosas condições de trabalho oferecidas, que foram fundamentais para a existência desse trabalho.

*“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa
inesgotável fonte de magia. Capazes de formar grandes
sofrimentos e também de remediá-los. Não tenha pena
dos mortos. Tenha pena dos vivos, e acima de tudo,
daqueles que vivem sem amor.”*

(Alvo Percival Wulfrico Brian Dumbledore)

*“O fardo é proporcional às forças, como a recompensa
será proporcional à resignação e à coragem.”*

(Allan Kardec)

RESUMO

Identificado em 1988, *Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa. É o agente etiológico da neosporose, responsável por provocar abortos em bovinos e disfunções neuromusculares em cães. Seu ciclo de vida é heteroxênico, envolvendo a transmissão horizontal por meio da ingestão de oocistos não esporulados, liberados nas fezes de canídeos, bem como de cistos teciduais infectados, e a transmissão vertical por meio da passagem transplacentária de taquizoítos. Dentre dezenas de proteínas que participam do processo de invasão, destacam-se as proteínas de grânulos densos (GRAs), pois atuam no ciclo lítico do parasito, na aquisição de nutrientes e/ou na modulação da resposta imune do hospedeiro. Embora tenham reconhecida relevância, as GRAs de *N. caninum* ainda carecem de uma caracterização aprofundada, o que evidencia a necessidade de investigações adicionais com essa perspectiva. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a proteína de grânulo denso 5 (GRA5) de *N. caninum*. Para identificar e localizar esta proteína pela primeira vez, realizamos uma modificação genética por meio de CRISPR/Cas9 na região codificadora de NcGRA5 que induziu a expressão de 3 epítópos de hemaglutinina viral na porção C-terminal. Com esta linhagem de parasitos modificados identificamos que NcGRA5 tem um padrão de distribuição no vacúolo parasitóforo típico de uma GRA. Além disso, nossos dados estimam que os dímeros de NcGRA5 possuem pesos moleculares de aproximadamente 32 kDa e 26 kDa. Com a intenção de estudar a função biológica desta proteína, geramos parasitos geneticamente deficientes para NcGRA5. Avaliamos a capacidade de replicação de parasitos Δgra5 em comparação com a linhagem parental, por meio de ensaios de placas em fibroblastos HFF. A deleção do gene NcGRA5 reduziu significativamente a replicação do parasito *in vitro*, pois houve uma diminuição no número de placas de lises formadas nas monocamadas de fibroblastos, em comparação aos parasitos parentais. Nesse cenário, nossa pesquisa amplia o conhecimento sobre as proteínas de grânulos densos de *N. caninum*, demonstrando que a proteína está envolvida na capacidade replicativa do parasito, tornando NcGRA5 um possível alvo para estudos futuros voltados ao controle da infecção.

PALAVRAS CHAVES: CRISPR/Cas9, *Neospora caninum*, GRAs.

ABSTRACT

Identified in 1988, *Neospora caninum* is an obligate intracellular parasite belonging to the phylum Apicomplexa. It is the etiological agent of neosporosis, a disease responsible for causing abortions in cattle and neuromuscular disorders in dogs. Its life cycle is heteroxenous, involving horizontal transmission through the ingestion of non-sporulated oocysts shed in the feces of canids, as well as infected tissue cysts, and vertical transmission via the transplacental passage of tachyzoites. Among the dozens of proteins involved in the invasion process, dense granule proteins (GRAs) stand out due to their roles in the parasite's lytic cycle, nutrient acquisition, and/or modulation of the host immune response. Although they are of recognized relevance, the GRAs of *N. caninum* still lack in-depth characterization, highlighting the need for further investigations from this perspective. The aim of this study was to identify and characterize the dense granule protein 5 (GRA5) of *N. caninum*. To identify and localize this protein for the first time, we performed a genetic modification using CRISPR/Cas9 targeting the NcGRA5 coding region, which induced the expression of three viral hemagglutinin epitopes at the C-terminal portion of the protein. Using this genetically modified parasite line, we demonstrated that NcGRA5 displays a distribution pattern within the parasitophorous vacuole that is typical of dense granule proteins. In addition, our data estimate that NcGRA5 dimers have approximate molecular weights of 32 kDa and 26 kDa. In order to investigate the biological function of this protein, we generated parasites genetically deficient in NcGRA5. The replication capacity of Δ gra5 parasites was evaluated in comparison with the parental strain using plaque assays in HFF fibroblasts. Deletion of the NcGRA5 gene significantly reduced parasite replication *in vitro*, as evidenced by a decrease in the number of lytic plaques formed on fibroblast monolayers compared with parental parasites. In this context, our findings expand current knowledge on dense granule proteins of *N. caninum*, demonstrating that this protein is involved in the parasite's replicative capacity and highlighting NcGRA5 as a potential target for future studies aimed at infection control.

KEYWORDS: CRISPR/Cas9, *Neospora caninum*, GRAs.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1.	<i>Neospora caninum</i>	10
1.2.	Ciclo biológico	10
1.3.	Proteínas de grânulos densos	12
2.	JUSTIFICATIVA	14
3.	OBJETIVOS.....	15
3.1.	Objetivo geral.....	15
3.2.	Objetivos específicos	15
4.	METODOLOGIA	16
4.1.	Análises <i>in silico</i>	16
4.2.	Cultura de parasitos	16
4.3.	Geração de parasitos geneticamente modificados	17
4.3.1.	<i>Desenho, Anelamento de gRNAs e Ligação ao vetor</i>	17
4.3.2.	<i>Transformação de bactérias termocompetentes</i>	17
4.3.3.	<i>Purificação de vetores</i>	17
4.3.4.	<i>Preparação do DNA de reparo com braços de homologia</i>	18
4.3.5.	<i>Purificação do DNA de reparo por Fenol-Clorofórmio</i>	18
4.3.6.	<i>Eletroporação de parasitos</i>	19
4.4.	Imunofluorescência.....	20
4.5.	Western Blotting	20
4.6.	Ensaio de placa.....	21
4.7.	Análise estatística	22
5.	RESULTADOS	23
5.1.	Predição <i>in silico</i> : o que revela os ensaios de bioinformática	23
5.2.	Caracterização proteica e análise de seu papel no ciclo lítico do parasito	29
6.	DISCUSSÃO.....	31

7.	CONCLUSÃO	34
8.	ANEXOS	35
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Neospora caninum*

Bjerkås e colaboradores descreveram, em 1984, por meio de um relato de caso, a existência de um protozoário não identificado em uma ninhada de 6 filhotes, nascidos de uma cadela boxer na Noruega, infectados congenitamente, que apresentavam miosite e encefalite (DUBEY et al., 2017). Após alguns anos, dada a ausência de respostas concretas do relatório de (BJERKÅS et al., 1984), Jitender Prakash Dubey tomado por sua curiosidade, examinava junto de James Carpenter milhares de lâminas de cães e de gatos que morreram de doença semelhante a toxoplasmose, minunciosamente registradas nos arquivos do Angell Memorial Animal Hospital (AMAH) em Boston (EUA), e concluíram que o protozoário não identificado por Bjerkås não se tratava de *Toxoplasma gondii*. Além dos sintomas neuromusculares, cardíacos, pulmonares e a não reação a testes imuno-histoquímicos contra anticorpos de *T. gondii*, a presença de cistos teciduais de parede espessa com até 4 µm foi característica identificadora, inspirando na nomeação do organismo como *Neospora caninum*, um novo gênero e espécie (DUBEY et al., 1988).

A descoberta de *N. caninum* foi um marco, pois até 1988 a neosporose era equivocadamente diagnosticada como toxoplasmose, dada a grande semelhança estrutural, molecular e antigênica com *T. gondii* (DUBEY et al., 2017). *N. caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, que pertence ao filo Apicomplexa e à família Sarcocystidae, desde a sua descoberta esse parasito tem se destacado como um patógeno de relevância veterinária, principalmente em bovinos, onde está associado a perdas econômicas significativas na indústria pecuária, uma vez que ele é responsável por indução de abortos e morte nesses animais (IBRAHIM; SANDER, 2022).

1.2. Ciclo biológico

Esse parasito possui um ciclo heteroxênico (Figura 1), portanto, precisa de mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, que envolve formas parasitárias sexuadas e assexuadas, e a transmissão pode ser horizontal e/ou vertical. *N. caninum* tem como hospedeiros definitivos espécies da família Canidae, como *Canis familiaris*, *C. lupus* e *C. latrans*, que podem albergar a forma sexuada do parasito em seu intestino. Em contrapartida, existe uma infinidade de hospedeiros intermediários, como: felinos, suínos, bovinos, ovinos,

caprinos, entre outros, em que o parasito se replica exclusivamente de forma assexuada (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Resumidamente, o ciclo de transmissão horizontal inicia-se com oocistos não esporulados de parede espessa, liberados nas fezes de canídeos infectados por *N. caninum*. Sob condições ideais de umidade, temperatura e oxigênio, esses oocistos passam por um processo de esporogonia, dando origem a um oocisto esporulado, que contém, em seu interior, dois esporocistos, compostos por quatro esporozoítos (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Nesse estágio, os hospedeiros intermediários ao ingerir esses oocistos esporulados por meio de água ou alimentos contaminados servirão de reservatórios de parasitos em estágio de latência até serem predados por canídeos, que iniciarão novo ciclo sexuado (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

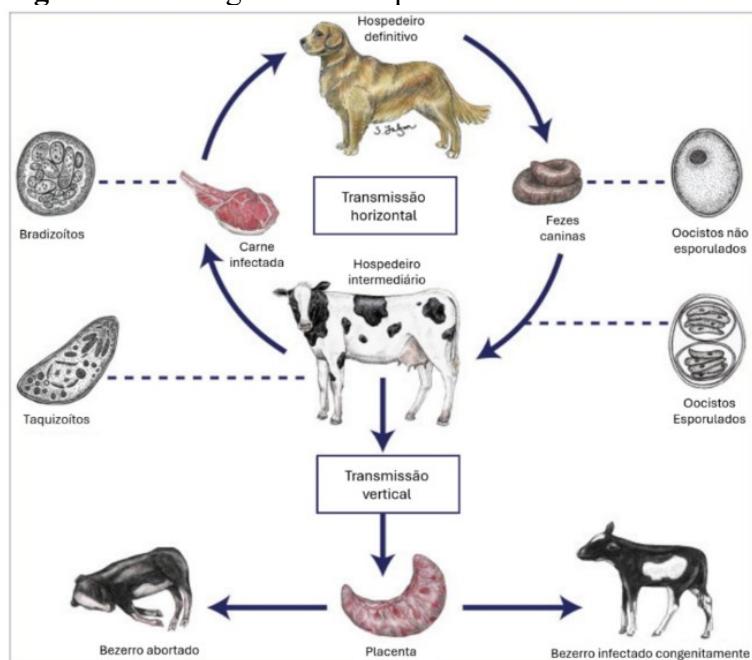
Os taquizoítos se replicam rapidamente para invadir a célula hospedeira, estabelecendo um primeiro contato de baixa afinidade com a membrana da célula hospedeira, por meio de glicoproteínas de superfície (SAGs), destacando-se principalmente SAG1 e SRS2 (Hemphill et al., 2013). Uma vez estabelecido esse primeiro contato, organelas especializadas como Micronemas (MICs) secretam proteínas que estabelecerão a adesão do parasito à célula. Em sequência, Roptrias (ROPs) irão liberar proteínas relacionadas com o processo de invasão, e proteínas de grânulos densos (GRAs) serão secretadas para a formação do vacúolo parasitóforo (VP), onde os taquizoítos de *N. caninum* se multiplicarão por um processo chamado de endodiogenia, até causarem a lise celular, completando assim o ciclo lítico. Essa forma evolutiva tem potencial de infectar vários tipos celulares, desde células musculares e hepáticas até células neuronais, sendo uma forma de disseminação sistêmica rápida (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; Hemphill et al., 2013; DUBEY et al., 2017).

Para evadir das pressões causadas pelo sistema imune do hospedeiro mediadas principalmente por IFN- γ , estresse metabólico e oxidativo, *N. caninum* faz uma muda de taquizoíto para bradizoíto, essa é uma forma evolutiva de replicação lenta, que se aloja em tecido nervoso e musculoesquelético dos hospedeiros, nesses podendo existir por longos períodos sem causar qualquer manifestação clínica garantindo a persistência crônica do parasito (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; DUBEY et al., 2017). Esses cistos teciduais podem ser ingeridos por hospedeiros definitivos, resultando na liberando desses bradizoítos no intestino, os quais ao invadir as células epiteliais se diferenciam em esquizontes, esses originam os merozoítos que, posteriormente, se diferenciam em microgametas (masculinos) e macrogametas (femininos). Após a fecundação ocorrerá a formação do zigoto, esse desenvolverá uma parede espessa originando assim os oocistos não esporulados que serão

eliminados nas fezes dos canídeos (DUBEY et al., 2002; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; DUBEY et al., 2017).

A transmissão vertical de *N. caninum* ocorre principalmente em vacas, cadelas, ovelhas, cabras, porcas, gatas e outros animais. Nesse tipo de transmissão, os taquizoítos transpassam a placenta e infectam o feto. Essa transmissão pode ocorrer em infecções adquiridas no pós-natal, por meio da ingestão de oocistos (exógena) ou pela reativação da infecção em um animal cronicamente infectado (endógena) (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; DUBEY et al., 2017).

Figura 1 - Ciclo geral da neosporose



Fonte: Adaptado de GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013.

1.3. Proteínas de grânulos densos

Embora já se tenha na literatura a identificação de algumas GRAs de *N. caninum*, há ainda inúmeras proteínas originárias desta organela que precisam ainda ser descritas. Além disso, a elucidação quanto às suas funções biológicas foi pouco explorada até o momento (Yang C et al., 2021). Hoje, sabe-se que das poucas GRAs conhecidas e descritas, a maioria estão relacionadas ao VP, desempenhando um papel importante na biogênese e maturação do mesmo, além de atuar na troca/transporte de nutrientes, como é o caso de NcGRA17 que foi descrita como uma proteína determinante para a regulação da morfologia do VP, ou ainda GRA5 de *Toxoplasma gondii*, proteína que está intimamente relacionada com a manutenção estrutural do VP (Yang C et al., 2018; Panas e Boothroyd, 2021; Lecordier et al., 1999). Algumas GRAs

têm a capacidade de se transportar para o citoplasma ou para o núcleo do hospedeiro por meio da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) como ocorre com GRA16 de *T. gondii* que, ao ser exportada e atingir o núcleo da célula hospedeira, modula positivamente genes envolvidos no ciclo celular e na via tumoral p53 (Bougdour A et al., 2013). Ainda, existem GRAs que desempenham um papel na modulação imunológica, como NcGRA14 e TgGRA5, sendo a primeira descrita como uma proteína capaz de induzir respostas imunes estimulando a expressão de citocinas que ativam vias de sinalização MAPK, AKT e NF-KB, enquanto a segunda tem a capacidade de reduzir a virulência e elevar a produção de anticorpos, citocinas, e infiltrados leucocitários *in vivo* (Li S et al., 2019; CHEN et al., 2023).

Das GRAs descritas para *N. caninum*, desatacam-se algumas: NcGRA7 é uma proteína cuja ausência em *N. caninum* reduz a virulência em camundongos, além de desempenhar uma modulação na produção de citocinas e quimiocinas em cultura de macrófagos (Nishikawa Y et al., 2018); NcGRA9 é liberada no interior do VP após a invasão na célula hospedeira, contudo associa-se posteriormente à rede intravacuolar; NcGRA27, NcGRA61 e NcGRA85, recentemente descritas e caracterizadas funcionalmente por Lu et al. (2024), que apontaram para uma associação de NcGRA27 com o papel de replicação e virulência *in vitro* e *in vivo*, ao passo que NcGRA61 e NcGRA85 não afetaram a replicação *in vitro*, tão pouco a virulência *in vivo*.

Dada a importância das GRAs na manutenção do parasitismo intracelular, é importante identificar novas proteínas e determinar suas funções no crescimento e patogênese de *N. caninum*. Sendo assim, tais proteínas tornam-se alvos atrativos para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que podem estar diretamente relacionadas ao processo de sucesso do parasitismo. Dessa forma, a caracterização das proteínas de grânulos densos, bem como a compreensão de suas funções biológicas são fundamentais como possíveis alvos de desenvolvimento para terapêuticas e controle.

Ainda, diante do contexto apresentado no qual TgGRA5 se destaca como uma proteína envolvida na manutenção estrutural do vacúolo parasitóforo, associada à redução da virulência *in vivo* e à ativação da resposta imune, evidenciando seu potencial como alvo vacinal, tornou-se relevante investigar seu ortólogo NcGRA5 em *Neospora caninum* (CHEN et al., 2023). Além de permitir verificar potenciais erros de anotação presentes na base de dados do ToxoDB, onde o gene codificante de NcGRA5 é anotado como NcLiv_014150, essa abordagem pode revelar mecanismos conservados na interação parasito-hospedeiro, contribuindo para a identificação de NcGRA5 como um alvo promissor para desenvolvimento de estratégias imunoprofiláticas, à semelhança do seu ortólogo em *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA

A neosporose é uma doença de caráter global, que gera grandes impactos na saúde animal e, principalmente, no setor econômico, onde essa doença causa transtornos reprodutivos em bovinos, tendo relação com a morte do feto infectado ou na substituição de vacas soropositivas e a diminuição da produção de carne e leite. Estima-se que as médias de perdas econômicas anuais globais ultrapassam a casa dos bilhões de dólares, sendo dois terços associados à indústria do laticínio. No Brasil, o prejuízo causado pela neosporose varia de US\$ 63,6 a US\$ 111,7 milhões na indústria de carne, enquanto na indústria do laticínio fica entre US\$ 35,8 e US\$ 111,3 milhões (Reichel et al., 2013), contudo o senso comum sugere que o impacto econômico é subestimado pela falta de diagnóstico corriqueiro.

Entender os mecanismos biológicos que estão por trás da interação parasito-hospedeiro, como a secreção de proteínas de grânulos densos e regulação da resposta imune do hospedeiro, principalmente aspectos relacionados aos mecanismos inatos e adaptativos, podem fornecer informações fundamentais para a compreensão dessa patologia, nos aproximando de soluções que minimizem o impacto causado sobre a indústria de carnes e laticínio.

Nesse sentido, a investigação do papel dessas proteínas de grânulos densos secretadas pelo *N. caninum* na infecção se faz extremamente necessária para a compreensão da biologia do parasito, podendo assim elucidar mecanismos de invasão, replicação e controle. Esses, associados ao entendimento dos mecanismos imunológicos podem ser fundamentais para o desenvolvimento de protocolos vacinais ou profilaxia contra este parasito, tornando a compreensão da neosporose mais robusta.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar a localização e caracterizar funcionalmente a proteína de grânulo denso 5 (NcGRA5) codificada pelo gene NcLiv_014150 em *N. caninum*, por meio de ferramentas de bioinformática, técnicas de edição genômica como CRISPR/Cas9 e ensaios em cultivo celular.

3.2. Objetivos específicos

- a.** Predizer por meio de algoritmos e análise de bioinformática, características estruturais da proteína NcGRA5, comparando com seu ortólogo TgGRA5 em *T. gondii* por meio de bases de dados livres;
- b.** Fusionar ‘etiqueta endógena’ na porção C-terminal da proteína NcGRA5, utilizando CRISPR/Cas9;
- c.** Caracterizar a localização subcelular e peso molecular da proteína NcGRA5;
- d.** Desenvolver parasitos geneticamente deficientes para NcGRA5 por meio de CRISPR/Cas9;
- e.** Avaliar o impacto da ausência de NcGRA5 na replicação de parasitos geneticamente modificados por meio de ensaios *in vitro*.

4. METODOLOGIA

4.1. Análises *in silico*

Trabalhos prévios do Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mário Endsfeldz Camargo” identificaram erros e ausências de anotação de algumas proteínas na base de dados do ToxoDB. Dentre estas inconsistências, consta nesta base de dados que o *N. caninum* não possui ortólogo do gene *GRA5* de *T. gondii*. Nesse sentido, baseado no mapa de sintenia comparativo entre *N. caninum* e *T. gondii* disponível no ToxoDB, desconfiamos que o gene NcLiv_014150 pudesse ser o ortólogo de *GRA5* em *N. caninum*. Com a intenção de confirmarmos essa hipótese, desenvolvemos a série de experimentos abaixo.

Para caracterização *in silico* de *GRA5* em *N. caninum*, bem como identificar possíveis semelhanças com a respectiva proteína ortóloga em *T. gondii*, fizemos alinhamentos das sequências através da plataforma MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log Expectation* - <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle?stype=protein>) (Edgar, 2004). Para avaliação e comparação entre as estruturas terciárias preditas, utilizamos modelos AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (Varadi, M. et al., 2023), que foram alinhados por meio da ferramenta *Aligned framet pairs allowing Twist* (FATCAT) (<https://fatcat.godziklab.org/>) (Li et al., 2020), para determinar o grau de semelhança entre as estruturas tridimensionais (3D) entre as duas espécies.

Ainda, realizamos buscas utilizando o InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) (McDowall J & Hunter S., 2011) para determinar domínios conservados, domínios transmembrana por meio do TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), peptídeos sinais através da ferramenta SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>), e âncora GPI utilizando NetGPI 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGPI-1.1/>) com a finalidade de entender como *GRA5* se estrutura em *N. caninum*, comparando com seu ortólogo em *T. gondii*, e além disso verificar se esses dados estão de acordo com os dados disponibilizados no ToxoDB.

4.2. Cultura de parasitos

O cultivo de *N. caninum* Liverpool duplo-deficiente para hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e *ku80* (NcLiv $\Delta h\Delta k$) (MINEO et al., 2022), bem como as linhagens

geneticamente modificadas através da realização dessa iniciativa foram mantidas em monocamadas confluentes de fibroblastos de prepúcio humano (HFF), com passagens seriais de 500 µL a cada 2 dias. Essas culturas foram mantidas utilizando o meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37°C em uma atmosfera com 5% CO₂.

4.3. Geração de parasitos geneticamente modificados

4.3.1. Desenho, Anelamento de gRNAs e Ligação ao vetor

Para elaborar as sequências forward e reverse de RNA guia (gRNA) com a sequências scaffold para cada gene do estudo (Tabela S1), utilizou-se a plataforma Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Desing Tool (EuPaGDT) (<http://grna.ctegd.uga.edu/>). Realizou-se o anelamento dos gRNA por meio da adição de cada primer à dH₂O, aquecendo por 5 minutos em termociclador à temperatura de 100°C. Realizamos a ligação por meio da incorporação do vetor linear pU6-Universal (Addgene:52694), gRNA anelado, T4 DNA ligase (ThermoFisher-Scientific), T4 ligase buffer, e dH₂O.

4.3.2. Transformação de bactérias termocompetentes

O produto anteriormente ligado foi adicionado a bactérias *E. coli* DH5α. Para isso, incubou-se em gelo bactérias tratadas com CaCl₂ e o resultado da ligação. Depois, as bactérias foram submetidas a um choque térmico, posteriormente, essas bactérias foram levadas ao gelo, em seguida colocamos meio para transformação SOC (Invitrogen) para, depois submetê-las a agitação durante 1 hora sob temperatura de 37°C. Seguido a incubação, as bactérias recém transformadas foram semeadas em placas com meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (Sigma) e incubadas a 37°C por 18 horas. Dado o tempo, selecionamos colônias isoladas que foram incubadas por 18 horas em tubos contendo 5 ou 50 mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina.

4.3.3. Purificação de vetores

Os plasmídeos contendo os gRNA foram purificados utilizando o Kit GeneJET Plasmid MiniPrep (Thermo Fisher Scientific), conforme as orientações do fabricante. Primeiramente,

centrifugou-se a suspensão de bactérias anteriormente inoculadas a 3.500 x g por 30 minutos a 4°C. Depois, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *Pellet* em tampão de ressuspensão com RNase, em seguida colocou-se tampão de lise, fazendo a homogeneização por inversão. Segundo, adicionou-se tampão de neutralização, homogeneizou-se por inversão até a formação de um precipitado, para então submeter as suspensões à centrifugação, o sobrenadante obtido foi transferido para as colunas do Kit, essas colunas foram submetidas a uma centrifugação de 12.000 x g por 1 minuto. Adiante, essas colunas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem, com centrifugação de 1 minuto entre cada lavagem. Finalmente, os plasmídeos retidos na coluna foram eluidos em tampão de eluição, esse previamente aquecido a 60 °C, seguido de centrifugação de 12.000 x g por 2 minutos.

4.3.4. Preparação do DNA de reparo com braços de homologia

Para o DNA de reparo utilizamos a PCR convencional com vetores pLIC:3xHA:DHFR para realizar uma marcação endógena com três etiquetas de hemaglutinina (3xHA) no gene alvo. Para a realização do nocaute do mesmo gene, utilizou-se o vetor pJET1.2:pNcGRA7:TgHXGPRT seguindo o protocolo determinado por Mineo et al., (2022). Para permitir a recombinação com a região de interesse, os braços de homologia foram desenhados com uma sequência de 40 pb (Tabela S2). Realizou-se a PCR com a enzima PFU, tampão da enzima 10X, 10 mM de dNTPs, 100 ng de vetor, primer forward e reverse 10 µM, completando com dH₂O para um volume final de 100 µL por reação, fez-se 4 reações por DNA de reparo, totalizando 400 µL. Utilizou-se os seguintes parâmetros de amplificação: desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação 94°C por 40 segundos, anelamento 60°C por 40 segundos, extensão 72°C por 5 minutos, e extensão final 72°C por 10 minutos. Após o término da PCR, confirmou-se as sequências amplificadas por eletroforese em gel de agarose 1% com 1,5 µL de SyberSafe (ThermoFisher Scientific) a 80 V durante 1 hora.

4.3.5. Purificação do DNA de reparo por Fenol-Clorofórmio

Para a realização da purificação do produto gerado pela PCR utilizou-se a técnica de Fenol-Clorofórmio. Inicialmente, adicionou-se fenol a amostra de DNA de reparo com posterior vórtex. Essa solução foi centrifugada 12.000 x g por 3 minutos, coletou-se a fase aquosa para um novo eppendorf de 1,5 mL. Depois, adicionou-se clorofórmio, seguido com vórtex, fez-se uma nova centrifugação. Recuperou-se a fase aquosa e um novo eppendorf de 1,5 mL, e adicionou-se acetato de sódio 3M, aguardando por 5 minutos para reação de

neutralização das cargas do DNA ocorrer. Em seguida, adicionou-se etanol P.A gelado até um volume final de 1000 µL, homogeneizou-se por inversão até se observar a precipitação do DNA em forma de “nuvem”. Segundo, centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos o DNA de reparo, depois fez-se o descarte do sobrenadante, e o *Pellet* formado foi reidratado com etanol 70% por 10 minutos sob agitação. Por fim, realizou-se uma nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante formado foi descartado e o *Pellet* foi seco e ressuspendido em dH₂O em cabine de fluxo.

4.3.6. Eletroporação de parasitos

Utilizou-se taquizoítos de NcLivΔ*hΔk* como linhagem parental para a realização da transfecção de parasitos, com o gRNA guia e o DNA de reparo anteriormente purificado. Inicialmente, coletou-se 1x10⁷ taquizoítos extracelulares que foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos para retirar o meio suplementado com 10% de SFB. Em seguida, o *Pellet* contendo os taquizoítos foi ressuspendido e lavado duas vezes com solução Cytomix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM KPO₄ [pH 7,6], 25 mM HEPES, 2 mM EGTA [pH 7,6], 5mM MgCl₂). Posterior a última lavagem, o *Pellet* foi ressuspendido em 720 µL de Cytomix, 40 µL de vetor pU6 com gRNA e 40 µL de DNA de reparo (75-100 µg de DNA Total), essa solução foi colocada em cubeta de eletroporação de 4 mm no Gene Pulser Xcell Electroporator. Por fim, os parasitos transfectados foram acomodados em garrafas com confluente monocamada de células HFF por 24 horas.

Dado o período de incubação, adicionou-se a droga de seleção por um período de 10 dias. Para o DNA de reparo que contém o gene DHFR, utilizado para fazer o etiquetamento endógeno, adicionou-se pirimetamina 7,5 mM, enquanto para o DNA de reparo com o gene HXGPRT, utilizado para fazer os parasitos nocaute para NcGRA5, adicionou-se ácido micofenólico 25 µg/mL com xantina 50 µg/mL (MX). Uma vez terminado o tempo de seleção, realizou-se a clonagem desses parasitos através de diluição limitante, colocando 4 parasitos por poço, em placas de 96 poços. Por fim, checou-se os organismos geneticamente deficientes para GRA5 por meio de PCR convencional, utilizando as sequências dispostas na Tabela S3. A PCR foi realizada com a enzima PFU, tampão da enzima 10X, 10 mM de dNTPs, 100 ng DNA genômico, primer forward e reverse 10 µM, completando com dH₂O para um volume final de 10 µL. Utilizou-se os seguintes parâmetros de amplificação: desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação 94°C por 40 segundos, anelamento 60°C por 40 segundos, extensão 72°C por 1 minutos, e extensão final 72°C por 10 minutos. Após o término da PCR,

confirmou-se as sequências amplificadas por eletroforese em gel de agarose 1% com 1,5 µL de SyberSafe (ThermoFisher Scientific) a 80 V durante 1 hora.

4.4. Imunofluorescência

Localizou-se subcelularmente a proteína GRA5 por meio da técnica de imunofluorescência indireta, marcando os epítotos de hemaglutinina (HA) previamente inseridos na GRA de interesse. Simplificadamente, semeou-se células HFF em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, essas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C e 5% de CO₂ até que ocorresse a confluência total sobre as lamínulas. Uma vez confluentes, infectou-se as células com taquizoítos de *N. caninum* geneticamente modificados com 3xHA, incubando durante 18-24 horas sob as condições anteriores de temperatura e atmosfera. Posteriormente, retirou-se o meio do poço e lavou-se duas vezes as lamínulas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X, em seguida, fixou-se as lamínulas com solução de fixação (Formol 4% em PBS 1X) por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguido a fixação, lavou-se cinco vezes as lamínulas com PBS 1X, depois, fez-se a permeabilização com tampão de bloqueio (0,2% de Triton X-100, 3% Albumina Sérica Bovina (BSA) em 1X PBS, e Azida Sódica 1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Segundo, as lamínulas foram incubadas por 1 hora com os anticorpos primários, α-HA-Rabbit (ThermoFisher Scientific), α-4C1-Mouse (marcador de proteínas do complexo de membrana interna) (SOHN et al., 2011). Dado o período de incubação, retirou-se os anticorpos primários e lavou-se as lamínulas cinco vezes com PBS 1X, que seguidamente foram incubadas por 40 minutos com os anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 488 e 546 (Thermo Fisher Scientific). Em tempo, fixou-se as lamínulas em lâminas para microscópio utilizando solução de montagem contendo DAPI ProLong. A análise e os registros fotográficos foram feitos utilizando o microscópio de fluorescência OLYMPUS FSX100.

4.5. Western Blotting

Por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a uma concentração de 12%, fez-se a separação dos extratos brutos dos parasitos geneticamente modificados com 3xHA e nocaute. Brevemente, para a separação dos extratos coletou-se todo o conteúdo da garrafa, centrifugou a 800 x g por 10 minutos, em seguida descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *Pellet* em tampão fosfato salino 1X (PBS),

centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante deixando o *Pellet* secar, em seguida ressuspendeu-se o *Pellet* em tampão de desnaturação suplementado com inibidores de protease (ROCHE cOCompleteTM), seguidamente adicionou-se tampão de carregamento de amostra, à mistura foi levada para banho-seco a uma temperatura de 100 °C durante 5 minutos, dado o tempo as amostras foram pipetadas no gel para separação. Feito a separação, transferiu-se as proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, corou-se a membrana com solução de Ponceau 5% para avaliação do sucesso da transferência, depois, bloqueou-se a membrana com PBS-Tween 0,05% e Molico 5% por 1 hora, em temperatura ambiente e agitação constante. Posteriormente, lavou-se cinco vezes a membrana com PBS-Tween 0,05%, deixando-a incubar *overnight*, a temperatura de 4°C em agitação constante, com os anticorpos primário α -HA-Rabbit (Thermo Fisher Scientific) e α -4C1-Mouse (marcador de proteínas do complexo de membrana interna), em solução de bloqueio Albumina Sérica Bovina (BSA) 1%. No outro dia, lavou-se cinco vezes com PBS-Tween 0,05%, adicionou-se os anticorpos secundários, Goat anti-Rabbit IgG HRP e Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP (Thermo Fisher Scientific), deixando incubar por 1 hora a temperatura de 4°C em agitação constante, ambos anticorpos conjugados com peroxidase, α -IgG-Rabbit e α -IgG-Mouse (Thermo Fisher Scientific) em solução de bloqueio Albumina Sérica Bovina (BSA) 1%. O Western Blotting foi revelado usando o Kit ECL Western Blotting Substrate (Promega), no sistema de captura de imagens ChemiDoc MP Systems (BioRad), onde se utilizou do Software Image Lab para confirmar se a modificação nos parasitos com 3xHA e nocaute foi bem-sucedida e, determinar o peso em kilodaltons (kDa) da proteína.

4.6. Ensaio de placa

Para esse ensaio utilizou-se placas de seis poços com monocamadas de células HFF confluentes mantidas com meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37°C em uma atmosfera com 5% CO₂.

As células foram infectadas com aproximadamente 500 parasitos por poços e deixadas para formar placas de lise por 7 dias em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Ao fim desse período, lavou-se duas vezes as monocamadas com PBS 1X, fixou-se com metanol 100% gelado e corou-se com cristal violeta 4% por 15 minutos. Ao final, lavou-se as monocamadas dH₂O deixando secar a temperatura ambiente por 24 horas, seguido de registro fotográfico. Os experimentos foram realizados em triplicata e as placas de lise formadas foram quantificadas

utilizando a ferramenta multiponto presente no software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.7. Análise estatística

A elaboração dos gráficos e a realização das análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Fez-se análises de distribuição de normalidade para determinar se os conjuntos de dados são paramétricos ou não. Para as análises de comparação múltipla fez-se Two-Way ANOVA. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e a significância estatística será determinada com limiar de valor $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Predição *in silico*: o que revela os ensaios de bioinformática

Como mencionado anteriormente, trabalhos prévios desenvolvidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mário Endsfeldz Camargo” evidenciaram erros de anotação para determinadas proteínas presentes na base de dados do ToxoDB. Nesse cenário, a análise do mapa de sintenia disponível nessa base de dados levantou a hipótese de que o gene NcLiv_014150 correspondesse como ortólogo de *GRA5* em *T. gondii*. Vale mencionar que até a elaboração desse trabalho NcGRA5 não foi caracterizada, permanecendo apenas identificada como NcLiv_014150 na base de dados do ToxoDB. Ressalta-se que esse gene ocupa posição genômica muito semelhante a posição de *GRA5* em *T. gondii* como demonstrado na Figura 2.

Mediante aos ensaios de bioinformática realizados, pudemos obter um número considerável de informações sobre características desta proteína: a análise dos alinhamentos de sequências feitos pela plataforma MUSCLE, sugere uma porcentagem de identidade de 38,14% entre as sequências de aminoácidos de TgGRA5 e NcGRA5, como observado na Figura 3A. Quanto as estruturas terciárias baseadas nos modelos AlphaFold (Figura 3B, 3C e 3D) foi demonstrado através da ferramenta FATCAT usando o alinhamento flexível, que TgGRA5 e NcGRA5 possuem similaridades estruturais estatisticamente significativas com *p value* = $1,37 \times 10^{-4}$, identidade de 28,83%, similaridade de 47,75%, e um Desvio Quadrático Médio (RMSD) entre os átomos de 2,55 Å (Figura S1), demonstrando que as estruturas são globalmente muito semelhantes, como indicado na Figura 3D.

Seguindo essa perspectiva, foi observado por meio do SignalP 6.0, ferramenta de previsão de peptídeos sinalizadores e seus sítios de clivagem, a existência de um peptídeo sinal de caráter hidrofóbico (Sec/SPI h) na porção N-terminal de NcGRA5 que se localiza entre o 1-30 aminoácido, sendo a sua região de clivagem (CS) entre os aminoácidos 30 e 31 (Figura 4A). Quando olhamos os mesmos parâmetros para TgGRA5 também identificamos a presença de um peptídeo sinal de caráter hidrofóbico (Sec/SPI h) na porção N-terminal com presença de sítio de clivagem, divergindo apenas a região em que se localiza esse sítio que fica entre os aminoácidos 26 e 27 como demonstra a Figura 4B.

Ainda, foi caracterizado por meio da ferramenta TMHMM 2.0 que analisa a presença de domínios transmembrana, há existência de dois desses domínios em NcGRA5, um na porção N-terminal entre os aminoácidos 7 ao 29, e outro na porção C-terminal entre os aminoácidos 88-105 (Figura 4C). Para TgGRA5 observou-se a existência de dois domínios transmembrana

nas mesmas regiões, N-terminal e C-terminal, no entanto com posições diferentes estando localizados entre os aminoácidos 7-26 e 71-93, respectivamente, como pode ser observado na Figura 4D.

No que se refere a possibilidade de existência de predição de ancoragem por glicosilfosfatidilinositol (âncora GPI), a ferramenta NetGPI - 1.1 demonstrou a ausência dessa estrutura tanto em NcGRA5, quanto para TgGRA5, com pode ser observado na Figura 5A e 5B abaixo.

Em tempo, as análises de domínios conservados realizadas pela ferramenta InterProScan corroboraram com os algoritmos anteriormente utilizados, demonstrando a presença de dois domínios transmembrana, do peptídeo sinal com a região dos sítios de clivagem, e a inexistência de âncora GPI, tanto para NcGRA5 quanto para TgGRA5, como demonstra a Figura 5C e 5D abaixo, o que esclarece ainda mais a similaridade das sequências e conservação estrutural entre as espécies.

Figura 2: Mapa de ortologia e sintenia adaptado da base de dados do ToxoDB, mostrando que NcLiv_014150 (NcGRA5) ocupa posição genômica muito semelhante a TgGRA5 (TgME49_286450).

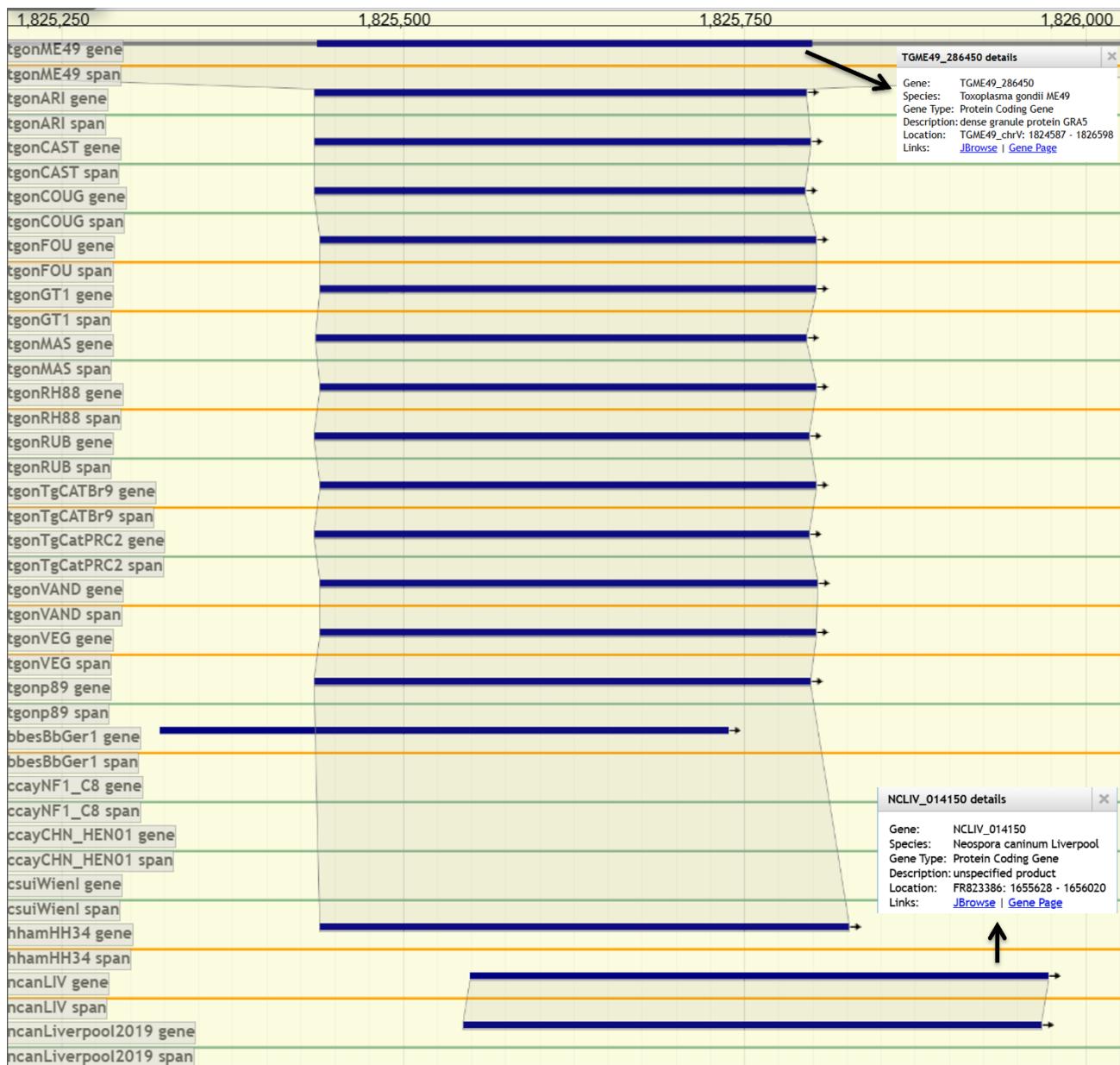


Figura 3: Predições de bioinformática das proteínas NcGRA5 e TgGRA5. A. Porcentagem de identidade sugerida pelo MUSCLE. B. AlphaFold NcGRA5. C. AlphaFold TgGRA5. D. Alinhamento via FATCAT das estruturas 3D AlphaFold NcGRA5 e TgGRA5. *Magenta e Cinza: Domínios transmembranas; Azul: Sítios de Clivagem; Verde e Preto: Porção citoplasmática; Ciano e Marrom: Porção extracitoplasmática*.

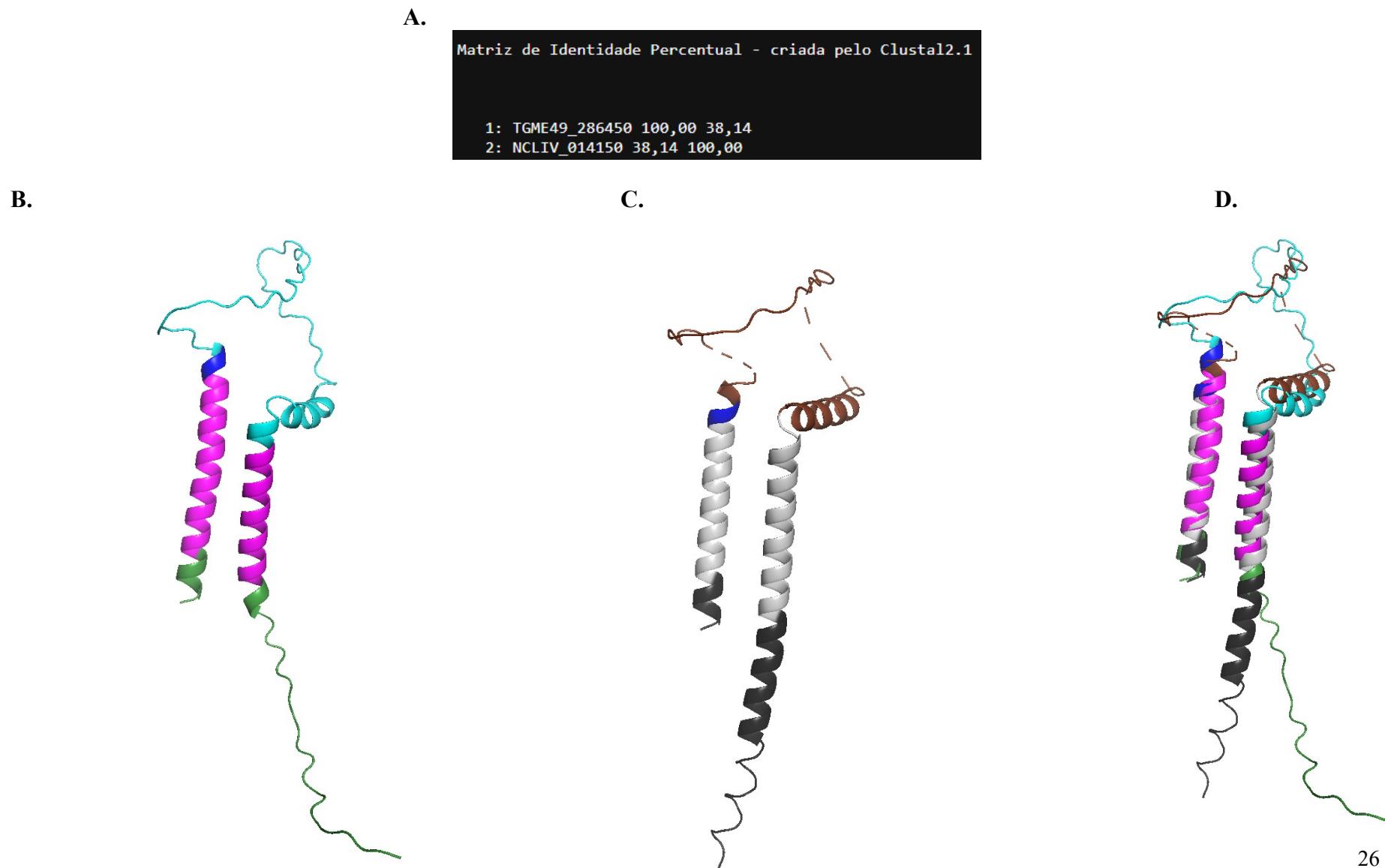


Figura 4: Predições de bioinformática das proteínas NcGRA5 e TgGRA5. A. Peptídeo sinal apontado em NcGRA5 por SignalP 6.0. B. Peptídeo sinal apontado em TgGRA5 por SignalP 6.0. C. Domínios transmembranas em NcGRA5 sugerido por TMHMM 2.0. D. Domínios transmembranas em TgGRA5 sugerido por TMHMM 2.0.

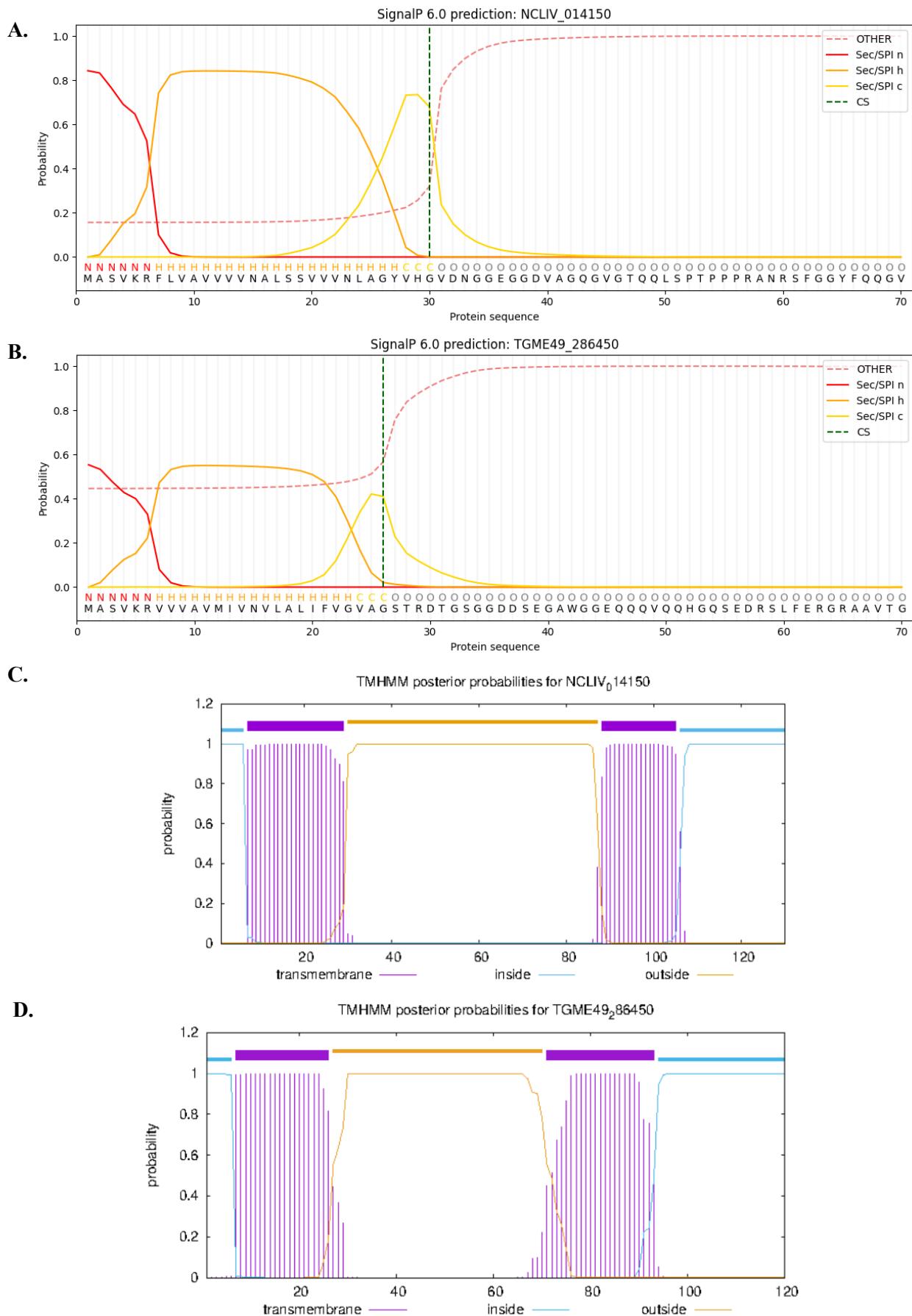
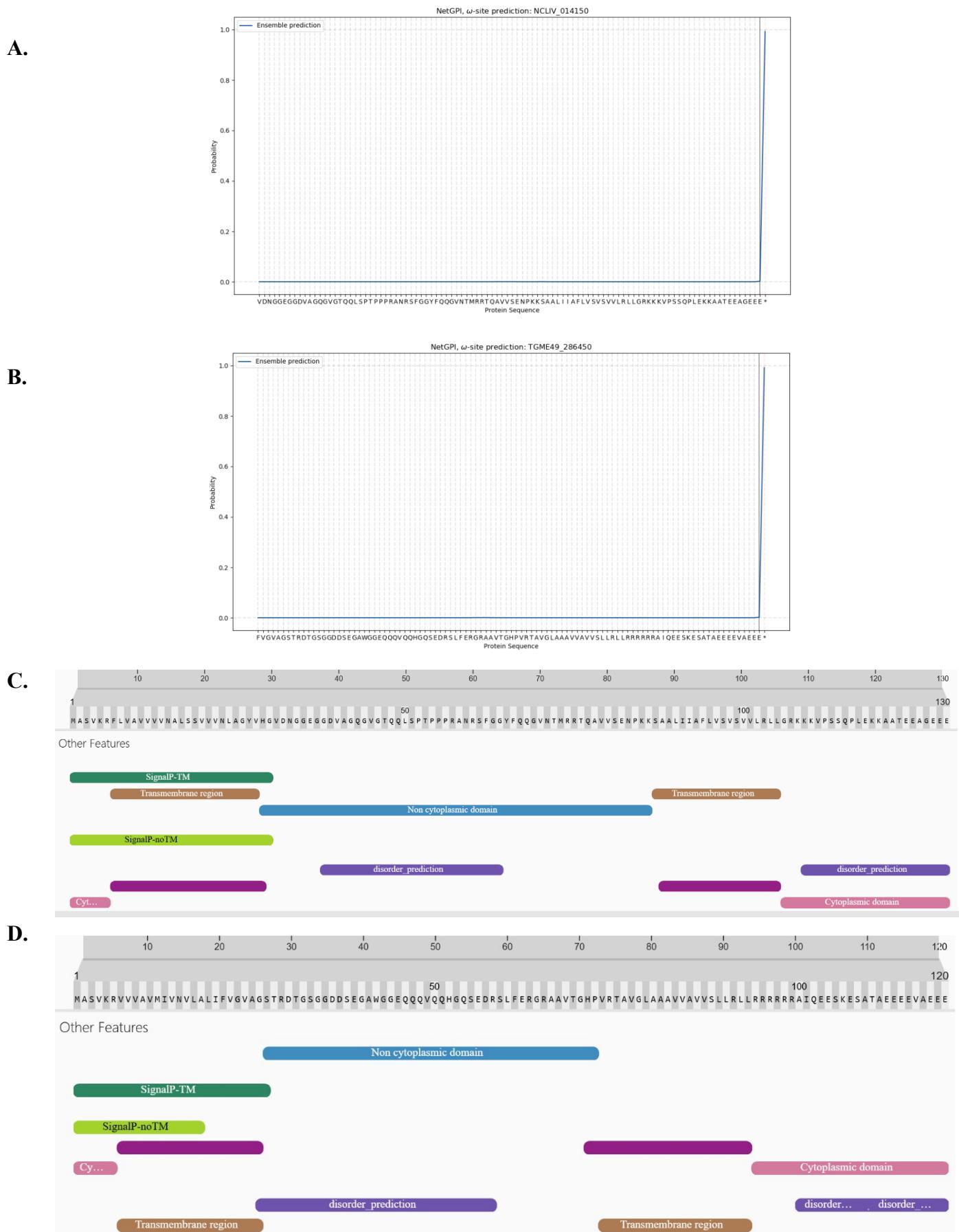


Figura 5: Predições de bioinformática das proteínas NcGRA5 e TgGRA5. A. Ausência de âncora GPI em NcGRA5 por NetGPI - 1.1. B. Ausência de âncora GPI em TgGRA5 por NetGPI - 1.1. C. Domínios conservados em NcGRA5 por InterProScan. D. Domínios conservados em TgGRA5 por InterProScan.



5.2. Caracterização proteica e análise de seu papel no ciclo lítico do parasito

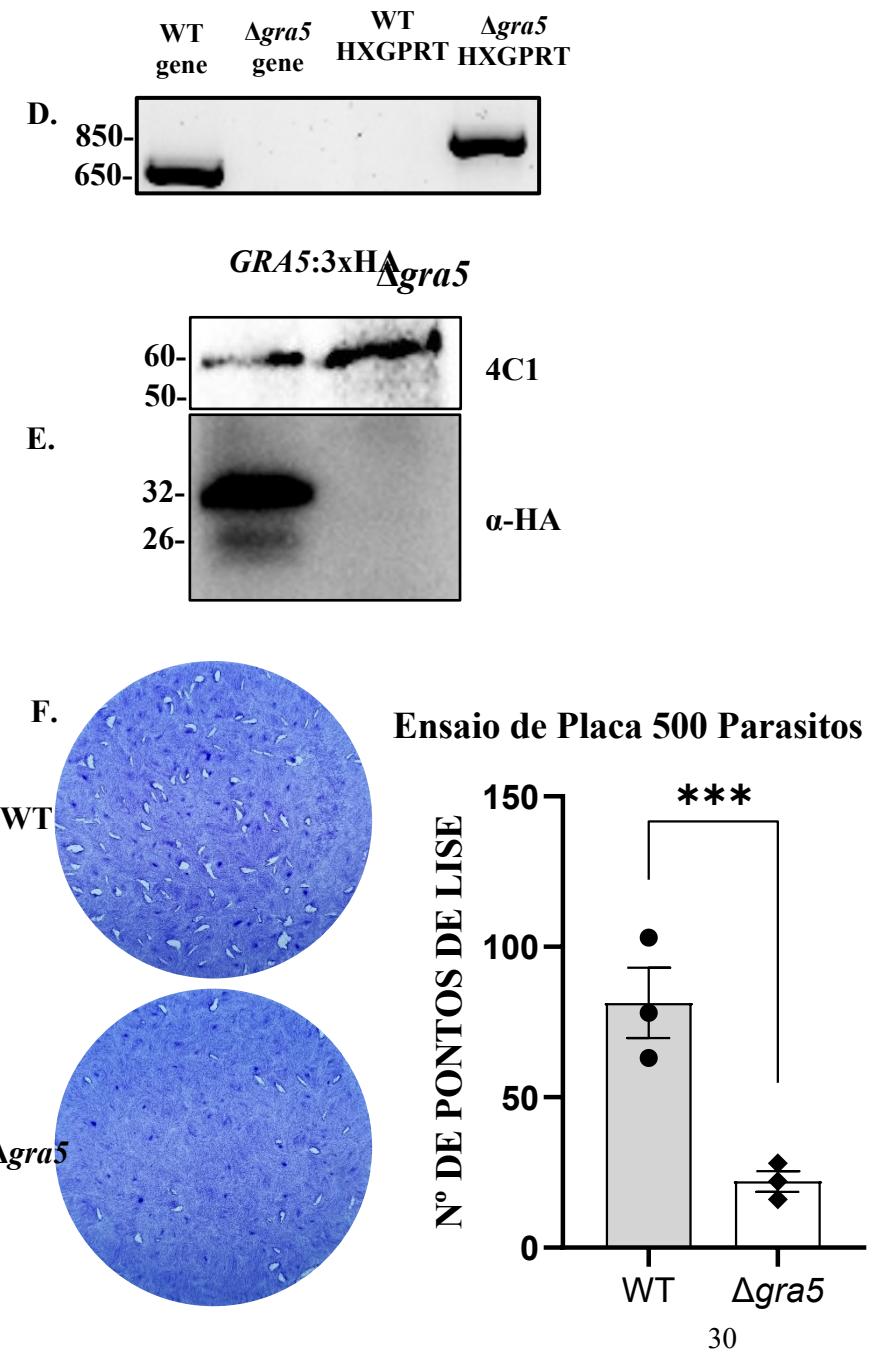
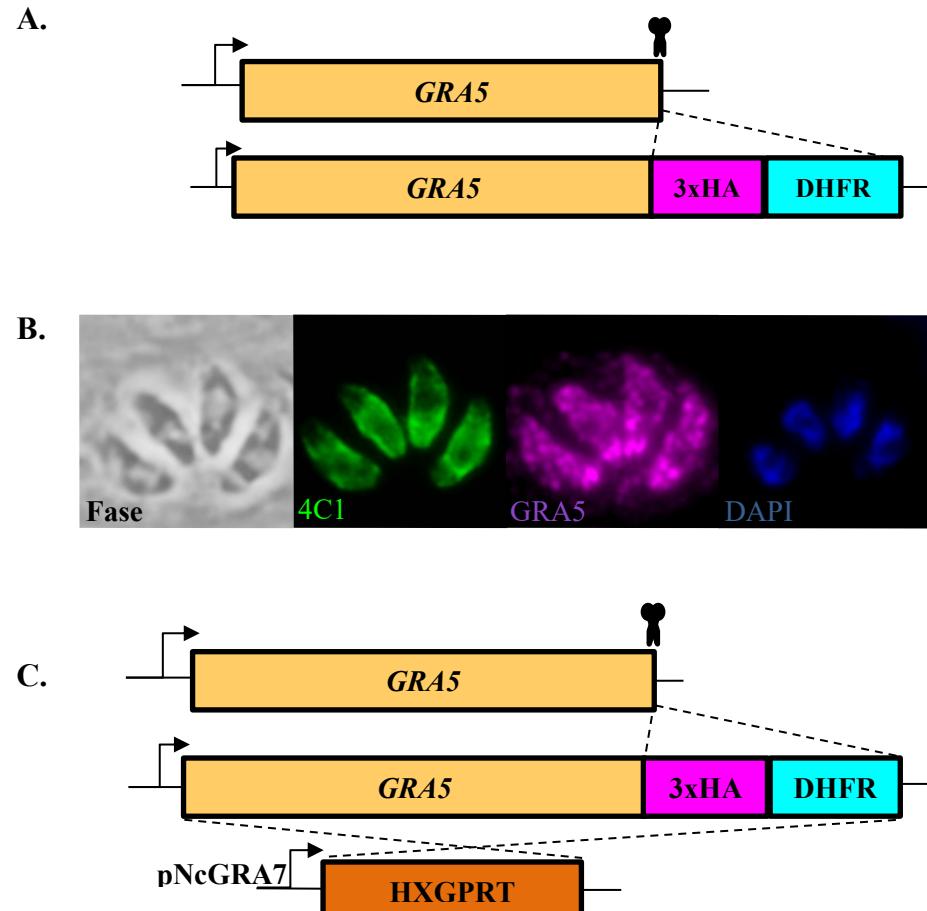
Para localização subcelular de NcGRA5 realizou-se uma fusão de uma ‘etiqueta’ contendo três epítopes de hemaglutinina (3xHA) na porção C-terminal da região codificadora do gene *NcGRA5*, utilizando a técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 Figura (6A). Mediante a elaboração dessa linhagem de parasitos geneticamente modificados (*NcLivΔhΔk_GRA5-3xHA*), realizamos o ensaio de imunofluorescência para determinar a localização e padrão de distribuição dessa proteína. Este ensaio revelou uma perceptiva secreção de NcGRA5 no vacúolo parasitóforo (VP), demonstrando distribuição da proteína de grânulo denso ao longo de todo o VP (Figura 6B), bem como sua distribuição dentro do taquizoíto onde aparenta estar em maior concentração.

Em sequência, com a intenção de determinar o papel de NcGRA5 no ciclo lítico do parasito, geramos uma linhagem de parasitos geneticamente deficientes para essa proteína a partir da linhagem *NcLivΔhΔk_GRA5-3xHA* anteriormente gerada. Nessa, por intermédio da ferramenta de CRISPR/Cas9, removeu-se toda a região codificadora de *NcGRA5* juntamente com a etiqueta inserida contendo 3xHA e o cassete de resistência a pirimetamina, substituindo por um cassete de resistência contra o ácido micofenólico e xantina (MX, Figura 6C). Após clonagem, a depleção do gene foi confirmada na linhagem nocaute para *NcGRA5* (*NcLivΔhΔkΔgra5*) por meio da ausência de amplificação da região codificadora de *NcGRA5* por PCR (Figura 6D).

Realizamos o ensaio de western blotting a fim de conjecturar o tamanho de NcGRA5, que inicialmente foi predita no ToxoDB com um tamanho de aproximadamente 13,6 kDa. Nossa ensaio revelou um tamanho de aproximadamente 32 kDa com a presença, mesmo que discreta, de uma banda subjacente por volta de 26 kDa, indicando que essa proteína pode sofrer um processamento após a sua tradução, como observado na Figura 6E.

Através do ensaio de placa constatou-se que os parasitos geneticamente deficientes para NcGRA5 possuem redução significativa no número de placas de lise formadas durante 7 dias de infecção em células HFF, quando comparado com organismos parentais *NcLivΔhΔk* (Wild Type - WT), o que sugere que NcGRA5 é uma proteína necessária para replicação *in vitro*, afetando consequentemente sua virulência (Figura 6F).

Figura 6: Ensaios *in vitro*. A. Estratégia para geração de parasitos *NcLiv:GRA5:3xHA*. B. Imunofluorescência de NcGRA5. C. Estratégia para geração de parasitos Δ *gra5*. D. PCR de checagem dos parasitos geneticamente deficientes para NcGRA5. E. Western Blotting. F. Ensaio de placa comparativo entre o parasito parental WT e o parasito Δ *gra5* com 500 parasitos.



6. DISCUSSÃO

As proteínas de grânulos densos (GRAs) são fundamentais na biologia de parasitos do filo Apicomplexa, estando essas diretamente envolvidas na formação, manutenção e modulação do VP, o que influencia diretamente na replicação e virulência do parasito (DUBEY et al., 2017). Nesse sentido, TgGRA5 tem sido descrita em *T. gondii* como uma proteína de 120 aminoácidos, com uma região N-terminal hidrofóbica, seguida de uma região C-terminal hidrofílica. Em *T. gondii* é atuante no VP auxiliando na manutenção estrutural, e sendo uma proteína associada a MVP com características transmembranicas, onde seu domínio N-terminal fica direcionado ao citoplasma da célula hospedeira, enquanto o C-terminal é projetado ao lúmen do vacúolo (LECORDIER et al., 1999). Adicionalmente, nossas predições revelam NcGRA5, composta por 130 aminoácidos, com regiões N-terminal e C-terminal characteristicamente semelhantes às de TgGRA5 descrita por Lecordier et al. (1999), sugerindo que NcGRA5 possa ter um papel funcional semelhante, relacionado a MVP, como TgGRA5. Esses achados associados ao mapa de sintenia reforçam a existência de GRA5 em ambas as espécies, principalmente, considerando a proximidade filogenética entre *T. gondii* e *N. caninum*, cujos genomas e expressões gênicas são consideravelmente conservados, nesse sentido, a caracterização de NcGRA5 torna-se muito relevante para compreender os mecanismos de patogenicidade conservados entre essas espécies, especialmente no que se refere à funcionalidade do VP (REID AJ et al., 2012).

As análises de alinhamento de sequência realizadas nesse estudo sugerem uma identidade de 38,14% entre NcGRA5 e TgGRA5, faixa ligeiramente acima da zona cinzenta, sendo assim com maior probabilidade de conservação estrutural (Rost B, 1999; Olivella M et., 2013). Ainda, a elevada similaridade estrutural observada a partir dos modelos AlphaFold e comparados pelo alinhamento flexível via FATCAT, com valor de RMSD de 2,55 Å indicam que a conformação tridimensional dessas proteínas é significativamente conservada (Olivella M et., 2013). Esse achado reforça a noção de que por vezes a estrutura terciária tende a ser mais conservada do que a identidade de sequência primária, especialmente em proteínas que atuam em processos essenciais à sobrevivência intracelular como as proteínas transmembranicas. (CHOTHIA & LESK, 1986; D LEVY et al., 2006; ILLERGÅRD et al., 2009; OLIVELLA M et., 2013).

A existência de peptídeos sinais semelhantes nas porções N-terminais de NcGRA5 e TgGRA5, sugere que ambas as proteínas são secretadas pela via clássica mediada pelo reticulo endoplasmático e complexo de Golgi, característica comum e amplamente descrita para proteínas de grânulos densos em Apicomplexos (Lecordier et al., 1999; Mercier et al., 2005). Quanto a divergência observada na localização dos sítios de clivagem dos peptídeos sinais em ambas as proteínas, essas não são inesperadas, refletindo adaptações específicas, sem impacto significativo

na secreção, como postulado na literatura para proteínas ortólogas (VON HEIJNE, 1984, 1986; TEUFEL et al., 2022). Em tempo, a inexistência de âncora GPI em NcGRA5 e TgGRA5 reforça sua classificação como proteínas secretadas e associadas ao VP, visto que proteínas com a presença de âncora GPI são tipicamente ancoradas a superfície do parasito, e no geral desempenham funções diferentes das GRAs, como SAG1 que é conhecida e descrita na literatura (LECORDIER et al., 1999; ZINECKER et al., 2001; MERCIER et al., 2005).

A localização subcelular de NcGRA5 por meio de imunofluorescência representa um avanço relevante, visto que a caracterização dessa proteína em *N. caninum* era inexistente até o presente. O padrão de distribuição evidenciado ao longo do VP é compatível com o clássico perfil de GRAs, principalmente pelo fato de existir um peptídeo sinal N-terminal hidrofóbico que por vezes é associado a secreção das GRAs para o VP (Cesbron-Delauw, 1994; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015), o que gera concordância com as previsões *in silico* que foram realizadas, isso destaca a importância de se associar bioinformática e validação experimental na caracterização de proteínas (JUMPER et al., 2021).

A diminuição significativa do número de placas de lise formadas em células HFF observada nos parasitos geneticamente deficientes para GRA5, sugere que essa proteína em *N. caninum* exerce um papel importante para a replicação *in vitro*, o que pode interferir na sua virulência. Fenótipos semelhantes já foram descritos na literatura para o nocaute de outras proteínas de grânulos densos como é o caso da NcGRA27, cuja deleção do gene refletiu na redução da replicação do parasito *in vitro* (Lu et al., 2024). Um contraponto interessante é o fato do nocaute de TgGRA5 não apresentar redução significativa na proliferação *in vitro*, mas apresentar enorme avirulência e elevada capacidade de estimular a produção de anticorpos, citocinas, e infiltrados leucocitários *in vivo*, sugerindo que mesmo havendo semelhança entre as sequências de NcGRA5 e TgGRA5, uma robusta semelhança estrutural e uma localização subcelular coincidente, o papel de ambas as proteínas *in vitro* são diferentes entre *T. gondii* e *N. caninum* (CHEN et al., 2023).

Ainda, TgGRA5 tem sido descrita como uma proteína de peso molecular de 21 kDa, sendo secretada dos grânulos densos exclusivamente na forma solúvel, e sofrendo uma mudança conformacional pós-secreção da forma solúvel para a forma membranosa, para se associar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) onde se agraga principalmente a parte limitante da membrana, e em menor extensão no lúmen do vacúolo, essa associação se deve a existência do seu domínio N-terminal (LECORDIER et al., 1999). Em nossos experimentos de western blotting, detectamos duas bandas reativas para o anticorpo voltado contra os peptídeos de hemaglutinina no extrato de parasitos da linhagem NcLivΔhΔk_GRA5-3xHA, com tamanho predominante de aproximadamente 31,9 kDa e uma discreta banda subjacente de 25,9 kDa. Estas bandas detectadas

diferem do tamanho predito na base de dados do ToxoDB, de 13,6 kDa (Figura S2), sugerindo que essa discrepância de peso molecular possa estar associada a fenômenos de processamento pós-tradicional como clivagens e dimerizações. Neste sentido, predizemos que esta proteína possui um peptídeo sinal de 30 aminoácido que, quando clivado, dará origem a uma proteína madura de 10.6 kDa. Considerando que fusionamos uma etiqueta contendo 3 vezes um peptídeo de hemaglutinina de 12 aminoácidos ao final da proteína, soma-se ao peso do antígeno nativo 3,3 kDa. Assim, teríamos GRA5 imaturas fusionadas com 3xHA com peso molecular aproximado de 17 kDa, enquanto a proteína madura (após clivagem do peptídeo sinal) com aproximadamente 14 kDa. Neste sentido, interpretamos que as bandas aproximadas de 32 e 26 kDa observadas em nosso western blotting na realidade correspondem aos pesos preditos para dímeros de NcGRA5 precursoras ou maduras. É necessário considerar que existem variações na migração em SDS-PAGE, como a utilização ou não de agentes redutores, que podem influenciar ligeiramente nos pesos moleculares, bem como as regiões hidrofóbicas helicoidais e domínios transmembrana presentes em NcGRA5 (RATH et al., 2009). O interessante que mesmo com essas divergências de peso moleculares a secreção e dispersão de GRA5 ao longo do vacúolo parasitóforo é coincidente entre *T. gondii* e *N. caninum*.

Por fim, nossos resultados fornecem evidência consistente sobre a relevância de NcGRA5, agregandoativamente no entendimento da biologia do parasito. As abordagens, *in silico* e *in vitro*, utilizadas são grandes aliadas na investigação molecular de proteínas, contribuindo solidamente para criação de hipóteses. Nesse cenário, estudos já estão sendo desenvolvidos para aprofundar a caracterização dessa proteína no contexto *in vivo*, incluindo sua participação em mecanismos imunológicos e patogênicos.

7. CONCLUSÃO

Este estudo realizou a caracterização funcional e subcelular da proteína de grânulo denso 5 de *Neospora caninum*, em comparação ao seu ortólogo TgGRA5 de *Toxoplasma gondii*, integrando abordagens *in silico* e *in vitro* com ferramentas de bioinformática e edição genômica mediadas por CRISPR/Cas9. Demonstramos que NcGRA5 está presente no parasito, apresenta características estruturais bem conservadas com seu ortólogo TgGRA5, além de padrão de distribuição típico de GRAs, localizando-se no vacúolo parasitóforo. É funcionalmente relevante para o ciclo lítico e para a replicação intracelular, e possivelmente sofre processamento pós-traducional. Ainda, embora sua importância biológica tenha sido evidenciada *in vitro*, estudos *in vivo* são necessários para elucidar seu papel na modulação da resposta imune do hospedeiro, bem como seu impacto na patogenicidade e virulência associadas à neosporose.

8. ANEXOS

Tabela S1. Lista de gRNA desenhados no EuPaGDT das GRAs alvo

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA	TIPO DE MODIFICAÇÃO
GRA5	FWD	AAGTTGCAGTTCATGTTCTCACCGG	TAG
	REV	AAAACCGGTGAGAACATGAAACTGCA	
	FWD	AAGTTGTACATGGTAGATAATGGG	NOCAUTE
	REV	AAAACCCATTATCTACACCATGTACA	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S2. Oligonucleotídeos usados como braços de homologia para a incorporação do DNA de reparo

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA	TIPO DE MODIFICAÇÃO
GRAS5	FWD	CGAGAAGAAGGGCGGCCACAGAAGAACAGGAGA GGAAGAGGGAAAGTGGAGGACGGAAATT	TAG
	REV	GTACCAGCGATACGCGTGAACGTCCACGCATCCA GTTTCGACGGCCAGTGAATTGTAATA	
	FWD	TTGGACGTTTTATCACCAACTGTTTTACACATC AAACCACTCCATGGAACCTGACTG	NOCAUTE
	REV	CGTCAGCCGGGTGACTTCTGCAAGTAAACGGTCT ATACCTGCAAGTGCATAGAAGGAA	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S3. Lista de gRNA desenhados para PCR de checagem

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA	TIPO DE MODIFICAÇÃO
GRAS5	FWD CHECK	GCTACCATCCCTTCGTTGC	TAG
	REV CHECK	AAGGCAATGATAAGCGCTGC	
	FWD CHECK	GCTACCATCCCTTCGTTGC	NOCAUTE
	REV CHECK	GAACTGCTGCGAGACCTG	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura S1: Dados oriundos do alinhamento flexível feito através da ferramenta FATCAT.

Figura S2: Dados anotados no ToxoDB com informações como ID da proteína, ponto isoelétrico, peso molecular, peptídeo sinal, domínio transmembrana e comprimento da proteína. **A.** NcLiv_014150 (NcGRA5); **B.** TgME49_286450 (TgGRA5).

A

▼	ID da transcrição	Ponto isoelétrico	Peso molecular	Tem SignalP	Tem TMHMM	Comprimento da proteína	Navegador de Proteínas
▼	NCLIV_014150-126_1	10.47	13602	sim	sim	130	Interativo

B

	ID da transcrição	Ponto isoelétrico	Peso molecular	Tem SignalP	Tem TMHMM	Comprimento da proteína	Navegador de Proteínas
▶	TGME49_286450-t26_1	5,25	12838	sim	sim	120	Interativo

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barylyuk K, Koreny L, Ke H, et al. A Comprehensive Subcellular Atlas of the Toxoplasma Proteome via hyperLOPIT Provides Spatial Context for Protein Functions. *Cell Host Microbe*. 2020;28(5):752-766.e9. doi: [10.1016/j.chom.2020.09.011](https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.011).
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*. 1984;70(2):271-274. doi: [10.1007/BF00942230](https://doi.org/10.1007/BF00942230).
- Bougour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, et al. Host cell subversion by Toxoplasma GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microbe*. 2013;13(4):489-500. [10.1016/j.chom.2013.03.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002).
- Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today*. 1994;10(8):293-296. doi: [10.1016/0169-4758\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90078-7).
- Chen M, Yang P, Xin Z, et al. *Toxoplasma gondii* gra5 deletion mutant protects hosts against *Toxoplasma gondii* infection and breast tumors. *Front Immunol*. 2023;14:1173379. Published 2023 Jun 23. doi: [10.3389/fimmu.2023.1173379](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1173379).
- Chothia C, Lesk AM. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*. 1986;5(4):823-826. doi: [10.1002/j.1460-2075.1986.tb04288.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04288.x).
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;192(9):1269-1285.
- DUBEY, J. P. et al. **Neosporosis in Animals**. [s.l.] CRC Press, 2017.
- DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929–946, 1 jul. 2002.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792-1797. Published 2004 Mar 19. doi: [10.1093/nar/gkh340](https://doi.org/10.1093/nar/gkh340).
- Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect Genet Evol*. 2013;13:133-150. doi: [10.1016/j.meegid.2012.08.012](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012).
- Hemphill A, Debaché K, Monney T, et al. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013;5(1):23-36. Published 2013 Jan 1. doi: [10.2741/e593](https://doi.org/10.2741/e593).
- HEMPHILL, A. et al. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 429–438, 1 mar. 1998.
- IBRAHIM, H. M.; SANDER, V. A. Editorial: Apicomplexa epidemiology, control, vaccines and their role in host-pathogen interaction. *Frontiers in veterinary science*, v. 9, 2022.

Illergård K, Ardell DH, Elofsson A. Structure is three to ten times more conserved than sequence--a study of structural response in protein cores. *Proteins*. 2009;77(3):499-508. doi: [10.1002/prot.22458](https://doi.org/10.1002/prot.22458).

Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. doi: [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2).

Lecordier L, Mercier C, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell*. 1999;10(4):1277-1287. doi: [10.1091/mbc.10.4.1277](https://doi.org/10.1091/mbc.10.4.1277).

Leineweber M, Spekker-Bosker K, Ince V, et al. First Characterization of the *Neospora caninum* Dense Granule Protein GRA9. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6746437. doi: [10.1155/2017/6746437](https://doi.org/10.1155/2017/6746437).

Levy, Emmanuel D et al. “3D complex: a structural classification of protein complexes.” *PLoS computational biology* vol. 2,11 (2006): e155. doi: [10.1371/journal.pcbi.0020155](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020155).

Li S, Gong P, Zhang N, et al. 14-3-3 Protein of *Neospora caninum* Modulates Host Cell Innate Immunity Through the Activation of MAPK and NF-κB Pathways. *Front Microbiol*. 2019;10:37. Published 2019 Jan 25. doi: [10.3389/fmicb.2019.00037](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00037).

LI, Z., Jaroszewski, L., Iyer, M., Sedova, M., & Godzik, A. FATCAT 2.0: Towards a better understanding of the structural diversity of proteins. *Nucleic Acids Research*, 48(1), W60–W64. 2020.

Lu Z., Zhang J, Zhou Y, et al. Functional characterization of three novel dense granule proteins in *Neospora caninum* using the CRISPR-Cas9 system. *Acta Trop*. 2024;256:107250. doi: [10.1016/j.actatropica.2024.107250](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107250).

McDowall J, Hunter S. InterPro protein classification. *Methods Mol Biol*. 2011;694:37-47. doi: [10.1007/978-1-60761-977-2_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-977-2_3).

Mercier C, Adjogble KD, Däubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. *Int J Parasitol*. 2005;35(8):829-849. doi: [10.1016/j.ijpara.2005.03.011](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011).

Mercier C, Cesbron-Delauw MF. Toxoplasma secretory granules: one population or more?. *Trends Parasitol*. 2015;31(2):60-71. doi: [10.1016/j.pt.2014.12.002](https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002).

MINEO,T. W.P. etal. Efficient Gene Knockout and Knockdown Systems in *Neospora caninum* enable rapid discovery and functional assessment of novel proteins. **mSphere**, v. 7, n. 1, p. e00896-21, 12 jan. 2022.

Nishikawa Y, Shimoda N, Fereig RM, et al. *Neospora caninum* Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(18):e01350-18. Published 2018 Aug 31. doi: [10.1128/AEM.01350-18](https://doi.org/10.1128/AEM.01350-18).

Olivella M, Gonzalez A, Pardo L, Deupi X. Relation between sequence and structure in membrane proteins. *Bioinformatics*. 2013;29(13):1589-1592. doi: [10.1093/bioinformatics/btt249](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt249)
Panas MW, Boothroyd JC. Seizing control: How dense granule effector proteins enable

Toxoplasma to take charge. *Mol Microbiol*. 2021;115(3):466-477. doi: [10.1111/mmi.14679](https://doi.org/10.1111/mmi.14679).

Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1760-1765. doi: [10.1073/pnas.0813167106](https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106).

REICHEL, M. P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L. F. P., & Ellis, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, 43(2), 133–142. 2013.

Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, et al. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002567. doi: [10.1371/journal.ppat.1002567](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002567).

Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng*. 1999;12(2):85-94. doi: [10.1093/protein/12.2.85](https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85).

SCHNEIDER,C.A.; RASBAND, W.S.;ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ:25 years of 27 image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SOHN, C. S., Cheng, T. T., Drummond, M. L., Peng, E. D., Vermont, S. J., Xia, D., Cheng, S. J., Wastling, J. M., & Bradley, P. J. Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. **PLoS ONE**, 6(4), 2011.

Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat Biotechnol*. 2022;40(7):1023-1025. doi: [10.1038/s41587-021-01156-3](https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3).

Varadi, M. et al. “AlphaFold Protein Structure Database in 2024: Providing structure coverage for over 214 million protein sequences.” *Nucleic Acids Research*, gkad1011 (2023). doi: [10.1093/nar/gkad1011](https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011).

von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res*. 1986;14(11):4683-4690. doi: [10.1093/nar/14.11.4683](https://doi.org/10.1093/nar/14.11.4683).

von Heijne G. How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol*. 1984;173(2):243-251. doi: [10.1016/0022-2836\(84\)90192-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90192-x).

Yang C, Liu J, Ma L, et al. NcGRA17 is an important regulator of parasitophorous vacuole morphology and pathogenicity of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*. 2018;264:26-34. doi: [10.1016/j.vetpar.2018.03.018](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.018).

Yang C, Wang C, Liu J, Liu Q. Biotinylation of the *Neospora caninum* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):521. Published 2021 Oct 9. doi: [10.1186/s13071-021-05023-7](https://doi.org/10.1186/s13071-021-05023-7).

Zinecker CF, Striepen B, Geyer H, Geyer R, Dubremetz JF, Schwarz RT. Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;116(2):127-135. doi: [10.1016/s0166-6851\(01\)00313-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00313-9).