

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVAS PROTEÍNAS
DE GRÂNULOS DENSOS DE *Neospora caninum*

JHOAN DAVID AGUILLÓN TORRES

UBERLÂNDIA, MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVAS PROTEÍNAS
DE GRANULOS DENSOS DE *Neospora caninum*

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

Jhoan David Aguillón Torres

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

UBERLÂNDIA, MG

2024

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

T693 2024	Torres, Jhoan David Aguillon, 1993- IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVAS PROTEÍNAS DE GRÂNULOS DENSOS DE <i>Neospora caninum</i> [recurso eletrônico] / Jhoan David Aguillon Torres. - 2024. Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.616 Inclui bibliografia. 1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-., (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título. CDU: 612.017
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicada
Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP
38400-902
Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 169				
Data:	24/09/2024	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	12:20
Matrícula do Discente:	11923IPA013				
Nome do Discente:	Jhoan David Aguillon Torres				
Título do Trabalho:	Identificação e caracterização funcional de novas proteínas de granulos densos de <i>Neospora caninum</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos Mecanismos de Reconhecimento Imunes Frente a Infecção pelos Protozoários <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>				

Em 24 de setembro de 2024, às 08:00 horas, via Webconferência, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos membros titulares: Presidente: Tiago Wilson Patriarca Mineo - ICBIM/UFU (Orientador do candidato); Ana Patrícia Yatsuda Natsui - FCFRP/USP; Sheila Cristina Nardelli - ICC/Fiocruz; Érica dos Santos Martins Duarte - ICB/UFMG; Samuel Cota Teixeira - ICBIM/UFU.

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

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

APROVADO

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/09/2024, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Cota Teixeira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/09/2024, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica dos Santos Martins Duarte, Usuário Externo**, em 24/09/2024, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Patricia Yatsuda Natsui, Usuário Externo**, em 26/09/2024, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sheila Cristina Nardelli, Usuário Externo**, em 30/09/2024, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5678468** e o código CRC **64742C41**.

A mis padres, Blanca y Wilson,

*quienes me dieron todas las herramientas para
construir una vida donde los sueños se cumplen. Por
enseñarme el valor del esfuerzo y la humildad. Gracias
por brindarme todo el apoyo y el amor que siempre
necesité durante las épocas más duras de la vida. Por
ser mi mayor ejemplo a seguir y mi más grande
orgullo...*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, e meu irmão Fabian, por me apoiar e acreditar em mim, pela paciência infinita;

A minha família no Brasil, ao Ian pelo grande apoio e companhia durante esses anos, Angela e Josimar pela grande amizade, sou grato de ter vocês na minha vida;

A Ana Paula, pela parceria e amizade, por fazer que a minha vida no Brasil se torne mais amena;

A todos os gringos que vieram comigo nessa aventura no Brasil, Carlos, Laura, Nelly, Brenda, Daniel e os outros tantos que me acompanharam, obrigado;

Aos amigos da vida, Sergio, Jorge, Caro, Eliana, que mesmo estando a quilômetros de distância sempre me motivaram e me acompanharam.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tiago Wilson Patriarca Mineo, que mesmo sem me conhecer me deu um voto de confiança para ingressar na equipe de trabalho para realizar o mestrado, obrigado por me acolher e me dar a oportunidade de aprender, pela paciência e por ser um exemplo a seguir;

À Profa. Caroline Mota, quem me acolheu nos primeiros anos no Brasil, me ensinou e esculpiu em mim o pesquisador que sou agora, obrigado pelos puxões de orelha!

Ao Prof. José Roberto Mineo e à Profa. Fernanda Santiago, que estiveram sempre presentes no laboratório quando precisei, pelos ensinamentos e os pensamentos críticos;

Aos amigos do laboratório, Ana Paula, Carolina, Débora, Ruth, Bruna, Álefe, Isabel, Melissa, Beatriz, Arthus, Marya Fernanda, João Vitor e Bianca, por me apoiar em momentos críticos e de estresse, ajuda nos experimentos, pelos momentos de alegria e as boas conversas;

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Dr Mário Endsfieldz Camargo, Ana Claudia, Henrique, Zilda, Cris, pelo apoio na rotina do laboratório;

Ao Max, pela atenção e os cafês;

Às agências brasileiras de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG

Ao Brasil, por virar meu lar.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário que pertence ao filo Apicomplexa, possuindo uma distribuição global sendo o agente etiológico da neosporose. Parasitas do filo Apicomplexa, requerem a formação de um vacúolo parasitóforo (VP) para a replicação e a manutenção da infecção dentro do hospedeiro. A formação do VP depende de uma maquinaria de secreção de proteínas coordenada a partir de organelas como as micronemas, Roptrias e Grânulos Densos. As proteínas de grânulos densos (GRAs), são proteínas essenciais para o manutenção da estrutura do VP, já que regula a estrutura, aquisição de nutrientes e são capazes de regular a expressão gênica e o ciclo celular do hospedeiro. Pouco se sabe sobre as GRAs de *N. caninum*, por tal motivo, no presente trabalho, objetivou-se investigar sobre a diversidade e o papel das GRAs de *N. caninum* para conhecer e elucidar suas funções biológicas e seu papel na interação parasita-hospedeiro. Utilizando abordagens *in silico*, foi determinada a diversidade destas proteínas através de análises comparativas com o organismo modelo *T. gondii*. Posteriormente, a estratégia de BioID foi empregada para confirmar as GRAs preditas. Com a finalidade de melhor entender o papel biológico de algumas GRAs, utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, cinco proteínas foram estudadas, por meio de marcação endógena e ablação gênica. Finalmente, os parasitas geneticamente deficientes para as GRAs alvo foram utilizados para estudar o papel na replicação parasitária, modulação da virulência e a resposta imune do hospedeiro. Um total de 145 GRAs foram identificadas a partir da ortologia com *T. gondii*, das quais, 81 foram identificadas no ensaio de BioID, confirmando assim a presença dessas GRAs em *N. caninum*. Foram selecionadas as proteínas GRA48, GRA62, GRA83, NSG1 e a proteína hipotética NCLIV_001830, como alvo para as posteriores análises. Assim, todas as proteínas foram localizadas no VP. Foi demonstrado que a GRA48, GRA62, GRA83, e NCLIV_001830 estão envolvidas na replicação parasitária. A NCLIV_001830 foi identificada como uma GRA que transloca ao núcleo e junto com a GRA62 são capazes de regular a expressão gênica de *Nos2* e *Nox2*. Em BMDMs exceptuando a GRA48, as GRAs foram capazes de regular a liberação de IL12. Em modelos murinos, foi confirmado que as GRAs selecionadas regulam a virulência do parasita e estão relacionadas com a morbidade da doença. Conclui-se que as GRAs de *N. caninum* são um grupo de proteínas essenciais para a biologia parasitária, sendo essenciais para os processos de replicação do parasita, virulência nos hospedeiros e regulação da resposta imune, assim, o conhecimento e pesquisas futuras sobre estas proteínas é indispensável para compreender a biologia do parasita e sua relação com o hospedeiro, sendo pontos de partida para pesquisas que permitam desenvolver estratégias de prevenção e profilaxia da neosporose.

PALAVRAS CHAVE: Grânulos Densos, Vacúolo Parasitóforo, Neosporose, CRISPR/Cas9, Ortologia.

ABSTRAC

Neospora caninum is a protozoan that belongs to the Apicomplexa phylum, with a global distribution and serving as the etiological agent of neosporosis. Apicomplexan parasites require the formation of a parasitaphorous vacuole (PV) for replication and maintenance of infection within the host. The formation of the PV depends on a coordinated protein secretion machinery from organelles such as micronemes, rhoptries, and dense granules. Dense granule proteins (GRAs) are essential for maintaining the structure of the PV, as they regulate its architecture, nutrient acquisition, and can modulate host gene expression and cell cycle. Little is known about the GRAs of *N. caninum*, which is why this study aimed to investigate the diversity and role of *N. caninum* GRAs to elucidate their biological functions and their role in parasite-host interactions. Using *in silico* approaches, the diversity of these proteins was determined through comparative analyses with the model organism *T. gondii*. Subsequently, the BioID strategy was employed to confirm the predicted GRAs. To better understand the biological role of specific GRAs, five proteins were studied using CRISPR/Cas9 technology, through endogenous tagging and gene knockout. Finally, genetically modified parasites deficient in the target GRAs were used to study their roles in parasitic replication, virulence modulation, and host immune response. A total of 145 GRAs were identified based on orthology with *T. gondii*, of which 81 were confirmed by BioID, validating their presence in *N. caninum*. The proteins GRA48, GRA62, GRA83, NSG1, and the hypothetical protein NCLIV_001830 were selected for further analysis. All these proteins were localized in the PV. It was demonstrated that GRA48, GRA62, GRA83, and NCLIV_001830 are involved in parasitic replication. NCLIV_001830 was identified as a GRA that translocates to the nucleus and, along with GRA62, is capable of regulating the expression of *Nos2* and *Nox2*. In BMDMs, except for GRA48, the GRAs were able to regulate the release of IL-12. In murine models, it was confirmed that the selected GRAs regulate parasite virulence and are related to disease morbidity. It is concluded that *N. caninum* GRAs are a group of proteins essential for parasitic biology, crucial for parasite replication, host virulence, and immune response regulation. Therefore, understanding and further research on these proteins are essential for comprehending the parasite's biology and its relationship with the host, providing a foundation for developing prevention and prophylactic strategies for neosporosis.

KEYWORDS: Dense Granules, Parasitaphorous Vacuole, Neosporosis, CRISPR/Cas, Orthology.

LISTA DE ABREVIATURAS

VP-Vacúolo Parasitóforo

SAG- Glicoproteínas Antígenos de Superfície

SRS- Sequencia relacionada com SAG

MICs-Micronemas

ROPs-Roptrias

RONs-Proteína do Anel Apical

GRAs-Proteínas de grânulos densos

JM-Junção Móvel

MVP-Membrana do Vacúolo Parasitóforo

MAR- Domínio de Repetição de Micronemas

TSP- Domínios relacionado à Trombospondina

EGF-Fator de Crescimento Epidérmico

STAT3-Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3

BMDM- Macrófagos derivados de medula óssea

SNC- Sistema nervoso central

DPI-Dia pós infecção

kDA-kilodaltons

BioID-Identificação por Biotina

TLR- Receptores tipo Toll

MyD88- Proteína da Resposta Primária à Diferenciação Mieloide 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agrupação taxonômica e código de acesso ao genoma das espécies utilizadas na filogenia construída a partir das GRAs.....	34
Tabela 2. Lista de gRNA desenhados no EuPaGDT das GRAs alvo.	36
Tabela 3. Oligonucleótidos usados como braços de homologia para a incorporação do DNA de reparo.	38
Tabela 4. Primers utilizados para a PCR quantitativa.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> . Original de DUBEY et al., 2017.	20
Figura 2. As GRAs estão presentes no filo apicomplexa e relacionam filogeneticamente os Coccideos.	49
Figura 3. Existe uma grande diversidade de GRAs ortólogas de <i>N. caninum</i> com padrões de conservação divergente nos genomas dos parasitas..	52
Figura 4. As GRAs apresentam semelhanças e diferenças estruturais entre os parasitas <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	54
Figura 5. O ensaio de BioID revelou uma diversidade de GRAs ainda não descritas para <i>N. caninum</i>	56
Figura 6. O etiquetado endógeno das GRAs revela a localização no VP das proteínas.	58
Figura 7. Ensaios <i>in vitro</i> revelam a importância da GRA48 na virulência do parasita.....	60
Figura 8. GRA48 tem um papel na invasão e replicação inicial de <i>N. caninum</i> em modelos murinos.	62
Figura 9. A GRA48 de <i>N. caninum</i> está relacionada diretamente com a cronicidade da neosporose.	63
Figura 10. GRA62 é uma proteína efetora chave na virulência de <i>N. caninum</i>	65
Figura 11. A GRA62 participa na replicação de <i>N. caninum</i> durante as fases hiperagudas e agudas da infecção.....	67
Figura 12. A GRA62 desempenha um papel na disseminação do parasita ao SNC.	68
Figura 13. NCLIV_001830 é exportada ao núcleo da célula hospedeira.	69
Figura 14. NCLIV_001830 modula a replicação e a virulência de <i>N. caninum</i>	71
Figura 15. NCLIV_001830 está relacionada com a replicação parasitaria na fase aguda da infecção.....	73
Figura 16. A NCLIV_001830 de <i>N. caninum</i> está relacionada com a cronicidade da neosporose..	74
Figura 17. A replicação e liberação de IL12p40 são alterados na ausência de GRA83.....	76
Figura 18. A GRA83 modula a liberação de IL12 durante a progressão da infecção por <i>N. caninum</i>	78
Figura 19. A GRA83 regula a virulência e o estabelecimento da infecção crônica de <i>N. caninum</i>	79

Figura 20. NSG1 não está relacionada com a virulência <i>in vitro</i> mas sim com a produção de IL12.	81
Figura 21. A NSG1 não desempenha um papel direto na fase inicial da infecção..	83
Figura 22. A proteína NSG1 regula a patogenicidade de <i>N. caninum</i>	84

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	15
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 NEOSPORA CANINUM O AGENTE ETOLÓGICO	19
1.2 CICLO BIOLÓGICO.....	19
1.3 CICLO LÍTICO	21
1.3.1 Micronemas	22
1.3.2 Roptrias.....	23
1.3.3 Grânulos Densos.....	24
1.4 RESPOSTA IMUNE.....	26
1.4.1 GRAs de <i>N. caninum</i> , um grupo de moléculas efetoras do sistema imune	30
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	33
4.1.1 Construção de uma base de dados de GRAs	33
4.1.2 Análise filogenética	33
4.1.3 Análise de sintenia entre ortólogos de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	34
4.1.4 Comparações estruturais e alinhamentos.....	35
4.2 CULTURA DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS E PARASITAS	35
4.3 GERAÇÃO DE PARASITAS MODIFICADOS GENETICAMENTE.....	35
4.3.1 Desenho, Anelamento de gRNAs e Ligação ao vector.....	35
4.3.2 Transformação de bactérias termocompetentes	36
4.3.3 Purificação de vectores	37
4.3.4 Preparação do DNA de reparo com braços de homologia.....	37

4.3.5 Purificação do DNA de reparo por Fenol-Clorofórmio.....	39
4.3.6 Eletroporação de parasitas	39
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE GRAS DE <i>N. CANINUM</i> POR BIOTINILAÇÃO DE PROXIMIDADE (BioID).....	40
4.4.1 Captura por afinidade de proteínas biotinadas	40
4.4.2 Espectrometria de massas	41
4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA	41
4.6 ENSAIO DE PLACA.....	42
4.7 CAMUNDONGOS E COMITÊ DE ÉTICA	42
4.8 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMDM)	42
4.9 INFECÇÃO POR <i>N. CANINUM</i> EM BMDMs	43
4.10 GERAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE BMDM INFECTADOS POR <i>N. CANINUM</i>.....	43
4.10.1 Extração de RNA.....	43
4.10.2 Tratamento de RNA com DNase	44
4.10.3 Síntese de cDNA (Retrotranscrição).....	44
4.11 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	44
4.12 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	45
4.13 PCR QUANTITATIVA (QPCR)	45
4.14 QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA IL-12p40	46
4.15 QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	47
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 AS GRAS ESTÃO PRESENTES NO FILO APICOMPLEXA ESTABELECENDO RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE <i>N. CANINUM</i> E <i>T. GONDII</i>	48
5.2 OS GENES DAS GRAS DE <i>N. CANINUM</i> E <i>T. GONDII</i> SÃO ALTAMENTE SINTÊNICOS	

5.3 AS GRAS ORTÓLOGAS ENTRE <i>N. CANINUM</i> E <i>T. GONDII</i> APRESENTAM DIFERENÇAS ESTRUTURAIS EM QUANTO A SUA CONFORMAÇÃO SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA	51
5.4 ENSAIO DE BIOTINILAÇÃO POR PROXIMIDADE IDENTIFICOU UMA GRANDE DIVERSIDADE DE GRAS DE <i>N. CANINUM</i>.....	55
5.5 IDENTIFICAÇÃO DE GRAS DE <i>N. CANINUM</i> POR IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	57
5.6 A GRA48 TEM UM PAPEL NA VIRULÊNCIA DO PARASITA <i>IN VITRO</i>, MAS NÃO REGULA FATORES CRÍTICOS DE RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO	59
5.7 A GRA48 DE <i>N. CANINUM</i> É NECESSÁRIA PARA A REPLICAÇÃO DURANTE A INFECÇÃO INICIAL DO HOSPEDEIRO	61
5.8 A AUSÊNCIA DE GRA48 ATENUA O IMPACTO DA INFECÇÃO E ESTÁ RELACIONADA COM O ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO CRÔNICA.....	63
5.9 GRA62 É UM FATOR ESSENCIAL PARA A VIRULÊNCIA <i>IN VITRO</i> E PARA A REGULAÇÃO DE MRNA DE <i>Nos2</i> E A LIBERAÇÃO DE IL12.....	64
5.10 A GRA62 DE <i>N. CANINUM</i> É ESSENCIAL PARA A VIRULÊNCIA DO PARASITA NAS FASES HIPERAGUDA E AGUDA DA INFECÇÃO	66
5.11 GRA62 NÃO É NECESSÁRIA PARA O IMPACTO NA MORBIDADE, MAS DESEMPENHA UM PAPEL CRUCIAL NA CRONICIDADE DA INFECÇÃO	68
5.12 A PROTEÍNA HIPOTÉTICA NCLIV_001830 É UMA GRA QUE É EXPORTADA AO NÚCLEO DA CÉLULA HOSPEDEIRA	69
5.13 A GRA NCLIV_001830 REGULA A EXPRESSÃO DE MRNA, LIBERAÇÃO DE IL12p40 ASSIM COMO A REPLICAÇÃO DE <i>N. CANINUM</i>.....	70
5.14 A AUSÊNCIA DE NCLIV_001830 NÃO ALTERA O PARASITISMO NA FASE HIPERAGUDA NEM A LIBERAÇÃO DE IL12p40 E NO PERITONEAL	72
5.15 A AUSÊNCIA DE NCLIV_001830 REDUZ O IMPACTO DA INFECÇÃO E FACILITA ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO CRÔNICA	74
5.16 A GRA83 DE <i>N. CANINUM</i> ESTÁ RELACIONADA COM A REPLICAÇÃO DO PARASITO EM CÉLULAS HFF E A PRODUÇÃO DE IL12p40 EM BMDMs	75
5.17 O IL12p40 PERITONEAL É REDUZIDO NA AUSÊNCIA DE GRA83 DURANTE A INFECÇÃO AGUDA	77

5.18 A GRA83 É NECESSÁRIA PARA O IMPACTO DA DOENÇA EM MODELOS MURINOS E PARA O ESTABELECIMENTO DA CRONICIDADE	79
5.19 A GRA ESPECIFICA DE <i>N. CANINUM</i>, NSG1, REGULA A LIBERAÇÃO DE IL12 DE BMDMs	80
5.20 A NSG1 NÃO TEM UM PAPEL DIRETO NA INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO DURANTE AS FASES INICIAIS DA INFECÇÃO	82
5.21 A AUSÊNCIA DE NSG1 ALTERA O IMPACTO DA INFECÇÃO E NÃO SE RELACIONA COM A CRONICIDADE DA DOENÇA	84
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO	95
BIBLIOGRAFIA	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum* o agente etiológico

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, sendo filogeneticamente relacionado com *Toxoplasma gondii* e fazendo parte da família Sarcocystidae. *N. caninum* foi inicialmente observado em lesões de cães com quadro de miosite e encefalite, apresentando mínimas diferenças ultraestruturais com *T. gondii*, como a presença de um maior número de roptrias (DUBEY et al., 2017). Posteriormente, num estudo retrospectivo em cães com sinais neurodegenerativos, foi reconhecido *N. caninum* como uma nova espécie de patógeno formador de merozoítos no sistema nervoso central e que não reage ao soro anti-*Toxoplasma* (DUBEY et al., 1988; LINDSAY; DUBEY, 2020).

N. caninum é o agente etológico da Neosporose, uma doença veterinária de alto impacto econômico a nível global já que se encontra ubiquitariamente distribuído na natureza e é capaz de infectar uma grande variedade de organismos homeotermos, incluindo espécies das ordens carnívora, artiodactyla, perisodactyla, rodentia, proboscidea algumas ordens de marsupiais como didephimorphia e algumas de aves, como galiformes, psitaciformes, accipitriformes, entre outros (DONAHOE et al., 2015).

1.2 Ciclo biológico

N. caninum apresenta um ciclo de vida heteróximo (Figura 1), onde as fases sexuadas e assexuadas se desenvolvem em diferentes hospedeiros. A fase sexuada, ocorre estritamente em espécies da família Canidae, como cães (*Canis familiaris*), lobos cinza (*Canis lupus*) e coiotes (*Canis latrans*) (DUBEY et al., 2017). Por outro lado, a fase assexuada ocorre em diferentes possíveis hospedeiros intermediários como animais domésticos e silvestres, tais como vacas, gatos, porcos, raposas, alpacas, entre outros (DONAHOE et al., 2015; DUBEY et al., 2017; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Oocistos não esporulados de parede robusta são liberados nas fezes de canídeos infectados com *N. caninum*, sendo que a parede do oocisto permite que os esporozoítos sobrevivam num ambiente externo por longos períodos de tempo (DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007). Sob condições adequadas de umidade e disponibilidade de oxigênio, os oocistos não esporulados passam por um processo de esporogonia, onde os oocistos

esporulam para conter dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (DUBEY et al., 2002).

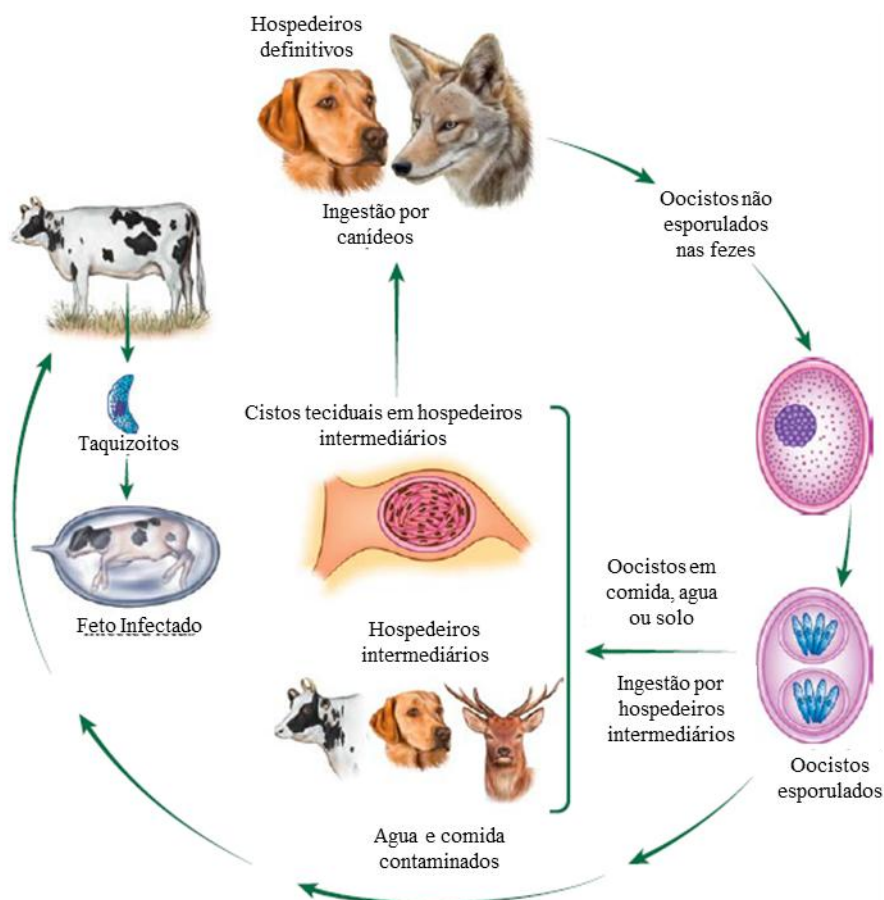


Figura 1. Ciclo biológico de *Neospora caninum*. Original de DUBEY et al., 2017.

Hospedeiros intermediários, como ruminantes, podem ingerir água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados. Mediante um processo de excistamento, os esporozoítos são liberados na parede do intestino do hospedeiro, tornando-se taquizoítos. Os taquizoítos, se replicam por endodiogenia dentro de um compartimento especializado intracelular denominado vacúolo parasitóforo (VP). Os taquizoítos são a forma de rápida replicação e são capazes de infectar diferentes tipos de células do hospedeiro, como células neuronais, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais vasculares, musculares e hepáticas, disseminando-se rapidamente pelo organismo do hospedeiro (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Como mecanismo de evasão da resposta imune dos hospedeiros, *N. caninum*

sofre um processo de conversão de estágio a bradizoíto, uma forma biológica de replicação lenta que se aloca em tecido nervoso e musculoesquelético podendo persistir no hospedeiro sem manifestações clínicas (DUBEY et al., 2017; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006; SOKOL-BORRELLI; COOMBS; BOYLE, 2020).

Já os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerir tecidos nervosos ou musculares contendo cistos teciduais, que liberarão os bradizoítos ao epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, iniciando a formação de esquizontes e a liberação de merozoítos no organismo, sendo assim a principal via de transmissão horizontal do parasita (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

No caso da transmissão vertical do parasita, *N. caninum* é capaz de se propagar transplacentalmente em gado, cães, ovelhas, cabras, macacos, suínos, gatos e roedores. Na transmissão transplacentária, os taquizoítos atravessam a placenta para infectar o feto. Aqui, inicialmente ocorre uma rápida multiplicação dos taquizoítos na parte materna da placenta e posteriormente são disseminados ao feto depois da segunda semana de infecção (DUBEY et al., 2017). A transmissão transplacentária pode ocorrer em infecções adquiridas pós-natalmente pela ingestão de oocistos (exógena) ou pela reativação da infecção em uma vaca cronicamente infectada (endógena) (DUBEY; SCHARES, 2011).

Sabe-se que na fase sexual do ciclo biológico os canídeos não produzem uma quantidade significativa de oocistos nas fezes. Dada a estreita associação dos cães com o gado, a probabilidade de transmissão é significativamente elevada porque os parasitas se propagam entre hospedeiros definitivos e intermediários por um longo período de tempo no mesmo rebanho. Este ciclo de transmissão localizado entre o gado e os cães, através da reprodução assexuada e sexuada, provavelmente está moldando a estrutura populacional do parasita (DUBEY et al., 2017; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; KHAN et al., 2020).

1.3 Ciclo lítico

O primeiro passo para que *N. caninum* ingresse na célula hospedeira é o estabelecimento de um contato de baixa afinidade entre as superfícies da membrana do taquizoíto e da célula hospedeira. O contato de baixa afinidade é mediado através das Glicoproteínas de Antígenos de Superfície (SAGs), principalmente as SAG1 e SRS2 que se associam com a membrana

plasmática através de um ancora de GPI (DUBEY et al., 2017; HEMPHILL et al., 2013; SCHARES et al., 2000). Posteriormente, há uma reorientação perpendicular contra a membrana do hospedeiro por parte do taquizoíto, estabelecendo uma associação mais estável onde inicia uma secreção sequencial de proteínas provenientes de organelas especializadas, como as micronemas (MICs), Roptrias (ROPs) e Proteínas de Grânulos Densos (GRAs) através da extrusão do conoide dentro do VP em formação e o citoplasma da célula hospedeira. Aqui, a membrana externa do parasita forma uma zona de adesão firme junto com a membrana do hospedeiro em auxílio das MICs que agem como adesinas formando uma zona de junção móvel (JM). A JM se desliza em direção à área posterior do parasita, invaginando-o completamente dentro do PV.(DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; LI et al., 2015). A membrana do hospedeiro forma então a Membrana do Vacúolo Parasitóforo (MVP) com a exclusão de proteínas de transmembrana inibindo assim a fusão do VP com os lisossomos. Após a invasão, o lúmen do PV, assim como sua membrana, é extensamente modificado através de produtos secretórios, originados principalmente das organelas Roptrias e Grânulos densos. (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002).

1.3.1 Micronemas

As MICs de *N. caninum* contém domínios de adesão conhecidos em vertebrados que funcionam como domínios de interação com receptores de superfície da célula hospedeira. Destaca-se que proteínas como a MIC1 e a MIC13 de *N. caninum*, contém domínios de repetição de micronemas (MAR) que ligam especificamente a oligossacarídeos sialilados da membrana (FRIEDRICH et al., 2010) e domínios relacionados à trombospondina (TSP), necessários para a união a glicosaminoglicanos sulfatados da superfície da célula, sendo ambas MICs indispensáveis para a adesão de *N. caninum* e posterior invasão celular (KELLER et al., 2002).

Outras MICs descritas para *N. caninum* necessárias para a adesão celular são a MIC2, cuja secreção é dependente de cálcio, e que tem cinco repetições do domínio TSP e um domínio de semelhante à Integrina de Tipo I (LOVETT; HOWE; SIBLEY, 2000), a MIC3 e MIC6 com domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) que são translocadas à região posterior do taquizoíto quando o parasita inicia o processo de invasão (LI et al., 2015; NAGULESWARAN et al., 2001; WANG et al., 2021b). Adicionalmente, domínios de ligação

a lactose foram descritos para a proteína MIC4, mostrando que é capaz de se ligar a glicosaminoglicanos sulfatados de células vero e é expressa no processo de invasão do parasita à célula hospedeira (KELLER et al., 2004).

Sabe-se que as MICs são implantados e funcionam como complexos protéicos (JIMENEZ-RUIZ et al., 2016). Em *N. caninum*, MIC8, que contém um domínio EGF interage em sua forma madura com MIC3 para ser transportadas e participar ativamente no processo de adesão celular (WANG et al., 2017). Por fim, outras MICs tem sido descritas para *N. caninum*, como a MIC10, a SPATR (proteína de esporozoíto com repetições alteradas de trombospondina), a PDI (Proteína disulfeto isomerasa) e a SUB1, todas com ação proteolítica cuja secreção aumenta no processo de adesão à célula hospedeira (DUBEY et al., 2017).

1.3.2 Roptrias

Após a formação da JM, começa o processo de invasão de *N. caninum*, onde é necessária a actina do parasita para uma eficiente invasão à célula hospedeira. Simultaneamente, proteínas ROP são injetadas dentro do citoplasma da célula no sítio de invasão. Sabe-se que algumas ROPs remanentes se associam com pequenas vesículas que serão fusionadas com a MVP em desenvolvimento e outras permanecem solúveis e são direcionadas para outros locais na célula hospedeira (DUBEY et al., 2017).

As ROPs têm um papel fundamental na biologia parasitária, sendo importantes fatores de virulência de *N. caninum*. As proteínas da família das ROP2 são as mais analisadas. A ROP40, membro da família ROP2, se localiza nos bulbos da Roptrias tanto em taquizoítos como em bradizoítos, e junto com a ROP2Fam-1 que localiza com os bulbos e o MVP em desenvolvimento (ALAEDDINE et al., 2013), apresentam elevados níveis de expressão de mRNA após o egresso dos taquizoítos e o início precoce da invasão (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2016a).

Através de análises de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem (LC/MS-MS) foi possível identificar novas ROPs e RONS, tais como a ROP1, ROP8, ROP30 e RON2 RON3, RON4, e RON8, todas presentes como componentes dos bulbos das Roptrias e que podem ter um potencial imunomodulador (MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Outras ROPs descritas para *N. caninum* com alta relevância na interação parasita-hospedeiro, são a ROP5, que é necessária para os taquizoítos invadirem a célula hospedeira assim como um possível regulador da expressão gênica de GRA7 (MA et al., 2017a); e a ROP16, necessária para a replicação intracelular parasitária assim como para a patogenicidade do parasita porque é participa na fosforilação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) para que este seja translocado até o núcleo da célula hospedeira (MA et al., 2017b).

1.3.3 Grânulos Densos

Diferentes grupos de proteínas secretoras, como as GRAs, são liberadas dentro do VP uma vez que o processo de invasão é culminado. Assim, algumas GRAs tem sido identificadas como componentes da rede membranosa do VP, um componente da matriz do mesmo que provê um compartimento metabolicamente adequado que favorece a replicação. Por outro lado, algumas GRAs podem ser essenciais já que modificam a MVP e contribuem na resistência da fusão com os lisossomos do hospedeiro (DUBEY et al., 2017).

Inicialmente, GRAs de *Neospora* foram caracterizadas como antígenos imunodominantes usando soro de gado infectado com o parasita. A GRA7, uma proteína de 33 kDa, foi descrita e associada aos grânulos densos em taquizoítos (LALLY et al., 1997). Após a invasão, a proteína migra para a MVP e que posteriormente pode ser observada como componente da rede membranosa do VP (HEMPHILL et al., 1998). Da mesma forma, a GRA7 foi caracterizada pela primeira vez associada aos grânulos densos em taquizoítos (LIDDELL et al., 1998) e proposta como um marcador de diagnóstico diferencial entre *N. caninum* e *N. hughesi* (WALSH et al., 2001).

Durante a inter-conversão de taquizoíto para bradizoíto, o VP se transforma num cisto tecidual, onde as GRAs têm um papel fundamental. A proteína Antígeno de Matriz 1 (MAG1) foi detectada no lúmen do VP e quando analisados em cistos teciduais induzidos com tratamento de nitropussiato de sódio (SNP), observou-se que a proteína fazia parte tanto da matriz como da parede do cisto (GUIONAUD et al., 2010). Usando uma Eletroforese Diferencial *In-Gel* acoplada a espectrometria de massas de extratos de taquizoítos e de bradizoítos, observou-se que a proteína GRA9 é altamente presente no estágio de bradizoíto (MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2010). GRA9 foi posteriormente caracterizada por

imunofluorescência (IFA), o que confirmou sua presença no VP e sua associação aos grânulos densos (LEINEWEBER et al., 2017).

Estudos recentes vêm caracterizando funcionalmente as GRAs de *N. caninum*, tanto seu papel na patogenicidade e virulência, como na resposta imune frente aos hospedeiros. GRAs membros do grupo das NTPases, apresentam um perfil de expressão tempo dependente, estando estreitamente relacionado com o ciclo de invasão e egresso do parasita (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2016b). Por outro lado, GRA7 e GRA14 estão relacionadas a ativação de NF- κ B, a via de cálcio/calcineurina e a via cAMP/PKA, sendo que, principalmente GRA7 regula a expressão de citocinas como interferon Gamma (IFN- γ) e quimiocinas como CXCL10 e CCL2 em modelos *in vivo* (NISHIKAWA et al., 2018; WANG et al., 2021a). GRA6 é necessária para a normal replicação intracelular assim como para a virulência em modelos murinos (ZHAO et al., 2020).

GRA17 encontra-se relacionada à morfologia do VP e a capacidade replicação do parasita, já que em ausência da proteína, *N. caninum* não tem a mesma capacidade de replicação diminuindo assim a patogenicidade em camundongos BALB/c (YANG et al., 2018). Da mesma forma, a proteína GRA de *N. caninum* é essencial para a formação da estrutura da rede membranosa do PV e para a virulência em camundongos, evidenciando uma diminuição da carga parasitária, tempo prolongado de sobrevivência e diminuição de danos histopatológicos em camundongos infectados com *N. caninum* geneticamente deficientes para GRA2 (DONG et al., 2021a).

Os avanços rápidos na engenharia genética têm melhorado a caracterização e descrição de novas proteínas GRAs, o que facilita o melhor entendimento da diversidade dessa família de proteínas e seu papel fundamental na biologia parasitária. Assim, proteínas exclusivas como a GRA específica de *Neospora* 1 (NSG1) ou proteínas preditas para outros organismos como a GRA48, tem sido caracterizadas como GRAs presentes no VP de *N. caninum* (MINEO et al., 2022). Além disso, usando metodologias de proteômica, também tem sido caracterizadas diversas GRAs como a GRA23, a família das GRA11, GRA25, GRA27, GRA38, GRA48, e GRA61, todas constituintes do lúmen do VP (YANG et al., 2021a).

Outras GRAs, previamente descritas são; a GRA12 que encontra-se localizada na MVP (DONG et al., 2021b) e a GRA3 encontra-se tanto na rede membranosa do VP e na MVP (ZHAO et al., 2021).

1.4 Resposta imune

Componentes inatos e adquiridos do sistema imune são fundamentais contra a infecção por *N. caninum*. A primeira linha de reconhecimento inato é realizada por receptores de reconhecimento padrão (PRR). Sabe-se que tanto taquizoítos de *N. caninum* como antígenos derivados são eficientes na ativação desses receptores.

Em células trofoblásticas bovinas e células carunculares, foi demonstrado que taquizoítos de isolados virulentos (Nc-Spain7) e isolados pouco virulentos (Nc-Spain1H) são capazes de induzir a expressão do mRNA do receptor TLR2 além de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-12p40, IL17, IFN- γ e TNF- α (JIMÉNEZ-PELAYO et al., 2019). Em macrófagos murinos derivados de medula óssea, viu-se que vesículas extracelulares de *N. caninum* são capazes de estimular a produção de IFN- γ e IL-12 via TLR2 e que o receptor é necessário para a fosforilação de p38, ERK e JNK na infecção contra o protozoário (LI et al., 2018). Além do anterior, sabe-se que moléculas como o glicosilfosdatidilinositol (GPI) de *N. caninum* é capaz de potenciar a atividade de TLR2 e TLR4 estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos e células dendríticas (DÉBARE et al., 2019). O TLR3, também tem sido estudado na interação parasita hospedeiro e na infecção por *N. caninum*. Foi observado, que o receptor é necessário para a produção de IL-12p40, IFN- γ e TNF após a infecção pelo protozoário e além disso, que o RNA do *Neospora* é capaz de induzir o recrutamento do TLR3 ao VP (MIRANDA et al., 2019). Em macrófagos peritoneais infectados com taquizoítos de *N. caninum* dos isolados Nc-I e Nc-Liv, observou-se que a ativação da via ERK induz a produção de IL12p40 pela presença do TLR11 (JIN et al., 2017). Por fim, estudos feitos para avaliar a matriz materno-fetal em bovinos, demonstraram que taquizoítos assim como proteínas recombinantes de *N. caninum* com a SAG1, GRA7 e a proteína de choque térmico HSP20 ativam TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 (MARIN et al., 2017a, 2017b).

Por outro lado, uma família de receptores de PRR, conhecida como NLRs- Receptores de Tipo NOD (Domínio de Oligomerização de Ligação a Nucleotídeos), apresentam um papel

fundamental no controle parasitário inato nas infecções por *N. caninum*. O receptor NOD2 apresenta um aumento na expressão de mRNA após a infecção e foi observado que em macrófagos derivados de medula de camundongo, é recrutado ao VP sendo um importante regulador da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , assim como a citocina anti-inflamatória IL-10 (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). Além disso, sabe-se que em macrófagos derivados de medula óssea infectados com taquizoítos de *N. caninum*, a presença dos receptores NLRP3 e NLRC4 são requeridos para a ativação do inflamossoma e a produção de citocinas como IL-1 β , IL-18 e IL1 α que participam na piroptose celular e no controle parasitário (MOTA et al., 2020).

Em quanto aos receptores de lectina do tipo C (CLR), foi observado que o receptor de Dectina-1, presente nas membranas dos macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, participa no reconhecimento de *N. caninum* em modelos murinos, sendo chave na regulação de citocinas como IL-12p40 e é um alvo potencial de profilaxia já que a inibição do receptor tem um efeito protetor durante a infecção por *N. caninum* (DA SILVA et al., 2017). Por outro lado, observou-se que receptores de quimiocina CC5 (CCR5) são necessários para a migração de macrófagos quando estimulados com antígenos secretados de *N. caninum* (ESAs) sendo um receptor essencial para a disseminação do parasita em diferentes tecidos (MINEO et al., 2010).

Após o reconhecimento pelos múltiplos receptores que participam na matriz de resposta contra a infecção por *N. caninum*, as vias de sinalização definirão as possíveis moléculas efetoras que serão essenciais para o combate da infecção pelo protozoário. A via de sinalização de NF- κ B é aparentemente a cascata principal na manipulação da infecção por *N. caninum* (FEREIG; NISHIKAWA, 2020). A função inflamatória de NF- κ B tem sido extensivamente estudada em macrófagos e, sabe-se que em resposta a diferentes PAMPs ou DAMPs as células rapidamente são capazes de se diferenciar fenotipicamente em macrófagos classicamente ativados M1 e alternativamente ativados M2. Os macrófagos M1 produzem citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF e quimiocinas assim como também promovem a diferenciação de células T inflamatórias como as Th1 e Th17. Em contraste, os macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-13 importantes para a diminuição da inflamação. Aqui, os sinais dos TLR possuem um papel fundamental na

regulação da polarização fenotípica dos macrófagos, sendo dependentes de adaptadores como o fator de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e a molécula adaptadora 1 contendo o domínio TIR (TRIF) (LIU et al., 2017). Na resposta imune frente *N. caninum*, observou-se que a molécula adaptadora Myd88 acoplada a TLR2 está associada a uma resposta mediada por IFN- γ em camundongos C57BL/6 assim como a produção de IL-12 por parte das células dendríticas (MINEO et al., 2009).

A via de sinalização das proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é amplamente estudada na resposta imune frente a *N. caninum*. Quando macrófagos peritoneais murinos foram estimulados com a proteína recombinante de *N. caninum* 14-3-3, notou-se que houve ativação das vias de MAPK e AKT, dependente da fosforilação de p38, ERK, e JNK, sendo indispensáveis para a expressão de TNF α , IL-12p40 e IL-6 (LI et al., 2019). Da mesma forma, em macrófagos derivados de medula óssea, a produção de IFN- γ e IL-1 β é mediada pela via das MAPK (LI et al., 2018). Em BMDM, p38 mostrou que é fosforilada após estimulação tanto por taquizoítos vivos, antígeno secretado e antígeno solúvel via receptores acoplados a proteína G, sendo uma via essencial para a regulação da secreção de IL-12p40 (MOTA et al., 2016).

As moléculas efetoras envolvidas na resposta frente a infecção por *N. caninum* mais estudadas são um conjunto de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Estas moléculas e compostos são secretados pelo hospedeiro para controlar a proliferação e disseminação do parasita. Sabe-se que o grau de resposta dependerá de fatores críticos relacionados ao hospedeiro, virulência do parasita ou fatores intrínsecos do modelo experimental (FEREIG; NISHIKAWA, 2020).

A molécula central secretada pelos hospedeiros infectados por *N. caninum*, que desencadeia uma resposta imune protetora é o IFN- γ . Em um modelo murino com camundongos C57BL/6, estudou-se o papel protetor de IFN- γ produzido por células T CD8 $^{+}$ ao ser desafiados com *N. caninum* e observou-se que em camundongos deficientes de T CD8 $^{+}$ que não expressavam IFN- γ , os camundongos sucumbiam facilmente a infecção. Em contrapartida, quando os camundongos foram reconstituídos com T CD8 $^{+}$ e começaram a produção da citocina, cargas parasitárias em diferentes tecidos como pulmão e cérebro, diminuíram, demonstrando uma melhora no percurso da doença (CORREIA et al., 2015). Da

mesma forma, em camundongos BALB/c houve uma inativação de macrófagos peritoniais em infecções agudas dependentes de IFN- γ endógeno diminuindo o controle do parasita e sucumbindo ante a infecção (NISHIKAWA et al., 2001). Diferentes estudos demonstraram a participação de IFN- γ em modelos murinos, mas o papel de IFN- γ foi demonstrando em infecções naturais de gado e cães, mostrando um incremento nos níveis de expressão da citosina e seu papel central no combate da infecção por *N. caninum* (FEREIG; NISHIKAWA, 2020).

Como relatado anteriormente, IL-12 é outra citocina central na infecção por *N. caninum* cujo mecanismo de produção está estreitamente relacionado com IFN- γ . Estudou-se o potencial papel de IL-12 na infecção por *N. caninum*, evidenciado que a produção é dependente de TLR2 e TLR3 através da via AKT e ERK em camundongos C57BL/6, adicionalmente, em macrófagos bovinos, a expressão dos genes relacionados a via foi altamente alterada na infecção pelo parasita (ZHANG et al., 2021). TNF, outra molécula produzida na fase aguda da infecção, apresenta um papel fundamental no controle parasitário, já que em camundongos deficientes por receptor 1 de TNF, mostrou-se uma alteração significativa na mortalidade e lesões inflamatórias de camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos de *N. caninum* (FERREIRA FRANÇA et al., 2021).

As ROS participam no controle parasitário na infecção por *N. caninum* sendo bioprodutos derivados do metabolismo aeróbio estando relacionados na sinalização, envelhecimento e controle microbiano (RADA; LETO, 2008). *N. caninum* induz um aumento na produção de ROS em diferentes modelos, incluindo BMDM murinos, onde foi observado que a ativação do inflamassoma depende da presença de ROS, para que seja induzida a produção de IL-1 α , IL-1 β , e IL-18 e da mesma forma, a montagem do inflamossoma é necessária para a produção de ROS dependente da via MyD88/NF- κ B, sendo uma via interrelacionada para a restrição da replicação de *N. caninum* (MOTA et al., 2020). Por fim, em quanto ao controle parasitário por RNS, sabe-se que a síntese de óxido nítrico (NO) é iniciada pelos estímulos por IL-12 e IFN- γ , como um mecanismo para a eliminação do parasita. A óxido nítrico sintase induzível (iNOS2), a enzima que catalisa a produção de NO, é necessária também para a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-17A e TNF,

preservando um papel essencial no processo inflamatório durante a infecção por *N. caninum* (BARROS et al., 2019).

1.4.1 GRAs de *N. caninum*, um grupo de moléculas efetoras do sistema imune

Como mencionado anteriormente, diferentes moléculas são capazes de induzir uma resposta imune nos hospedeiros infectados por *N. caninum*: parasitas vivos, atenuados por temperatura, antígenos totais, antígenos secretados, vesículas extra celulares, entre outros. Sendo as GRAs uma família diversa de proteínas que participam de diferentes processos do ciclo biológico, tem sido demonstrado para *N. caninum*, casos onde participam no processo indutor da resposta imune.

Foi observado, que ao imunizar bovinos com proteínas recombinantes de GRA7, SAG1 e HSP20, houve um estímulo e aumentou a expressão de mRNA de TLR7, TLR8 e IFN- γ na placenta dos animais estimulados (MARIN et al., 2017a). Da mesma forma, uma recombinante de GRA6 possui atividade imuno estimuladora e é capaz de estimular macrófagos murinos para a secreção de IL12p40 de forma dose-dependente (FEREIG et al., 2019).

Por outro lado, GRA7 e GRA14 ativam, a via de Ca^{2+} dependente de calcineurina e TGF β , GRA6 está relacionada com a ativação da via NF- κ B e são necessárias para a produção de IL12p40 na infecção de camundongos C57BL/6 (NISHIKAWA et al., 2018). Além do anterior, GRA7 e GRA2 são provavelmente proteínas capazes de estimular a o recrutamento de células T CD4 $^{+}$ em modelos de infecção natural de bovinos (ROCCHI et al., 2011).

Embora, alguns estudos tenham demonstrado a participação das GRAs de *Neospora* na modulação da resposta imune, pouco se sabe da diversidade dessa família de proteínas e seu potencial efector. Estudos de caracterização funcional das GRAs podem desvendar o papel das proteínas do ciclo biológico e fornecer informação sobre o parasita para melhor entender alternativas para o controle da neosporose.

2. JUSTIFICATIVA

O principal impacto econômico da neosporose é causado pelos transtornos reprodutivos em bovinos com associações diretas como a morte do feto infectado ou indiretas como a substituição de vacas soropositivas e a redução da produção de leite. Embora seja claro o prejuízo sobre a saúde do animal, as perdas econômicas sobre o setor pecuário são de difícil estimativa. Sabe-se que a média de perdas anuais sobrepõem os US\$ 1,298 bilhões, sendo que o 60% associado a produção de leite e o restante a produção de carne. Na América do Sul, principalmente para o Brasil e Argentina, sabe-se que os prejuízos pela neosporose são aproximadamente o 18,5% do total global, cerca de US\$ 239,7 milhões (DUBEY et al., 2017; REICHEL et al., 2013).

Os mecanismos inatos e adaptativos relacionados a resistência contra *N. caninum* são desconhecidos e são um eixo central para o melhor entendimento da neosporose. Da mesma forma, os mecanismos envolvidos na matriz de interação parasita-hospedeiro, como a secreção de proteínas e regulação da resposta imune do hospedeiro podem fornecer informações fundamentais por desenvolvimento de protocolos vacinais ou de profilaxia contra este parasita.

Portanto, conhecer a diversidade de proteínas de grânulos densos secretadas pelo *N. caninum* e compreender o papel dessas proteínas na infecção pode ser crucial para a compressão da base molecular e imunológica da neosporose e contribuir para o avanço do conhecimento da biologia parasitaria assim como direcionar protocolos profiláticos e terapêuticos associados a esta infecção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a diversidade e o papel funcional das GRAs de *N. caninum* utilizando abordagens *in silico* e experimentais para elucidar suas funções biológicas, mecanismos de regulação gênica e impacto na resposta imune do hospedeiro.

3.2 Objetivos específicos

- I. Desenvolver uma base de dados de GRAs de *N. caninum* baseado na ortologia e sintenia das proteínas descritas para *T. gondii*.
- II. Confirmar a diversidade de GRAs preditas para *N. caninum* a partir de análises proteômicas de ensaios de BioID.
- III. Gerar parasitas geneticamente modificados para a localização de algumas GRAs de *N. caninum*.
- IV. Desenvolver parasitas geneticamente deficientes para as GRAs selecionadas, com a finalidade de avaliar seu fenótipo na interação parasita hospedeiro.
- V. Descrever o papel das GRAs selecionadas na replicação parasitaria em análises *in vitro*.
- VI. Descrever o papel das GRAs selecionadas na regulação da expressão gênica de *Nos2* e *Nox2*, assim como a produção de IL12 em BMDMs.
- VII. Identificar a participação das GRAs selecionadas na virulência nas fases hiperaguda, aguda e crônica em modelos murinos.
- VIII. Avaliar a morbidade de camundongos infectados com parasitas geneticamente deficientes para as GRAs selecionadas.
- IX. Determinar o papel das GRAs selecionadas como moléculas indutoras de IL12 em modelos *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises *In Silico*

4.1.1 Construção de uma base de dados de GRAs

Partindo da semelhança genética com *T. gondii*, sendo este um organismo amplamente estudado com dados disponíveis sobre biologia celular e proteômica, foi realizada uma base de dados de todas as GRAs descritas e previstas para *T. gondii* e seus ortólogos em *N. caninum*. Inicialmente, uma pesquisa sobre GRAs foi elaborada em bases de dados de referência como PubMed, (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), enriquecendo com dados disponíveis na base de dados *Toxoplasma Informatics Resource Database (ToxoDB)* (<https://toxodb.org/toxo/app>), principalmente a informação relacionada sobre localização subcelular das proteínas referente ao método de proteômica espacial de localização hiperplexada de proteínas de organelas por marcação isotópica HyperLOPIT (BARYLYUK et al., 2020). A cepa de referência usada na construção das bases de dados foi *T. gondii* ME49.

4.1.2 Análise filogenética

Arquivos FASTA contendo as sequências das proteínas foram obtidos da base de dados *Eukaryotic Pathogen, Vector and Host Informatics (VEuPathDB)* (<https://veupathdb.org/veupathdb/app/>). Foram consideradas as GRAs ortólogas sintênicas da lista previamente feita para *T. gondii*, das espécies da Classe Conoidasida e Aconoidasida (Tabela 1). Posteriormente, alinhamentos multiplex para cada proteína e seus diversos ortólogos foram realizados usando o modelo *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (EDGAR, 2004). Passo seguido, cada alinhamento foi analisado e foram removidos sítios não informativos usando o software ClipKIT (STEENWYK et al., 2020). A seguir, as sequências de todas as proteínas para todas as espécies foram concatenadas num único arquivo FASTA no software MEGA X (KUMAR et al., 2018). Para a seleção do modelo adequado de inferência filogenética de substituição de aminoácidos, foi realizada uma análise de alto desempenho no RAxML-NG (KOZLOV et al., 2019). Finalmente, após a seleção do melhor modelo ajustado, a construção da árvore filogenética foi realizada no RAxML-HPH BlackBox com um total de 1000 réplicas para a análise de *bootstraps*. As últimas duas análises foram realizadas na plataforma *Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research* CIPRES, do Centro de Supercomputação de

San Diego (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010).

Tabela 1. Agrupação taxonômica e código de acesso ao genoma das espécies utilizadas na filogenia construída a partir das GRAs.

Classe	Família	Espécie	Código de acesso
Conoidasida	Sarcocistidae	<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	GCF_000006565.2
		<i>Neospora caninum</i> Liverpool	GCA_000208865.2
		<i>Hammondia hamondi</i> H.H34	GCF_000258005.1
		<i>Sarcocystis neurona</i> SN3	GCA_000727475.1
		<i>Besnoitia besnoiti</i> Bb-Ger1	GCA_002563875.1
		<i>Cystoisospora suis</i> Wien I	GCA_002600585.1
		<i>Eimeria mitis</i> Houghton	GCA_000499745.2
		<i>Eimeria brunetti</i> Houghton	GCA_000499725.1
		<i>Eimeria acervulina</i> Houghton	GCA_000499425.1
	Eimeriidae	<i>Eimeria maxima</i> Weybridge	GCA_000499605.1
		<i>Eimeria praecox</i> Houghton	GCA_000499445.1
		<i>Eimeria tenella</i> strain Houghton	GCA_000499545.1
		<i>Eimeria necatrix</i> Houghton	GCA_000499385.1
		<i>Eimeria falciformis</i> Bayer Haberkorn 1970	GCA_002271815.1
		<i>Cyclospora cayetanensis</i> CHN_HEN01	GCA_000769155.2
	Plasmodiidae	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	GCA_000002765.3
Aconoidasida	Babesiidae	<i>Babesia bigemina</i> Bond	GCA_000723445.1
	Theileriidae	<i>Theileria annulata</i> Ankara	GCA_000003225.1

4.1.3 Análise de sintenia entre ortólogos de *N. caninum* e *T. gondii*

Para comparar a organização dos genes das GRAs nos cromossomos e nas regiões genômicas entre *N. caninum* e *T. gondii*, foram realizados mapas de sintenia com o objetivo identificar

a conservação e evolução genômica das GRAs. Para realizar os mapas de sintenia, foram considerados todos os genes codificantes de proteínas. Posteriormente, as informações de localização genômica foram obtidas para todos os genes, e os mapas foram elaborados no software CIRCOS (KRZYWINSKI et al., 2009). Foram realizados mapas com todos os genes codificantes de proteínas sintênicos e não sintênicos, além de mapas das GRAs sintênicas e GRAs não sintênicas.

4.1.4 Comparações estruturais e alinhamentos

A partir dos ortólogos sintênicos entre *N. caninum* e *T. gondii*, foram realizadas comparações de composição de aminoácidos, peso das proteínas, alinhamentos das sequências e dos modelos da estrutura terciária das GRAs, para determinar a conservação das proteínas entre os parasitas. Para isso, informações como o peso das proteínas e as sequências em formato FASTA foram obtidas da base de dados ToxoDB. Os modelos da estrutura terciária da proteína AlphaFold (JUMPER et al., 2021) foram obtidos do AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

A composição de aminoácidos e os alinhamentos das sequências das GRAs foram feitos com o método *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (EDGAR, 2004) e dados sobre a porcentagem de identidade entre cada proteína foram obtidos. O alinhamento de estruturas terciárias foram feitos com o método *Flexible structure Alignment by Chaining Aligned frames allowing Twist* (FATCAT) (<https://fatcat.godziklab.org/>) (LI et al., 2020).

4.2 Cultura de células hospedeiras e parasitas

N. caninum Liverpool duplo-deficientes para hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e *ku80* (NcLiv $\Delta h\Delta k$) (MINEO et al., 2022) foram mantidos em monocamadas confluentes de fibroblastos de prepúcio humano (HFF), cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 1000 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C em uma atmosfera com 5% CO₂.

4.3 Geração de parasitas modificados geneticamente

4.3.1 Desenho, Anelamento de gRNAs e Ligação ao vector

Resumidamente, sequências *forward* e *reverse* de RNA guia (gRNA) com a sequências *scaffold* foram desenhadas para cada gene do estudo (Tabela 2), usando a plataforma

Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Desing Tool (EuPaGDT) (<http://grna.ctegd.uga.edu/>). O anelamento dos gRNA foi realizado incorporando 10 µL de cada primer 10 mM junto com 80 µL de dH₂O e aquecendo por 5 minutos a 100°C. A ligação foi feita no vector pU6-Universal (Addgene:52694) incorporando 100 ng do vector, 3µL do gRNA anelado, 1 µL T4 DNA ligase (ThermoFisher-Scientific), 1 µL do 10X T4 ligase buffer e 4,5 µL de dH₂O.

Tabela 2. Lista de gRNA desenhados no EuPaGDT das GRAs alvo.

Gene	Primer	Sequencia	Tipo de modificação
Gra48 (NCLIV_069360)	Fwd	AAGTTgcgtctgcaacccaatagaatG	Tag
	Rev	AAAACatctattgggtgcagacgcA	
	Fwd	AAGTTatagttaagggtaggcatG	Nocaut
	Rev	AAAACatggcctacccttaactatA	
Gra62 (NCLIV_052280)	Fwd	AAGTTggcgacgtcacagtgcagaaG	Tag
	Rev	AAAACttcgtcactgtgacgtcgccA	
	Fwd	AAGTTgcagctgatacgtctgttgG	Nocaut
	Rev	AAAACcaacgagacgtatcagctgcA	
Nsg1 (NCLIV_066730)	Fwd	AAGTTgtctgggcacggactgtgaG	Tag
	Rev	AAAACtcacaagtcctgcccagacA	
	Fwd	AAGTTgcagctgaggagacagtcaG	Nocaut
	Rev	AAAACtgactgtctcctcagactgcA	
Gra83 (NCLIV_006800)	Fwd	AAGTTgaaatgctgccgatgccgcG	Tag
	Rev	AAAACgacggcatcggcagcatttcA	
	Fwd	AAGTTGcttcgaggggaaatctcggG	Nocaut
	Rev	AAAACccgagattttccctcgaagCA	
NCLIV_001830	Fwd	AAGTTaatcggtgtgaaaggacgagG	Tag
	Rev	AAAACctcgtctttcacaccgattA	
	Fwd	AAGTTagccgtacgacgtgtccgaG	Nocaut
	Rev	AAAACtcggacagcgtcgtacggctA	

4.3.2 Transformação de bactérias termocompetentes

Posteriormente, o produto ligado foi incorporado em bactérias *E. coli* DH5α. Brevemente, bactérias tratadas com CaCl₂ junto com o produto da ligação foram incubadas em gelo por

20 minutos, a seguir, foi realizado o choque térmico levando a bactérias a 42°C por 45 segundos, seguidamente, foram incubadas por 2 minutos em gelos e adicionados 200 µL de meio para transformação SOC (Invitrogen) e levadas a 37°C sob agitação. Após a incubação, foram semeadas em placas com meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 125 µg/mL de ampicilina (Sigma) e incubado a 37°C por 18 horas. Posteriormente, colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em tubos com 5 ou 50 mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina (125 µg/mL) por 18 horas.

4.3.3 Purificação de vetores

A purificação dos plasmídeos contendo os gRNA foi feita pelo kit GeneJET Plasmid MiniPrep (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, a suspensão de bactérias foi centrifugada a 3500 x g por 15 minutos a 4°C. A seguir, foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi resuspendido em 250 µL de tampão de ressuspensão com RNase, foi adicionado 250 µL de tampão de lise e homogeneizado gentilmente por inversão, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, foram adicionados 350 µL de tampão de neutralização e homogeneizado gentilmente por inversão até a formação de um precipitado. As suspensões foram centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos e o sobrenadante obtido foi carregado nas colunas para *spin* do kit, as colunas foram levadas a centrifugação a 12000 x g por 1 minuto e lavadas duas vezes com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugando por 1 minuto entre cada lavagem. Por fim, os plasmídeos foram eluídos da coluna adicionando entre 30 µL e 50 µL de tampão de eluição previamente aquecido a 60°C, incubando por 2 minutos e centrifugando por 2 minutos a 12000 x g.

4.3.4 Preparação do DNA de reparo com braços de homologia

O DNA de reparo foi preparado por PCR convencional usando os vetores pLIC: BirA*:3xHA:DHFR (NADIPURAM et al., 2020) para a geração de parasitas expressando GRA48-BirA* do ensaio de BioID, o vetor pLIC:3xHA:DHFR para o *tag* endógeno com três hemaglutininas dos genes alvo, e o vetor pJET1.2:pNcGRA7:TgHXGPRT para a nocaute dos genes alvo (MINEO et al., 2022). Os braços de homologia contêm uma sequência de 40pb que permite a recombinação com a região de interesse de cada alvo (Tabela 3). A PCR foi realizada com 2 µL da enzima PFU, 10 µL de tampão da enzima 10X, 10 mM de dNTPs, 2 µL de vector, 2 µL de primer *forward*, 2 µL de primer *reverse* e 80 µL

de dH₂O, 4 reações por DNA de reparo, totalizando 400 µL. Os parâmetros de amplificação foram: desnaturação inicial 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação 95°C por 50 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos, extensão 72°C por 4 minutos, e extensão final 72°C por 5 minutos. Os amplicons foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% com 5 µL de SyberSafe (ThermoFisher Scientific) a 80V por 1 hora.

Tabela 3

Tabela 3. Oligonucleotídeos usados como braços de homologia para a incorporação do DNA de reparo.

Gene	Primer	Sequencia	Tipo de modificação
Gra48	Fwd	ACCCGTGACCAATGTGGAGAACGCAGTCCCACTGG GGAAGGGAAGTGGAGGACGGGAATT	Tag
	Rev	AGTCCTTTTCCAATGATGGAACGGACTCGCGCGTTT GTCGACGGCCAGTGAATTGTAATA	
	Fwd	TACCCTTTCCTTGCCTGTGTAACCTGCTCACACGTCA GCCCCTCCATGGAACCTGACTG	Nocaute
	Rev	CACGATGTTCGATGCAAGGGACCGAACAGTCGCCA GATCCCTGCAAGTGCATAGAAGGAA	
Gra62	Fwd	AGAGAACTAGTTGAGCTAGAAAGACTTACGGGTG ATGAGGGAAGTGGAGGACGGGAATT	Tag
	Rev	GAACGTTCTAGGTGCTGCATTTACCAGGTTTAAAC GTCGACGGCCAGTGAATTGTAATA	
	Fwd	CTCTTTCGTGTTTCGTACGGTCTGGTAGCACGTTCA GCGCCACTCCATGGAACCTGACTG	Nocaute
	Rev	CTCGGGCGATGGCACTGCTCCATACATACAGATTCA CACCTGCAAGTGCATAGAAGGAA	
Nsg1	Fwd	TACAGACGTCAAAATCTATGACCCACGGAGGCCG AAGAAGGAAGTGGAGGACGGGAATT	Tag
	Rev	CTTGTAACCTTTGGCGGTTTCGCACGTAGATGCTTCCTA CCGACGGCCAGTGAATTGTAATA	
	Fwd	TTTAGCTGTCACTTCCGAACTCTCGTTTTCTTCCG CACCCTCCATGGAACCTGACTG	Nocaute
	Rev	CATGCCGTTTGTTCAGAGGACCGCGCGACACAGG AAGGCCTGCAAGTGCATAGAAGGAA	

Gra83	Fwd	ATTCTTTTTTCGCTCTGGTTCATTTGGTGAAATCTGCG AATGGAAGTGGAGGACGGGAATT	Tag
	Rev	CTCATTTTCGAAAACCTGGTGTCAAGCAGATAGGCAC GACGACGGCCAGTGAATTGTAATA	
	Fwd	AGTTTCATTCCATATTAGATCCTTCATTTGGAAGTAA CACCACTCCATGGAACCTGACTG	Nocaut
	Rev	CATCTCCTTGACCTGTACCTAGCATTACGTCGTCA CACCTGCAAGTGCATAGAAGGAA	
NCLIV_001830	Fwd	GAAATTCAGAGGCGCGAGCGATGGTTCATGGGGAG AGTCTGGAAGTGGAGGACGGGAATT	Tag
	Rev	GTTCGTTCAAATCGACACCTTGCGGAGTCGCAAGA AGCCGACGGCCAGTGAATTGTAATA	
	Fwd	TTTTTCACACGCGACAGTTGCGTGCGCGCTCCGGGC ACCCCACTCCATGGAACCTGACTG	Nocaut
	Rev	CCACGACTCGAGGCACACAGCAGCGGGCGTTTCAA CATCCCTGCAAGTGCATAGAAGGAA	

4.3.5 Purificação do DNA de reparo por Fenol-Clorofórmio

Os produtos da PCR foram purificados e concentrados pelo método de Fenol-Clorofórmio. Brevemente, foram adicionados 400 µL de fenol a cada amostra de DNA de reparo, seguido de vórtex por 30 segundos. A suspensão foi então centrifugada a 12000 x g por 3 minutos, e a fase aquosa (sobrenadante) foi coletada. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e levados a vórtex por 30 segundos, seguido de uma nova centrifugação a 12000 x g por 3 minutos. A fase aquosa foi coletada, e foram adicionados 40 µL de acetado de sódio 3M. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de etanol P.A gelado e homogeneizado por inversão até observar a precipitação do DNA. A seguir, os DNA de reparo foram centrifugados a 12000 x g por 10 minutos, descartado o sobrenadante e reidratado com 1 mL de etanol 70% por 10 minutos sob agitação. Finalmente, a amostra foi centrifugada novamente a 12.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi seco em cabine de fluxo para posterior resuspensão em 40 µL de dH₂O.

4.3.6 Eletroporação de parasitas

Para a transfecção de parasitas com os gRNA guias e os DNA de reparo foram usados taquizoítos de NcLivΔ*hΔk* como parentais. Brevemente, 1x10⁷ taquizoítos extracelulares

foram coletados e centrifugados a 800 x g por 10 minutos para retirar o meio suplementado com 10% de SFB. O *Pellet* contendo os taquizoítos foi resuspendido e foi 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). A suspensão de parasitas foi diluída em 800 µL de cytomix, 40 µL de vector pU6 com gRNA e 40 µL de DNA de reparo (75-100 µg de DNA Total) e eletroporados em cubeta de eletroporação de 4mm no *Gene Pulser Xcell Electroporator* com a configuração 1,5 kV, 100W, 25µF. Por fim, os parasitas transfectedados foram transferidos em garrafas 25 cm³ com monocamada de células HFF por 24 horas.

Após o período de incubação, foi adicionado a droga de seleção por 10 dias aproximadamente, sendo que para DNA de reparo contendo o gene *DHFR* foi adicionado 2 µL de Pirimetamina 7,5 mM e para o gene *HXPRT* foi adicionado 25 µg/mL ácido micofenolico e 25 µg/mL xantina (MX). Finalizado o tempo de seleção, os parasitas foram clonados por diluição limitante em placas de 96 poços.

4.4 Identificação de GRAs de *N. caninum* por Biotinilação de proximidade (BioID)

4.4.1 Captura por afinidade de proteínas biotinadas

O ensaio de BioID foi realizado conforme o descrito previamente (NADIPURAM et al., 2020). Células HFF foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB, 150 µM de biotina e foram infectadas com os parasitas NcLiv*GRA48: BirA**, o parasita previamente construído expressando a proteína de *T. gondii* GRA24 acoplado a *BirA**, NcLiv:*TgGRA24: BirA** (MOTA et al., 2016) e o NcLiv $\Delta h\Delta k$ (agora nomeado como NcLiv) como controle negativo, por 24 horas a 37°C. As células e os parasitas foram coletados e lavados em PBS 1X, tratados com tampão RIPA (50 mM Tris [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycolato de sódio, 1% NP-40) suplementado com o coquetel inibidor de proteases *Complete* (Roche) por 30 minutos em banho de gelo. Os lisados foram centrifugados a 14000 x g por 15 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi incubado nas esferas de resina *Streptavidin Plus Ultralink Resin* (Pierce) a temperatura ambiente por 4 horas. As esferas foram coletadas e lavadas 5 vezes em tampão RIPA, 3 lavagens com Tampão Ureia 8M (50 mM Tris-HCl [pH 7,4] e 150 mM NaCl).

4.4.2 Espectrometria de massas

As proteínas totais ligadas às esferas de estreptavidina foram reduzidas, alquiladas e digeridas conforme mencionado anteriormente (MOTA et al., 2016; NADIPURAM et al., 2020). Em resumo, para a redução e alquilação, as esferas foram incubadas em 5 mM TCEP e 10 mM iodoacetamida à temperatura ambiente, no escuro, e com agitação constante a 1200 RPM por 20 minutos. As proteínas foram digeridas pela adição de 0,1 µg de Lys-C e 0,8 µg de tripsina a 37 °C, durante a noite. Em seguida, o volume das proteínas ressuspensas foi ajustado para uma concentração final de 5% com ácido fórmico. Para a análise por LC-MS/MS, as amostras foram dessalinizadas com C18 Tips (Thermo Scientific) e ressuspensas em 5% de ácido fórmico. A mistura de peptídeos foi fracionada em uma coluna C18 de 75 µM e 25 cm, preenchida com partículas de C18 de 1,9 µM, usando um gradiente de 140 minutos de acetonitrila crescente e eluída diretamente em um instrumento *Thermo Orbitrap Fusion Lumos*, onde os espectros MS/MS foram adquiridos por Aquisição Dependente de Dados (DDA). A análise de dados foi realizada usando os algoritmos ProLuCID e DTASelect2, conforme implementado no *Integrated Proteomics Pipeline—IP2* (Integrated Proteomics Applications, Inc., San Diego, CA). As identificações de proteínas e peptídeos foram filtradas usando DTASelect, sendo necessário um mínimo de dois peptídeos únicos por proteína e uma taxa de falsos positivos a nível de peptídeo inferior a 1%, conforme estimado por uma estratégia de banco de dados decoy.

4.5 Imunofluorescência

Para a localização subcelular das proteínas alvo, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta para marcar os epítomos de hemaglutinina previamente inseridos nas GRAs de interesse. Em resumo, foram semeadas células HFF em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas circulares e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem confluência. Após as células estarem confluentes, foram infectadas as células com taquizoítos de *N. caninum* modificados com 3xHA e incubados por 18-24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas com 300 µL de solução de fixação (Formol 4% em PBS1X) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas cinco vezes com PBS 1X e permeabilizadas com tampão de bloqueio (0.2% Triton-X100, e 3% BSA em PBS 1X). A seguir, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e foram

incubadas por 1 hora com os anticorpos primários, α -HA-*Rabbit* (ThermoFisher Scientific), α -21H7-*Mouse* (marcador de GRA) e α -4C1-*Mouse* (Marcador de superfície) (SOHN et al., 2011). Posteriormente, anticorpos primários foram retirados, as lamínulas lavadas com PBS1 e incubadas por 40 minutos com os anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific). Por fim as lamínulas foram fixadas em lâminas para microscópio com meio de montagem contendo DAPI ProLong e observadas no microscópio de epifluorescência. Os registros fotográficos foram feitos no microscópio EVOS fl *Fluorescence Microscope* AMG.

4.6 Ensaio de placa

Placas de seis poços foram semeadas com células HFF até atingirem confluência. Posteriormente foram infectadas com aproximadamente 1000 parasitas por poços e deixadas para formar placas por 9 dias em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as monocamadas foram lavadas com PBS 1X e fixadas em metanol 100% gelados para finalmente ser coradas com cristal violeta 1% por 5 minutos. Finalmente as monocamadas foram lavadas com dH₂O e foi feito o registro fotográfico. Para a análise, foram realizados os experimentos em triplicata e as placas formadas foram mensuradas no software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.7 Camundongos e comitê de ética

Camundongos C57BL/6, fêmeas, de tipo selvagem, com 6-8 semanas de idade foram obtidos e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura e umidade controladas. Sendo mantidos com alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos, manejo e cuidados foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos para a utilização dos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização Animal da UFU (CEUA/UFU). Protocolo número 109/16.

4.8 Diferenciação de macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDM)

Camundongos C57BL/6 de 6 semanas foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os fêmures e tíbias foram removidos e armazenados em meio RPMI. Em seguida, os ossos foram lavados com álcool 70% por 1 minuto em câmara de fluxo laminar, e as epífises foram

cortadas. A medula óssea foi extraída lavando o interior dos ossos com meio RPMI 1640 incompleto utilizando uma seringa com agulha 26G. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos e, depois, ressuspendida em meio R20/30, composto por RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 30% de meio condicionado de células L929 (MARIM et al., 2010). A seguir, as células foram incubadas em placas de Petri a 37°C e 5% CO₂. Após quatro dias de incubação, foram adicionados 9 mL de meio R20/30 às placas, que foram então mantidas por mais 2 dias na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Completados os 6 dias de incubação, o sobrenadante foi removido das placas de Petri e foi adicionado PBS 1X gelado e estéril a 4°C por 5 minutos para descolar as células. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos, o pellet resultante foi ressuspendido em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas conforme o layout experimental.

4.9 Infecção por *N. caninum* em BMDMs

1x10⁶/mL de macrófagos foram plaqueados em placas de 12 poços, para ensaios de expressão gênica e 96 poços para avaliação de citocinas, e incubados *overnight* em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* parentais e geneticamente modificados (nocaute para as GRAs de interesse) com uma multiplicidade de infecção MOI: 0,5.

Os períodos de incubação foram de 3 horas para expressão gênica e 18 horas para citocinas.

4.10 Geração de uma biblioteca de cDNA de BMDM infectados por *N. caninum*

4.10.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita pelo método de trizol. Brevemente, foi retirado o meio de cultura dos BMDM e foram adicionados 500 µL de Trizol (Invitrogen) em cada poço fazendo uma lavagem suave para retirar a monocamada, posteriormente foram coletadas as suspensões e levadas a vórtex por 30 segundos. A seguir, foram adicionados 300 µL de clorofórmio Isoamil em cada amostra, sendo agitadas em vórtex por 15 segundos, incubados por 5 minutos a temperatura ambiente e levadas as amostras a centrifugação a 12000 x g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado, homogeneizando

gentilmente por inversão para posteriormente centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 1mL de etanol 75% gelado e levado a centrifugação por 5 minutos a 12000 x g. Finalmente o RNA total foi recuperado descartando o sobrenadante e foi ressuspenso em 50 µL de água livre de DNase e RNase. As concentrações de RNA foram determinadas no NanoDrop TM *Lite Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific)

4.10.2 Tratamento de RNA com DNase

As amostras foram tratadas com DNase para a posterior síntese de cDNA. Para isso, ajustaram-se as concentrações finais em 3 µg de RNA para 50 µL de água livre de DNase e RNase. Foram adicionados 5µL de MgCl₂ e 1 µL de DNase para serem incubadas a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, foram adicionados 25 µL de trizol e 25 µL de clorofórmio e foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g. Coletaram-se os sobrenadantes e foram tratados com acetato de sódio 3M em proporção 1/10, 1 µL de glicogênio e 150 µL de etanol P.A gelado. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente os pellets foram ressuspendidos em 50 µL de H₂O livre de DNase e RNase e as concentrações medidas pelo NanoDrop *Lite Spectrophotometer*.

4.10.3 Síntese de cDNA (Retrotranscrição)

A síntese de cDNA foi realizada com o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, as concentrações de RNA tratado com DNase foram ajustadas a 2 µg em 10 µL de água ultrapura. Foi adicionado 2 µL de tampão RT 10X, 0.8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µL de RT Random Primers 10X, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4.2 µL de água livre de nucleases. A transcrição reversa foi realizada no termociclador com os seguintes ciclos: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e o passo final a 4°C até estocar as amostras. As amostras foram estocadas a -20°C até a quantificação de mRNA por qPCR.

4.11 Infecção de camundongos

Camundongos C57BL/6 foram infectados com doses não letais de taquizoítos de *N. caninum* (1x10⁶ de parasitas) via intraperitoneal. Foram feitas infecções hiper agudas (1 dia de

infecção), agudas (7 dias de infecção) e crônicas (30 dias de infecção). Os grupos experimentais para cada infecção eram compostos por 5 camundongos infectados com parasitas parentais (NcLiv), 5 camundongos infectados com parasitas geneticamente deficientes para cada GRA, e um grupo não infectado.

Para a infecção hiperaguda e aguda, os camundongos foram eutanasiados após cumprir o tempo de infecção estabelecido. Foi feita uma lavagem peritoneal com 1 mL de PBS 1X estéril para a obtenção de células peritoniais e avaliação de parasitismo, assim como a dosagem de IL12p40 peritoneal e a liberação de NO. Na infecção crônica, os pesos dos animais foram acompanhados diariamente para a análise de morbidade de observação de sinais clínicos. Após atingir o tempo de cronicidade, os camundongos foram eutanasiados e o cérebro foi coletado para extração de DNA total e avaliação de parasitismo cerebral.

4.12 Extração de DNA genômico

Para a quantificação de parasitismo, o DNA de células peritoniais e cérebro foi extraído pelo método de *salting out*. Resumidamente, as células do peritônio, previamente obtidas por centrifugação da lavagem peritoneal, e os cérebros, foram incubados a 50°C *por* um período de 18 horas, em 500 µL de tampão NLB (10mM Tris-HCl, 400nM NaCl e 2mM Na₂EDTA, pH 8,2), 16 µL de SDS 10% e 8 µL de solução proteínase K (20mg/mL). Após a incubação, foram adicionados 150 µL de solução de NaCl 6M e realizado um vórtex para homogeneizar as amostras. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos em banho de gelo e levadas a centrifugação a 12000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e foi acrescentado 800 µL de etanol P.A gelado, sendo homogeneizadas as amostras por inversão. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram reidratados com 1 mL de etanol 75% para serem centrifugados a 12000 x g por 5 minutos e finalmente serem resuspendidos em água livre de DNase e RNase. As concentrações de DNA total foram quantificadas no NanoDrop Lite *Spectrophotometer*.

4.13 PCR quantitativa (qPCR)

Os níveis de expressão de mRNA da óxido nítrico sintase (*Nos2*) e da NADPH oxidase 2 (*Nox2*) em BMDMs infectados, assim como o parasitismo peritoneal e cerebral foi determinado por PCR quantitativa. Foi usado o Kit SYBRTM *Green PCR Master Mix* seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Foram usados 5 µL do

Master Mix, 0,5 µL cada primer (Tabela 4) e 4 µL do *template*, para o parasitismo foram adicionados 200 ng de DNA genômico para reação, e para a expressão gênica foram usados 10 ng de cDNA.

Tabela 4. Primers utilizados para a PCR quantitativa.

Gene	Primer	Sequência	Análise
Nc5	Fwd	gctgaacaccgtatgtcgtaaa	Parasitismo
	Rev	agaggaatgccacataga	
Gapdh	Fwd	ggagaaacctgccactatgatg	Expressão relativa
	Rev	cagtgtagcccaagatgccc	
Nos2	Fwd	atgaaccccaagagtttgac	Expressão relativa
	Rev	gcctctttaaaggagccata	
Nox2	Fwd	aggcagaaccaacacttaacc	Expressão relativa
	Rev	caaccacaccagaatgacaaag	

A carga parasitaria foi calculada por interpolação de uma curva padrão com fator de diluição logarítmico, partindo de 100 ng de DNA extraído de taquizoítos de *N. caninum*, no software StepOne™ Software 2,3 (ThermoFisher Scientific). Para o cálculo de expressão relativa dos mRNA foi usado o método $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo como gene de referência *Gapdh* e para o *fold change* foram usados os níveis relativos de mRNA de BMDMs não infectados.

4.14 Quantificação da citocina IL-12p40

A citocina IL12p40 foi mensurada do sobrenadante de cultura de BMDMs assim como do líquido peritoneal. A mensuração foi feita por ensaio imuno-enzimático (ELISA) usando o Kit DB OptEIA™ *Mouse IL-12p40 ELISA Set*, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de alta afinidade de 96 poços (Corning Laboratories Inc) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para IL-12p40 e incubadas a 4°C *Overnight*. Após a incubação, as placas foram lavadas com uma solução de PBS 1X Tween 0,05% e posteriormente bloqueados os sítios inespecíficos adicionando o tampão de bloqueio

(10%SFB em PBS1X) durante 1 hora. A seguir, foi feita uma nova lavagem e tanto a curva padrão da citocina murina recombinante como as amostras foram diluídas em tampão de bloqueio, adicionadas em cada poço e incubadas por 2 horas. As placas foram lavadas novamente e adicionado o anticorpo de detecção biotinilado e conjugado com estreptavidina-peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Um último ciclo de lavagens foi realizado e as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi parada com H₂SO₄ 2N. A leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro SpectraMax Microplate Reader Serie M2 a 450 nm.

4.15 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

O NO foi mensurado das amostras de líquido peritoneal usando o método colorimétrico do Kit Total Nitric Oxide and Nitrite/Nitrate Assay Kit (R&D Systems) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação foi feita no espectrofotômetro SpectraMax Microplate Reader Serie M2 a 450 nm usando um método de interpolação com uma curva padrão.

4.16 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 9* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As comparações entre tamanhos de proteínas ortólogas sintéticas entre *T. gondii* e *N. caninum* foram feitas calculando o coeficiente de correlação de *Pearson*. Foram feitas análises de normalidade para determinar se os conjuntos de dados eram paramétricos ou não. De acordo com o anterior, análises comparativas foram feitas usando o ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni, ou ANOVA não paramétrico com teste de comparação múltipla de Dunn. Todos os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e foi considerado um nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 As GRAs estão presentes no filo Apicomplexa estabelecendo relações filogenéticas entre *N. caninum* e *T. gondii*

Poucas são as GRAs descritas na literatura para *N. caninum*, existe aproximadamente registro para 17 GRAs. Por tal motivo, há necessidade de desenvolver estratégias de busca para facilitar posteriores estudos que permitam identificar proteínas pertencentes a família das GRAs. Devido a sua semelhança genética com *T. gondii*, decidiu-se usar este como organismo modelo para a identificação de GRAs presentes no filo Apicomplexa e principalmente em *N. caninum* pois existem uma maior quantidade de estudos direcionados a identificar proteínas e sua função assim como ferramentas que ajudam a predizer novas proteínas como o HyperLOPIT (BARYLYUK et al., 2020). Um total de 184 GRAs foram listadas para *T. gondii* das quais um 67% foram previamente descritas e o 33 % foram preditas baseadas em sua localização subcelular (Anexo II).

De todas as GRAs listadas para *T. gondii*, foi feita uma recopilação das sequências dos seus ortólogos em diferentes representantes do filo apicomplexa. Observou-se que as GRAs estão presentes em diferentes quantidades nas diferentes espécies do filo, sendo que nos representantes da família Eimeriidae há pouca diversidade de ortólogos, entre 0,55% e 4,4% das GRAs de *T. gondii*. Pelo contrário, os membros da família Sarcocystidae apresentaram um maior número de GRAs ortólogas de entre o 17% até o 93% (Figura 2a). Embora, as GRAs não são o único fator de virulência conhecido, é interessante ver que quanto maior são o número de proteínas GRAs presentes nas espécies, o espectro de hospedeiros intermediários é maior (Figura 2a).

Com base na presença ou ausência de ortólogos de GRAs em outras espécies, assim como na sua composição e organização de aminoácidos, analisaram-se as relações filogenéticas entre os apicomplexa. O modelo de inferência filogenética mais adequado para as GRAs foi o método de Máxima Verossimilhança de Le-Gascuel (LG) junto com um modelo com ritmo evolutivo variável (G). A árvore filogenética (Figura 2b) foi construída usando as sequências de 18 espécies de apicomplexa com genoma de referência, analisando um total de 131077 de posições de aminoácidos.

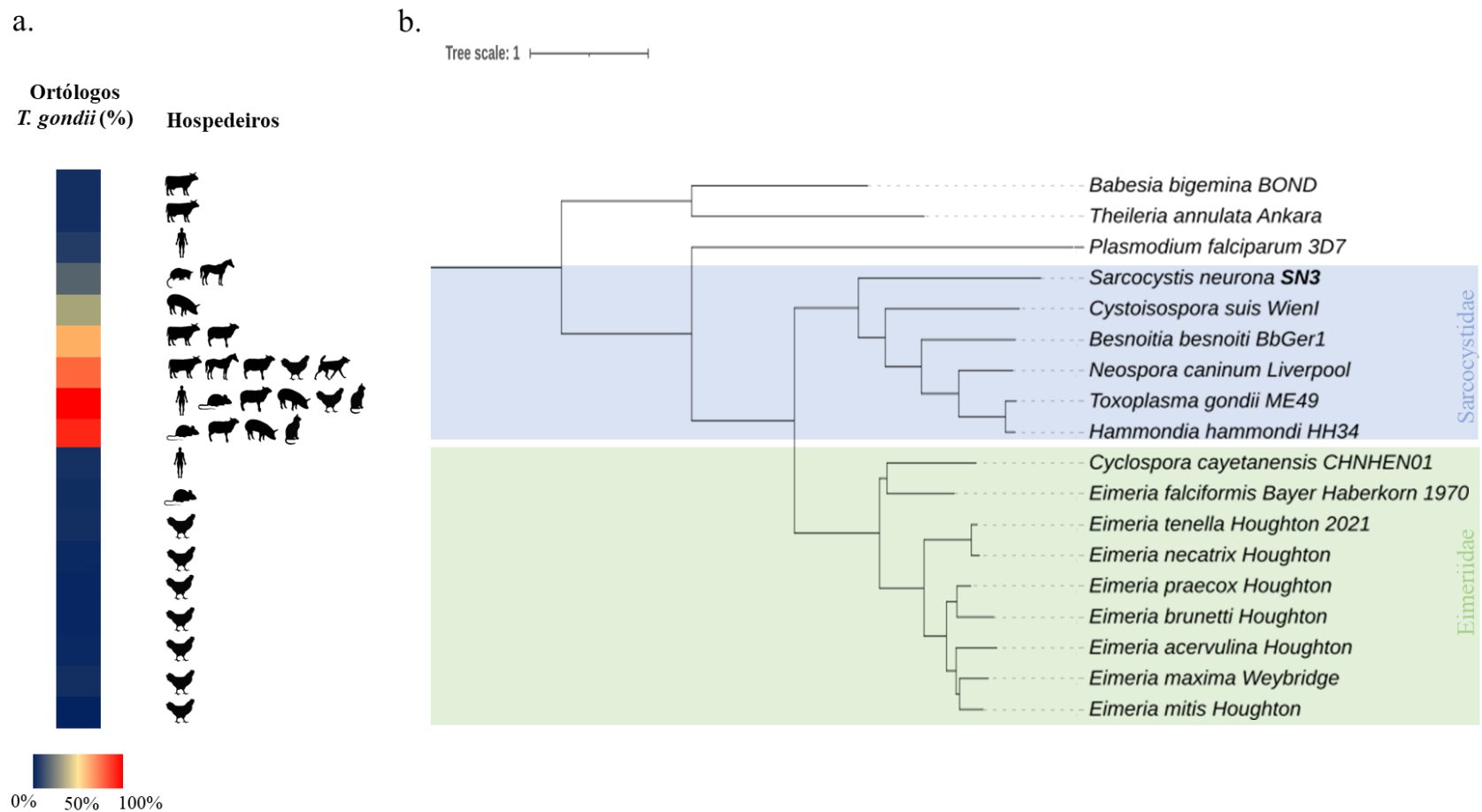


Figura 2. As GRAs estão presentes no filo apicomplexa e relacionam filogeneticamente os Coccideos. **a.** Proporção de ortólogos das proteínas GRAs de *T. gondii* dentro do filo Apicomplexa e a representação dos hospedeiros mais comuns para cada espécie. **b.** Relação filogenética baseada nas sequências de ortólogos das proteínas GRAs de *T. gondii* no filo Apicomplexa.

Os valores de consenso do *bootstrap* foram gerados a partir de 1000 réplicas. Uma árvore filogenética robusta com 100% das réplicas consistentemente no mesmo clado dentro da família Sarcocystidae. De forma semelhante, o nó onde *T. gondii*, *N. caninum* e *H. hammondi* divergem é evidente. A estreita relação filogenética entre *H. hammondi* e *T. gondii*, atribuída a uma sintenia genômica superior a 95%, tem levado a discussões sobre a classificação de *H. hammondi* como uma espécie distinta ou potencialmente como uma cepa menos virulenta de *T. gondii*.

5.2 Os genes das GRAs de *N. caninum* e *T. gondii* são altamente sintênicos

Com a finalidade de prever as GRAs de *N. caninum* e estabelecer o nível de conservação dos genes das GRAs entre espécies filogeneticamente próximas, foram procurados ortólogos em *T. gondii* com base em comparações genômicas globais, utilizando os dados de cepas ou isolados de referência contidos no ToxoDB. Observou-se que *T. gondii* possui um número maior de genes anotados (8920) em comparação com *N. caninum* (7266). Desses genes de *N. caninum*, 93,35% (6783) são ortólogos em *T. gondii*.

Do total de ortólogos mapeados entre as duas espécies, encontrou-se que aproximadamente o 95,9% (6510) dos genes são sintênicos (Figura 3a) e que o 4,02% (273) são genes ortólogos não sintênicos (Figura 3b). Adicionalmente, do total de GRAs listadas para *T. gondii*, foram encontradas 147 GRAs sintênicas (Anexo II) e outras possíveis GRAs não sintênicas (35 proteínas). Embora a definição de sintenia envolva a conservação da localização dos genes entre cromossomos homólogos nas duas espécies, foi observado um fenômeno de translocação de blocos gênicos, o que manteve o nível de sintenia dos genes das GRAs (Figura 3c). Genes de GRAs como a PPMC11 localizado cromossomo IX em *T. gondii* (TGME49_304955) encontra-se localizado no cromossomo Ia de *N. caninum* (NCLIV_001230). Outros exemplos são WNG1/ROP35 (TGME49_304740/NCLIV_044410), WNG2/ROP34 (TGME49_240090/NCLIV_000650) encontram-se localizados nos cromossomos VIIa e VI em *T. gondii* e no *N. caninum* mudam pros cromossomos IX e Ia, respetivamente (Figura 3c).

Em relação aos ortólogos não sintênicos em *N. caninum*, observamos que, das proteínas GRA não sintênicas, um grupo composto por três proteínas: GRA21 (TGME49_241300), GRA21a (TGME49_241610) e GRA65 (TGME49_241240), originadas de uma expansão em tandem

em *T. gondii* (ADOMAKO-ANKOMAH et al., 2014), compartilham um ortólogo não sintênico comum em *N. caninum*, identificado como NCLIV_017230. Além disso, GRA21a possui um segundo ortólogo não sintênico (NCLIV_017220). Da mesma forma, as proteínas GRA19 (TGME49_245432) e GRA20 (TGME49_200010) compartilham um ortólogo comum não sintênico (NCLIV_062670) e possuem ortólogos adicionais exclusivamente não sintênicos, NCLIV_062680 e NCLIV_062690, respectivamente.

As proteínas PSD1 (TGME49_269920) e WNG1/ROP35 (TGME49_304740) possuem um ortólogo não sintênico cada, identificados como NCLIV_036570 e NCLIV_029900, respectivamente. A proteína ROP45 (TGME49_281675) apresenta cinco ortólogos não sintênicos: NCLIV_008640, NCLIV_027710, NCLIV_027930, NCLIV_035860 e NCLIV_048060.

Até este ponto, todas as proteínas GRA mencionadas possuem um ortólogo sintênico descrito, além de pelo menos um ortólogo não sintênico. No entanto, foram identificadas duas proteínas GRA em *T. gondii* que não possuem ortólogos sintênicos, mas apresentam vários ortólogos não sintênicos: ROP32 (TGME49_308093), que possui oito ortólogos (NCLIV_001950, NCLIV_001970, NCLIV_007450, NCLIV_016220, NCLIV_022270, NCLIV_060730, NCLIV_068850, NCLIV_069590), e uma proteína hipotética (TGME49_301480), que possui cinco ortólogos (NCLIV_012010, NCLIV_012020, NCLIV_012200, NCLIV_012210, NCLIV_069640) (Figura 3d).

5.3 As GRAs ortólogas entre *N. caninum* e *T. gondii* apresentam diferenças estruturais em quanto a sua conformação secundária e terciária

Para realizar a comparação das proteínas ortólogas entre os dois parasitas, foram consideradas unicamente as 147 proteínas sintênicas. Inicialmente, buscou-se analisar as diferenças na composição de aminoácidos que compõem todas as GRAs sintênicas. Observou-se que as GRAs de *T. gondii* são formadas por um maior número de aminoácidos (122522 AA) em comparação com as GRAs de *N. caninum* (102300 AA). As diferenças no número de aminoácidos não alteraram significativamente a proporção de aminoácidos nas GRAs de cada parasita (Figura 4a).

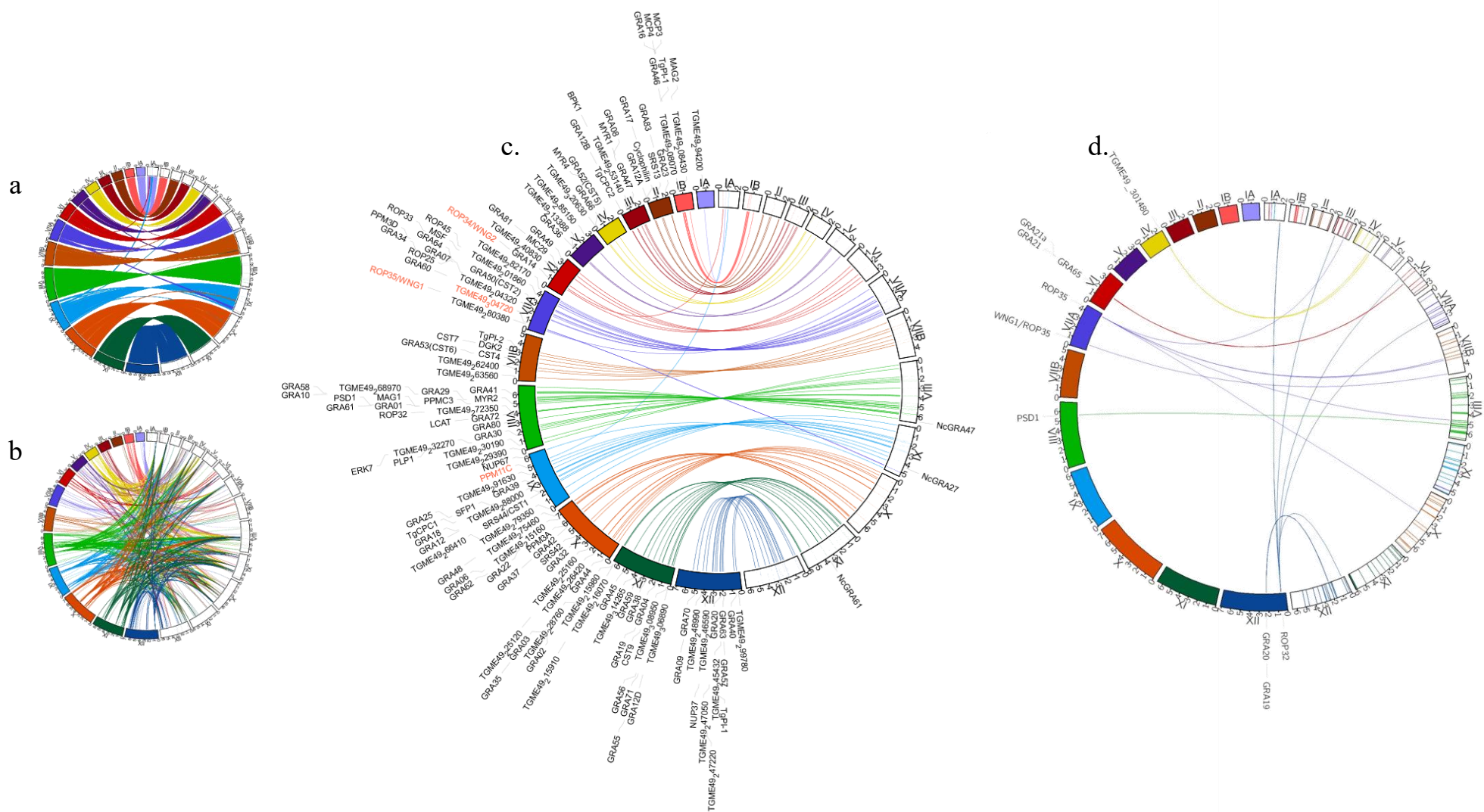


Figura 3. Existe uma grande diversidade de GRAs ortólogas de *N. caninum* com padrões de conservação divergente nos genomas dos parasitas. a. Diagrama de circos ilustrando todos os genes ortólogos entre *N. caninum* e *T. gondii*. b. Genes ortólogos não sintênicos entre os parasitas. c. GRAs ortólogas sintênicas entre *T. gondii* e *N. caninum*. d. GRAs ortólogas não sintênicas. Para todos os diagramas de CIRCOS: Lado esquerdo, ideograma de *T. gondii*. Lado direito, ideograma de *N. caninum*.

Confirmando as observações, foram comparados os pesos das proteínas em kDa para cada parasita, observando-se de forma geral que os pesos das proteínas são conservados, com um coeficiente de correlação de Pearson de 0,974 e um valor de $p < 0,0001$. Exceções incluem as proteínas GRA63, GRA44, ROP45 e TGME49_288000, onde os ortólogos de *T. gondii* apresentam maior peso, e a GRA41, onde o ortólogo em *N. caninum* é maior (Figura 4b).

Foi realizado um alinhamento de todas as sequências de proteínas de *T. gondii* e seus ortólogos em *N. caninum* utilizando o MUSCLE, com o objetivo de entender melhor a similaridade entre essas proteínas. Observou-se que 60,9% (89 proteínas) apresentam mais de 50% de identidade (Figura 4c). Isso revela uma estrutura primária divergente em ambos os parasitas, onde há proteínas com baixa identidade, como por exemplo a GRA03 (TGME49_227280/NCLIV_045870; 27,66% de identidade), e proteínas com alta identidade, como a proteína de exportação de mRNA (TGME49_272350/NCLIV_034950; 95,25% de identidade).

Para confirmar as observações feitas a partir das comparações da estrutura primária, também alinhamos a estrutura terciária de cada proteína utilizando os modelos do AlphaFold. Os perfis de identidade das estruturas terciárias também mostraram padrões divergentes, com apenas 39,8% das proteínas apresentando uma identidade superior a 50% (Figura 4d). Observou-se que os padrões de identidade podem depender da complexidade das proteínas (Figura 4d). Proteínas com baixa complexidade estrutural, como GRA03 ou MYR2 (TGME49_270700/NCLIV_036070), exibiram baixa identidade (11,4% e 3,55%, respectivamente), enquanto proteínas com alta complexidade, como a proteína de exportação de mRNA (TGME49_272350/NCLIV_034950), apresentaram uma identidade mais alta (84,81%).

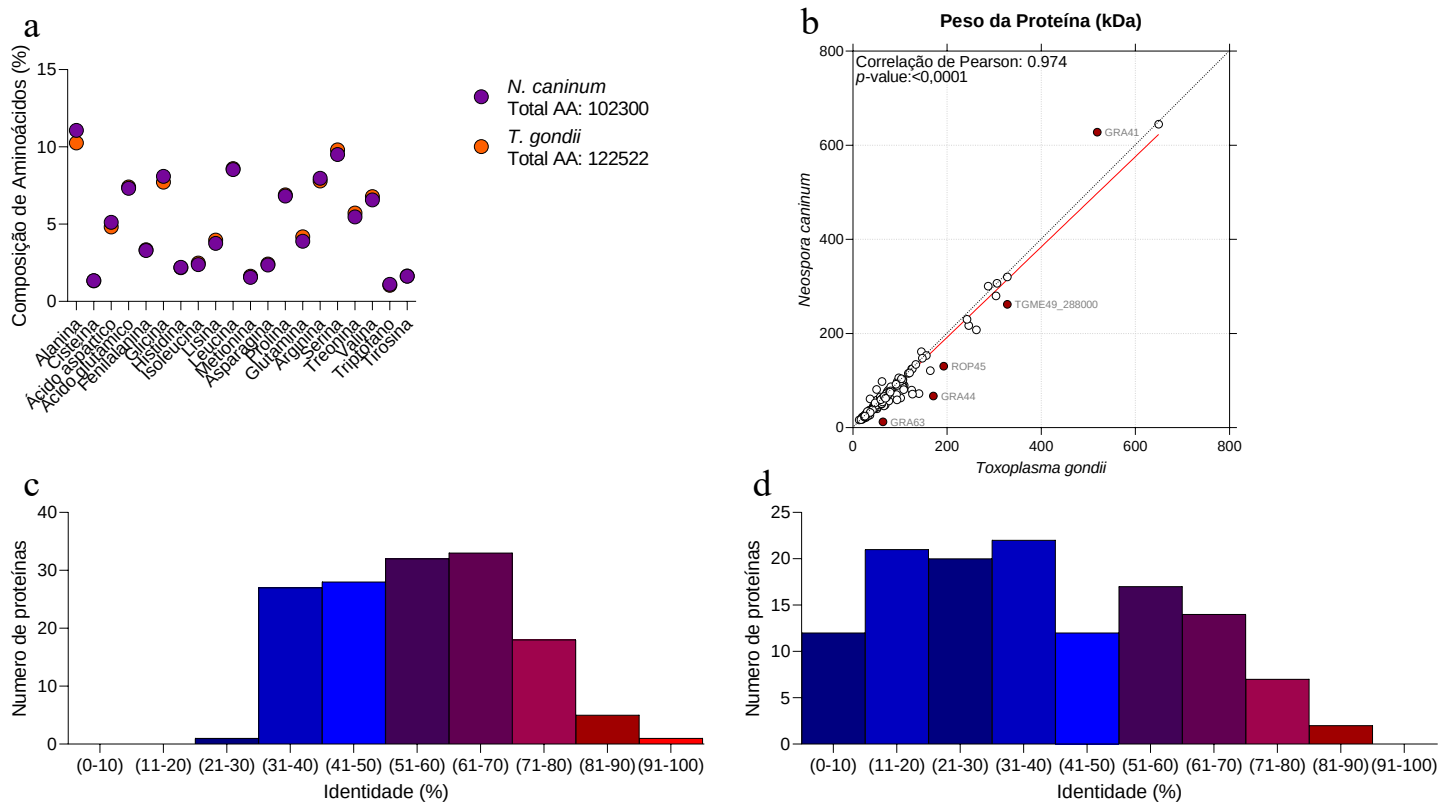


Figura 4. As GRAs apresentam semelhanças e diferenças estruturais entre os parasitas *N. caninum* e *T. gondii*. a. Composição de aminoácidos de todas as sequências de GRA para ambos os parasitas. b. Regressão linear comparando o peso das proteínas (kDa) para ambos os parasitas. Em vermelho estão destacadas as proteínas com maiores diferenças. c. Perfil de identidade a partir do alinhamento MUSCLE de cada GRA. d. Perfil de identidade a partir do alinhamento FATCAT de cada GRA.

5.4 Ensaio de biotinilação por proximidade identificou uma grande diversidade de GRAs de *N. caninum*

Foram realizados ensaios de biotinilação por proximidade das proteínas GRAs para confirmar as predições sobre os ortólogos de *N. caninum*. Nesse processo, foram identificadas todas as proteínas que possivelmente interagem com a GRA48, previamente descrita para o parasita (MINEO et al., 2022). Observou-se inicialmente que a GRA48 biotinada interagiu com um total de 158 proteínas, distribuídas por todos os compartimentos subcelulares do parasita. As organelas mais representadas na interação com a GRA48 foram os grânulos densos, com 23,4% das proteínas, o citosol, com 20,1%, proteínas associadas ao núcleo, mas não à cromatina, com 15%, e proteínas associadas ao aparelho de Golgi, com 12,3% (Figura 5a).

Um total de 31 GRAs interagiu com a GRA48 biotinada, com as proteínas NCLIV_060220 (19,0%), CST9 (8,8%), GRA02 (7,1%), GRA70 (6,8%), ROP32 (6,1%) e GRA71 (5,4%) apresentando o maior número de interações, sendo as mais representadas (Figura 5b).

Utilizando como estratégia a incorporação de uma GRA exógena, a GRA24 de *T. gondii* (MOTA et al., 2016), foi identificado um número maior de proteínas que interagem com a GRA usada como isca. Observou-se um total de 531 proteínas, distribuídas principalmente nos grânulos densos (22,4%), no reticulo endoplasmático (23,8%) e em proteínas do núcleo, mas não à cromatina (12,4%) (Figura 5c). Em relação as GRAs que interagem com a GRA24 exógena, um total de 81 proteínas foram identificadas, sendo a NCLIV_060220 (13%) a que apresentou um maior número de interações, seguida pela GRA02 (5,7%), MAG1 (4,6%), GRA57 (3,4%) e a NCLIV_019770 (3,76%) (Figura 5d).

Todas as GRAs que interagiram com a NcGRA48 também interagiram com a TgGRA24, sem que fossem identificadas GRAs diferentes com a GRA48 (Figura 5e). O ensaio de biotinilação por proximidade permitiu identificar 55,86% das GRAs listadas por ortologia e sintenia, demonstrando a diversidade de GRAs de *N. caninum* e confirmando a eficácia desta ferramenta para identificar novas proteínas para estudos de biologia parasitária.

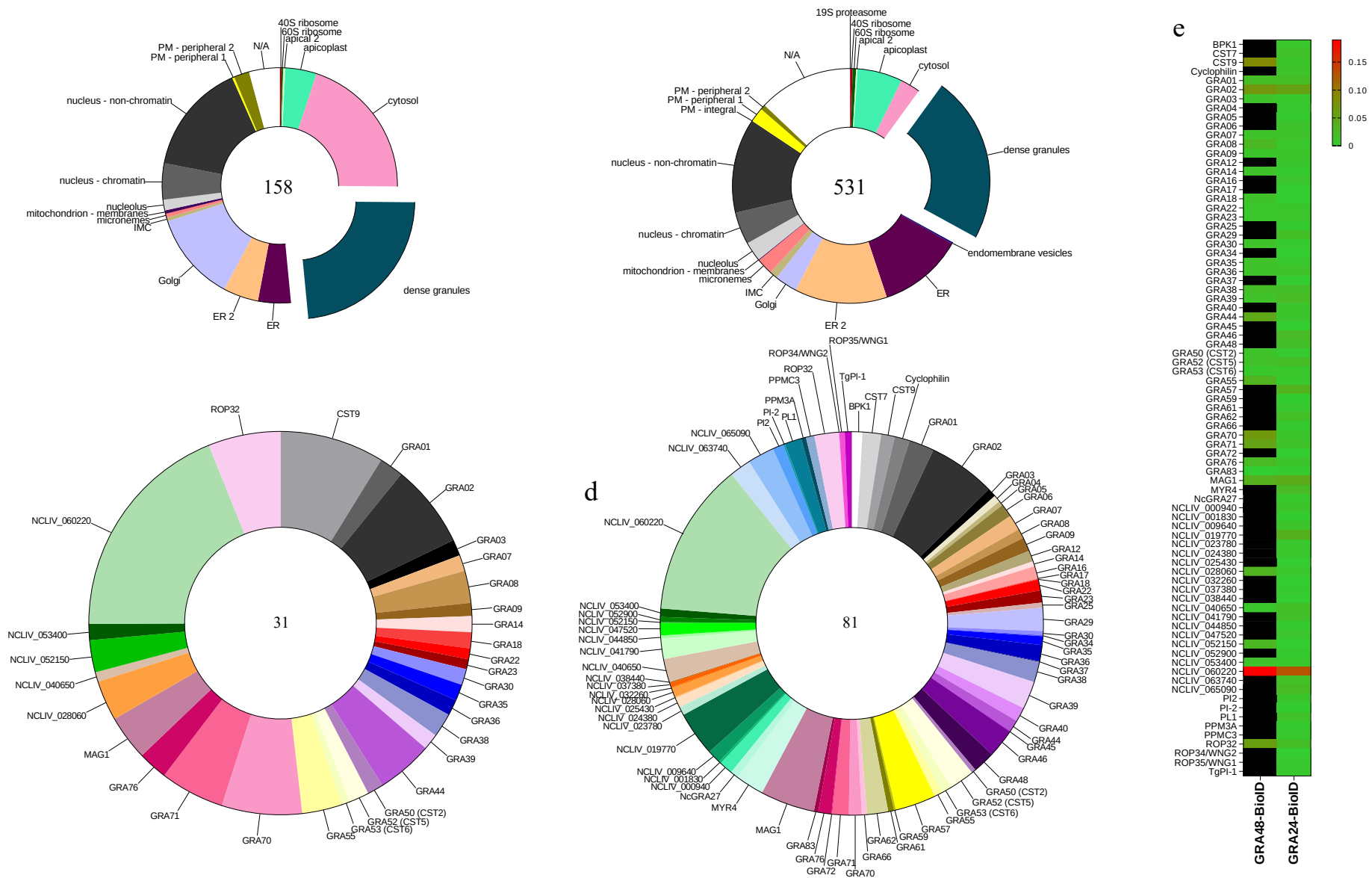


Figura 5. O ensaio de BioID revelou uma diversidade de GRAs ainda não descritas para *N. caninum*. a. Categorização subcelular do total de proteínas que interagem com a GRA48. b. GRAs identificadas que interagem com a GRA48. c. Categorização subcelular das proteínas que interagem com a TgGRA24. d. GRAs identificadas que interagem com a TgGRA24. e. *Heatmap* indicando o total de GRAs que interagem com a GRA48 e a TgGRA24 indicando o número de vezes que a proteína foi identificada. Em preto são as proteínas que não apareceram no ensaio.

5.5 Identificação de GRAs de *N. caninum* por imunofluorescência

Cinco proteínas GRAs foram selecionadas para o estudo a partir da lista gerada com base na ortologia, em ensaios de BioID, ou por serem exclusivas de *N. caninum*. As proteínas GRA62 (NCLIV_052280) e GRA83 (NCLIV_006800) já haviam sido previamente descritas para *T. gondii* em estudos anteriores (CYGAN et al., 2021; THIND et al., 2023). Em contraste, a proteína hipotética (NCLIV_001830) parece não apresentar um ortólogos anotado de *T. gondii* no ToxoDB. Já a GRA48 (NCLIV_069360) e a NSG1 (NCLIV_066730) são GRAs recentemente descritas para *N. caninum*, sendo a NSG1 exclusiva de *N. caninum* sem a presença dela em nenhum parasita do filo Apicomplexa (MINEO et al., 2022).

Para confirmar a localização das proteínas de interesse, foi utilizada uma abordagem de etiquetagem endógena, na qual três epítomos de hemaglutinina (3xHA) e um gene de resistência à pirimetamina (DHFR) foram adicionados à região C-terminal de cada proteína, utilizando o sistema CRISPR/Cas9 em taquizoítos de *N. caninum* (Figura 6a). Com o uso do anticorpo 21H7, previamente descrito como marcador de GRAs, foi possível observar uma sobreposição entre a hemaglutinina e a localização esperada das proteínas, confirmando a presença dessas proteínas dentro do vacúolo parasitóforo (VP) (Figura 6b). Além disso, para corroborar essa localização, foi empregado o anticorpo 4C1, que marca a superfície do taquizoíto, permitindo observar a distribuição das proteínas de interesse tanto dentro do VP quanto no citoplasma do parasita em alguns casos. Especificamente, nas proteínas GRA48 e NSG1, observou-se que parte da proteína é retida no citoplasma antes de ser exportada para o lúmen do VP (Figura 6c), sugerindo um mecanismo de transporte ou retenção diferencial para essas proteínas.

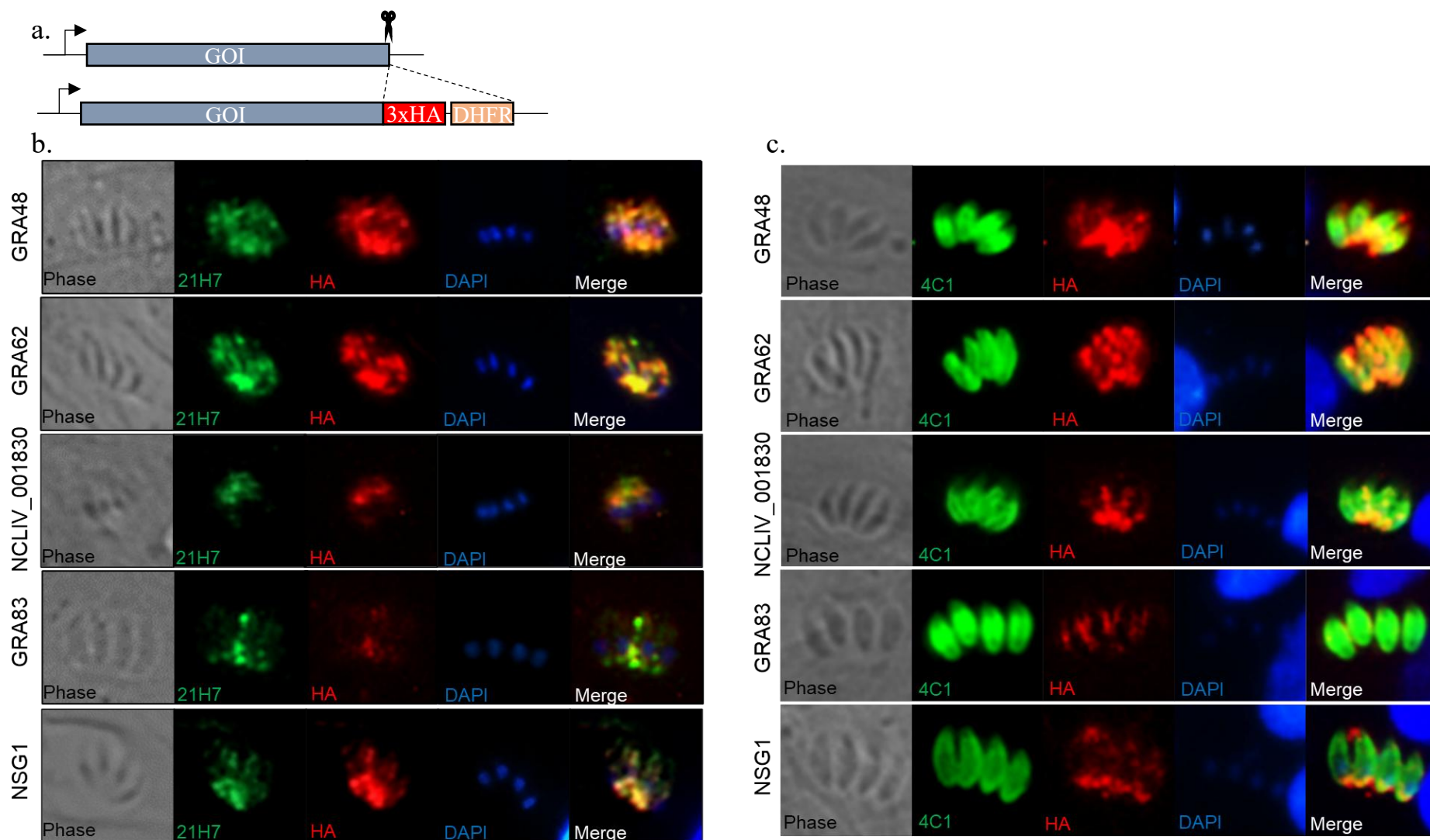


Figura 6. O etiquetado endógeno das GRAs revela a localização no VP das proteínas. a. Estratégia de etiquetagem endógena com epítomos de hemaglutinina. b. Imunofluorescência das GRA de *N. caninum* colocalizando com o anticorpo 21H7, marcador de GRA. c. Imunofluorescência das GRA de *N. caninum* colocalizando com o anticorpo 4C1 de superfície de taquizoíto.

5.6 A GRA48 tem um papel na virulência do parasita *In vitro*, mas não regula fatores críticos de resposta imune do hospedeiro

Para entender melhor a função da GRA48 na biologia parasitária de *N. caninum*, foram desenvolvidos parasitas geneticamente deficientes para essa proteína. Utilizando a metodologia CRISPR/Cas9, a região codificadora do gene GRA48 foi removida em parasitas previamente marcados endogenamente com hemaglutinina (Figura 7a), e o gene HXGPRT, que confere resistência ao antibiótico MX, foi incorporado.

Por meio do ensaio de placa, observou-se que os parasitas deficientes para GRA48 (NcΔ*gra48*) reduziram significativamente o tamanho dos focos de lise após 9 dias de infecção em células HFF, em comparação com os parasitas parentais (NcLiv). Isso sugere que *N. caninum* necessita da GRA48 para a replicação *in vitro* e, conseqüentemente, para sua virulência (Figuras 7b e 7c).

Considerando a importância da GRA48 na replicação *in vitro*, foi investigado seu papel na ativação da resposta imune dos hospedeiros. BMDMs foram infectadas com taquizoítos de NcLiv e NcΔ*gra48* por 3 horas, com o objetivo de avaliar a expressão de genes cruciais para a resposta imune, como *Nos2* e *Nox2*. Observou-se que não houve diferenças significativas nos níveis de expressão gênica desses dois genes quando infectados com parasitas parentais ou parasitas deficientes para GRA48 (Figuras 7d e 7e).

Por fim, a partir do sobrenadante de BMDMs infectados com NcLiv, NcΔ*gra48* ou Naive, foi quantificada a quantidade de IL-12p40 produzida pelos macrófagos, sendo essa molécula essencial na ativação da resposta imune contra *N. caninum*. Foram observadas diferenças significativas na liberação de IL-12p40 em comparação com macrófagos naive, mas não foram observadas diferenças na liberação ao comparar parasitas nocaute com os parentais. Estes resultados sugerem que a presença de GRA48 é essencial para a replicação parasitária, mas não é uma molécula efetora da resposta imune imediata dos hospedeiros.

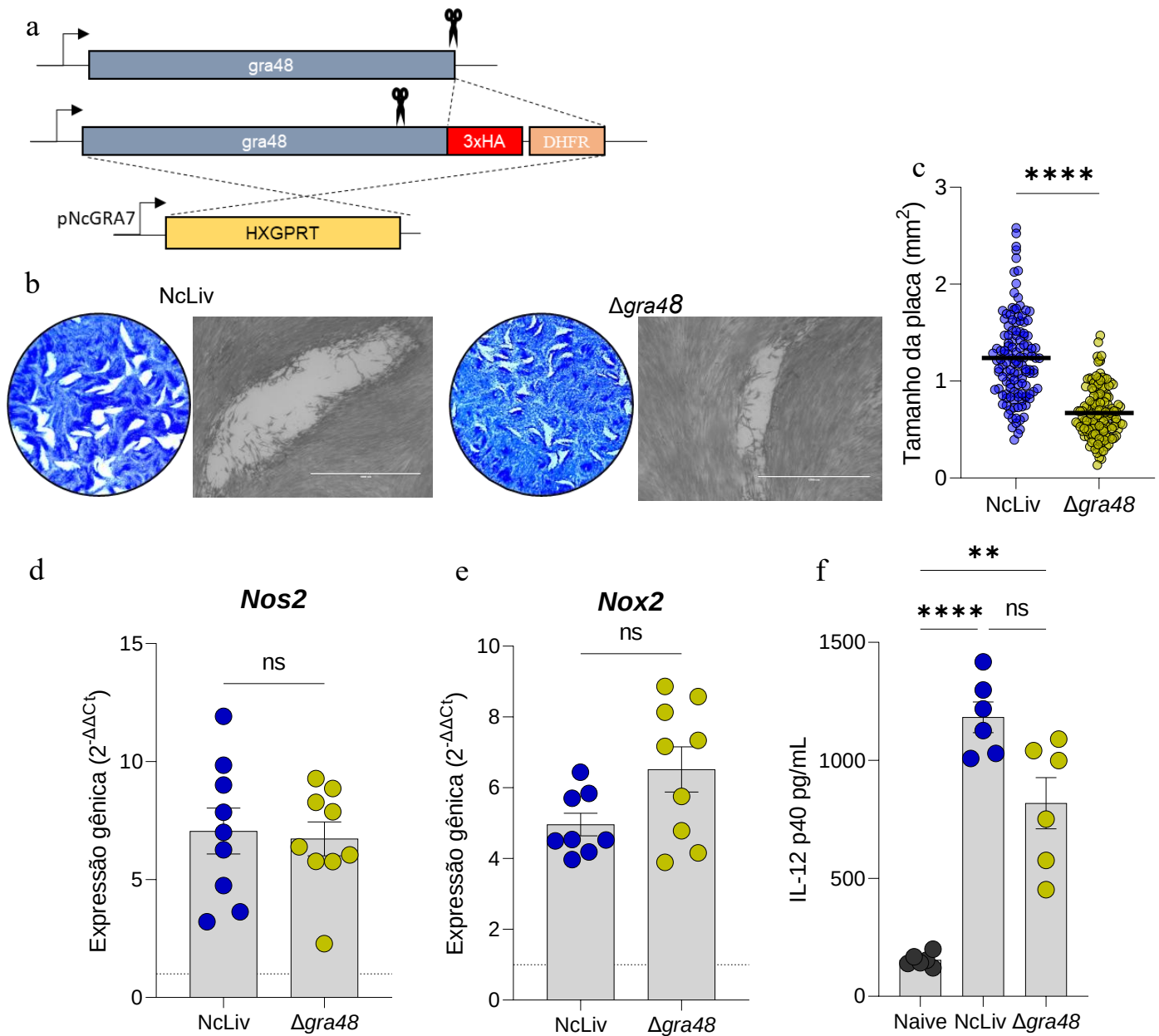


Figura 7. Ensaio *in vitro* revelam a importância da GRA48 na virulência do parasita. a. Estratégia para a geração de *N. caninum* deficientes para GRA48. b. Fotografias e microfotografias dos focos de lise gerados pelos parasitas parentais e nocaute. Escala das microfotografias 1000 μm . c. Área em mm^2 dos focos de lise aos 9 dias de infecção de células HFF. d. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nos2*. e. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nox2*. IL12p40 liberado por BMDMs infectados com parasitas parentais e nocaute. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.7 A GRA48 de *N. caninum* é necessária para a replicação durante a infecção inicial do hospedeiro

Complementando as análises *in vitro*, foram realizadas infecções experimentais para caracterizar a função da GRA48 na interação parasita-hospedeiro. Infecções com doses não letais foram feitas em camundongos de 6 a 8 semanas, e os animais foram eutanasiados em 1 dia pós-infecção (dpi) e 7 dpi. Com um dia pós-infecção, foi observada uma diminuição no parasitismo peritoneal em camundongos infectados com Nc Δ gra48 em comparação com camundongos infectados com NcLiv (Figura 8a). Adicionalmente, foram mensuradas as concentrações da citocina IL-12p40 (Figura 8b) e do óxido nítrico total (Figura 8c) liberados no líquido peritoneal. Observou-se que não há diferenças significativas nas concentrações dessas moléculas, o que sugere que a GRA48 é necessária para o processo de invasão e replicação precoce do parasita, mas não para a indução de moléculas efetoras do sistema imune.

Adicionalmente, aos 7 dias pós-infecção (7 dpi), foi observada uma recuperação da carga parasitária nos camundongos infectados com Nc Δ gra48, igualando-se à carga parasitária dos camundongos infectados com NcLiv (Figura 8d). Esse resultado sugere que, apesar de uma redução inicial no parasitismo peritoneal em camundongos infectados com Nc Δ gra48, o parasita é capaz de recuperar sua capacidade de replicação ao longo do tempo, eventualmente alcançando níveis semelhantes aos dos parasitas parentais.

Em relação às moléculas efetoras do sistema imunológico, como a IL-12p40 e NO, aos 7 dpi não foram detectadas diferenças significativas entre os camundongos infectados com parasitas parentais e aqueles infectados com parasitas nocaute (Figuras 8e e 8f). Esses achados reforçam a ideia de que a proteína GRA48 não desempenha um papel direto na indução da produção de IL-12p40 nem na síntese de óxido nítrico, duas moléculas-chave na resposta imune inata contra infecções. Em vez disso, a GRA48 parece estar mais intimamente relacionada com o processo de invasão e replicação inicial do parasita, mas sua ausência não impede a ativação dessas vias imunológicas no hospedeiro.

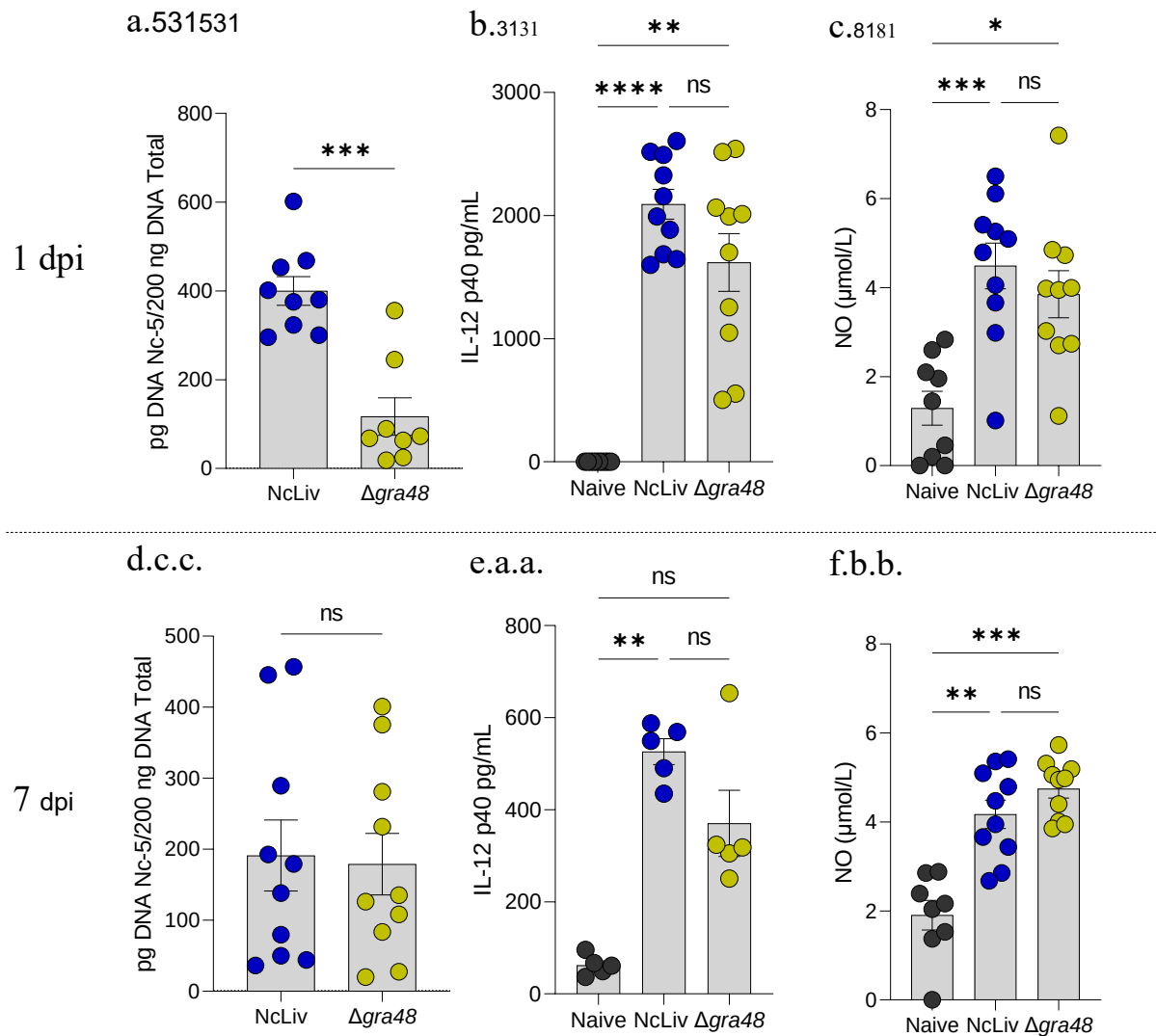


Figura 8. GRA48 tem um papel na invasão e replicação inicial de *N. caninum* em modelos murinos. a. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoniais com 1 dpi. b. IL12p40 Liberado no peritônio com 1 dpi. c. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 1 dpi. d. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoniais com 7 dpi. e. IL12p40 Liberado no peritônio com 7 dpi. f. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 7 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.8 A ausência de GRA48 atenua o impacto da infecção e está relacionada com o estabelecimento da infecção crônica

Para melhor compreender o papel da GRA48 na virulência, uma infecção experimental foi realizada com 1×10^6 taquizoítos por camundongo, acompanhando-se o peso dos camundongos durante 30 dias. Nos primeiros 10 dias de infecção, os camundongos infectados tanto com NcLiv quanto com Nc Δ gra48 apresentaram o mesmo padrão de variação de peso. Posteriormente, observou-se que, ao longo da doença, os camundongos infectados com Nc Δ gra48 apresentaram um aumento significativo de peso em comparação aos infectados com NcLiv, que mantiveram um peso estável em relação ao peso inicial (Figura 9a). Esses resultados indicam que a GRA48 de *N. caninum* pode ser essencial para o impacto da doença ao longo do tempo.

Assim, após 30 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados e seus cérebros foram retirados com a finalidade de verificar se os parasitas mantiveram a capacidade de migrar para o SNC e se estabelecer de forma crônica. Observou-se que o parasitismo cerebral diminuiu significativamente na ausência de GRA48 (Figura 9b), indicando o papel dessa proteína no estabelecimento da neosporose crônica.

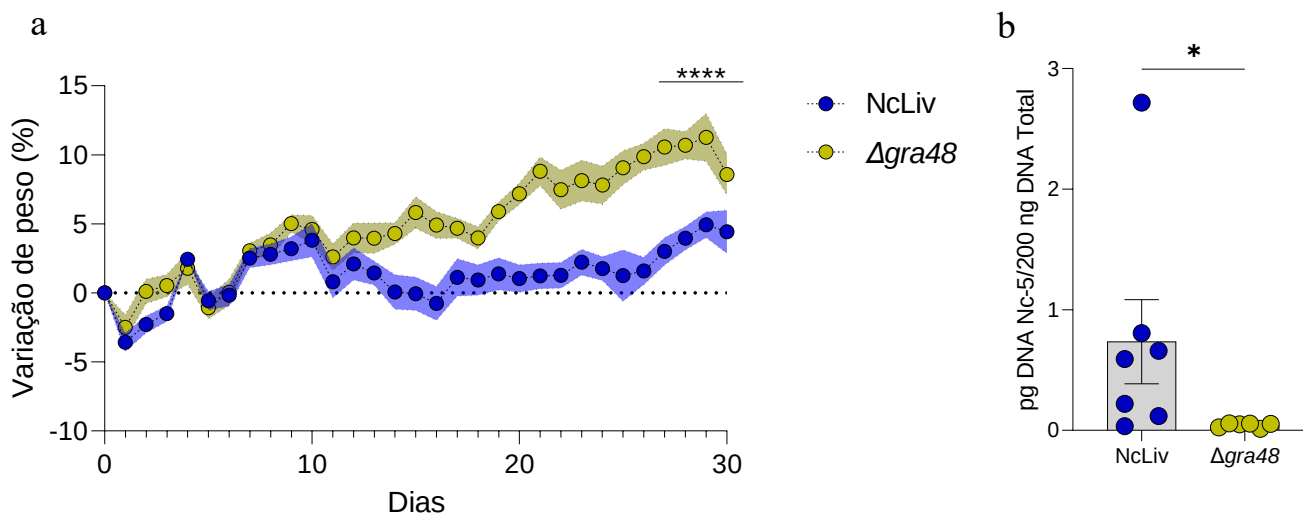


Figura 9. A GRA48 de *N. caninum* está relacionada diretamente com a cronicidade da neosporose. a. Variação de peso de camundongos C57BL/6 infectados com parasitas parentais e parasitas nocaute. **b.** Carga parasitaria aos 30 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.9 GRA62 é um fator essencial para a virulência *in vitro* e para a regulação de mRNA de *Nos2* e a liberação de IL12

Para esclarecer a função da GRA62, o gene foi depletado e foi inserido o gene HXGPRT como DNA de reparo e marcador de seleção, garantindo que apenas os parasitas que perderam a GRA62 pudessem crescer sob adição do MX (Figura 10a).

Após a confirmação da ablação gênica de GRA62, parasitas geneticamente deficientes para GRA62 (*NcΔgra62*) foram utilizados para infectar células HFF e avaliar sua capacidade na formação de focos de lise durante 9 dias. Os resultados revelaram que, na ausência de GRA62, *N. caninum* apresentou uma restrição significativa na formação de focos de lise, indicando uma capacidade reduzida de replicação e destruição das células hospedeiras. Foi observado que as placas pelos parasitas foram significativamente menores em comparação com as placas formadas pelos parasitas *NcLiv* (Figura 10b e 10c). Esses resultados sugerem que GRA62 pode desempenhar um papel na virulência e na capacidade de *N. caninum* se replicar nas células hospedeiras.

Posteriormente, para avaliar o papel da GRA62 na ativação de moléculas efetoras cruciais na resposta imune do hospedeiro, BMDMs foram infectados com parasitas *NcΔgra62* e *NcLiv*, por um período de 3 horas de infecção. Foi observado que na ausência de GRA62, a produção de mRNA da óxido nítrico sintase teve uma diminuição significativa quando comparado com os parasitas parentais (Figura 10d). Por outro lado, os níveis de mRNA do gene *Nox2* não foram alterados na ausência da GRA62 (Figura 10e). Os resultados sugerem que a GRA62 pode ser uma molécula efetora necessária para a via de óxido nítrico e para o controle parasitário por parte do hospedeiro.

Finalmente, foi avaliada a concentração de IL12p40 liberada por BMDMs infectados com *NcΔgra62* e *NcLiv*, por um período de 18 horas. Aqui, observou-se que houve uma queda na liberação de IL12p40 na ausência de GRA62 (Figura 10f), sugerindo que GRA62 pode atuar como uma molécula efetora de *N. caninum*.

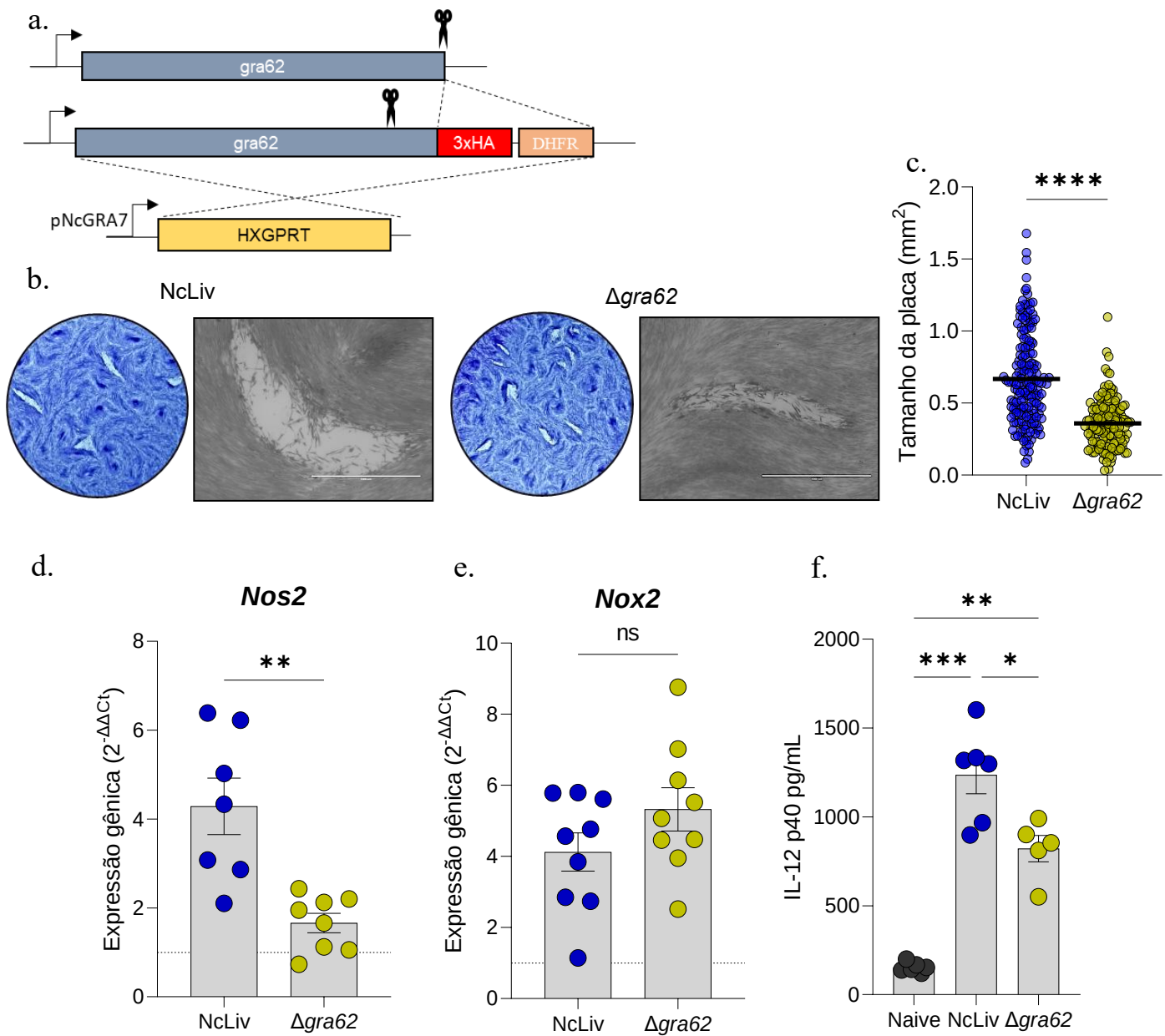


Figura 10. GRA62 é uma proteína efetora chave na virulência de *N. caninum*. a. Estratégia para a geração de *N. caninum* deficientes para GRA62. b. Fotografias e microfotografias dos focos de lise gerados pelos parasitas parentais e nocaute. Escala das microfotografias 1000μm. c. Área em mm² dos focos de lise aos 9 dias de infecção de células HFF. d. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nos2*. e. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nox2*. IL12p40 liberado por BMDMs infectados com parasitas parentais e nocaute. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.10 A GRA62 de *N. caninum* é essencial para a virulência do parasita nas fases hiperaguda e aguda da infecção

Dando continuidade à caracterização funcional da GRA62 em *N. caninum*, foram realizadas infecções experimentais para avaliar o papel dessa proteína nas fases hiperaguda e aguda da infecção. Durante a fase hiperaguda, observou-se que GRA62 é essencial para o parasitismo em células peritoneais (Figura 11a), com uma redução significativa na carga parasitária em parasitas geneticamente deficientes para essa proteína. Além disso, foram avaliados os níveis de IL-12 liberados no peritônio de camundongos experimentalmente infectados com parasitas NcΔ*gra62*. Não se observaram diferenças significativas em comparação com camundongos infectados com parasitas NcLiv (Figura 11b).

Devido à queda na produção de mRNA do gene *Nos2* em BMDMs infectados com NcΔ*gra62*, foi avaliado o óxido nítrico total no peritônio. Embora tenha sido observada uma redução na disponibilidade de NO no líquido peritoneal, não houve diferenças significativas em relação aos camundongos infectados com o parasita parental (Figura 11c). Esses resultados sugerem a participação de GRA62 na replicação precoce durante a infecção, mas também indicam que são necessários mais estudos para aprofundar o entendimento de seu papel como molécula efetora na fase hiperaguda da neosporose.

Durante a fase aguda da infecção também foi possível observar um papel direto da GRA62 na carga parasitaria, onde camundongos infectados com NcΔ*gra62*, tiveram uma concentração menor de DNA do parasita em comparação com camundongos infectados com NcLiv (Figura 11d). Da mesma forma que na fase hiperaguda, durante a fase aguda da infecção, não houve diferenças significativas na liberação de IL12p40 (Figura 11e) nem de NO (Figura 11f), corroborando então o papel da GRA62 na replicação de *N. caninum* em modelos *in vivo*.

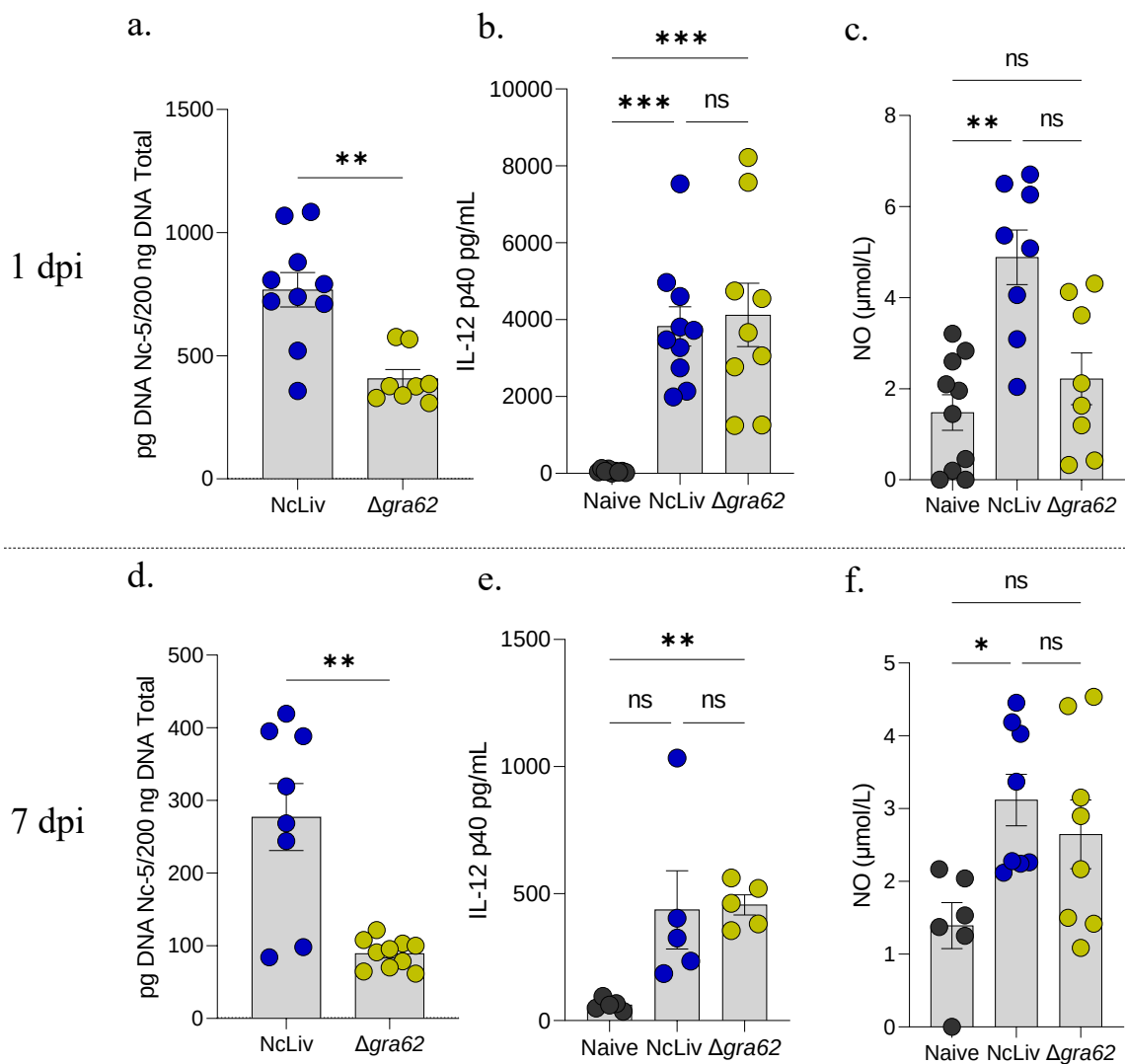


Figura 11. A GRA62 participa na replicação de *N. caninum* durante as fases hiperagudas e agudas da infecção. a. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoneais com 1 dpi. b. IL12p40 Liberado no peritônio com 1 dpi. c. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 1 dpi. d. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoneais com 7 dpi. e. IL12p40 Liberado no peritônio com 7 dpi. f. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 7 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.11 GRA62 não é necessária para o impacto na morbidade, mas desempenha um papel crucial na cronicidade da infecção

Foi avaliado o papel da GRA62 na morbidade de camundongos infectados experimentalmente. Ao longo de 30 dias de infecção, não foram observadas diferenças significativas na variação de peso entre os camundongos infectados com Nc Δ gra62 e aqueles infectados com NcLiv (Figura 12a). Esses achados sugerem que a patogenicidade de *N. caninum* provavelmente não depende da presença de GRA62.

Para investigar mais a fundo o papel da GRA62, foi realizada a análise da carga parasitária cerebral após 30 dias de infecção. Interessantemente, verificou-se que os camundongos infectados com Nc Δ gra62 apresentaram um parasitismo cerebral significativamente reduzido em comparação com os infectados com NcLiv (Figura 12b). Isso indica que a virulência, bem como a capacidade de replicação e disseminação do parasita, pode estar fortemente relacionada à presença da GRA62 em *N. caninum*. Esses resultados ampliam a compreensão sobre a função da GRA62, sugerindo que, embora não seja essencial para o impacto na morbidade, ela desempenha um papel crucial na disseminação e estabelecimento do parasita no sistema nervoso central, contribuindo para a cronicidade da infecção.

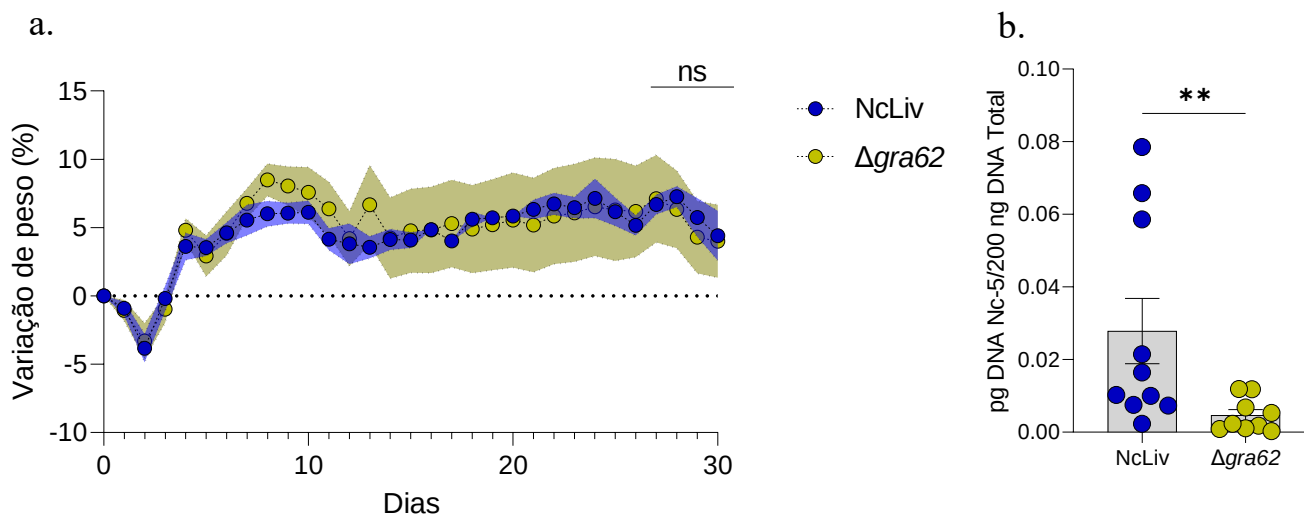


Figura 12. A GRA62 desempenha um papel na disseminação do parasita ao SNC. a. Variação de peso de camundongos C57BL/6 infectados com parasitas parentais e parasitas nocaute. b. Carga parasitária aos 30 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$

5.12 A proteína hipotética NCLIV_001830 é uma GRA que é exportada ao núcleo da célula hospedeira

Como mencionado anteriormente, a proteína NCLIV_001830 apresenta um padrão de localização típico das proteínas GRA, uma vez que se colocaliza com a GRA marcada pelo anticorpo 21H7 em ensaios de imunofluorescência. Um aspecto particularmente interessante observado foi que, em células infectadas por parasitas dentro de vacúolos contendo uma maior quantidade de taquizoítos, os núcleos, corados com DAPI, também exibiram co-marcação com a proteína NCLIV_001830. Essa colocalização parece ser dependente do número de taquizoítos e do tamanho do vacúolo dentro da célula infectada (Figura 13). Essas observações sugerem que a proteína NCLIV_001830, pode desempenhar um papel significativo como molécula efetora ou moduladora da célula hospedeira.

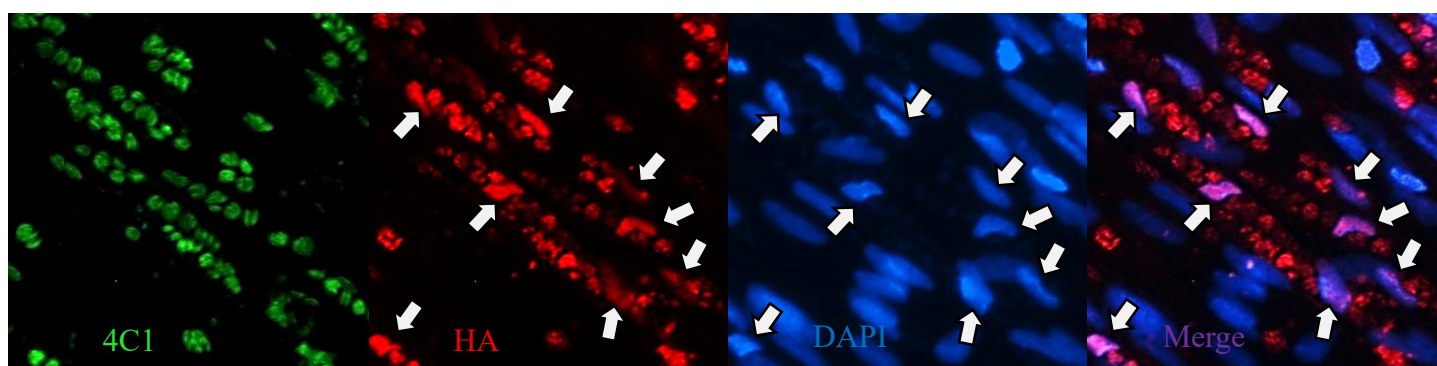


Figura 13. NCLIV_001830 é exportada ao núcleo da célula hospedeira. Imunofluorescência localizando a proteína de superfície 4C1 (Verde), a NCLIV_001830 (Vermelho), os núcleos (azul) e a sobreposição da proteína alvo com os núcleos. Setas brancas indicam os núcleos com a marcação da GRA.

5.13 A GRA NCLIV_001830 regula a expressão de mRNA, liberação de IL12p40 assim como a replicação de *N. caninum*

Para uma melhor compreensão da função da proteína hipotética NCLIV_001830, foram gerados parasitas geneticamente deficientes desse gene utilizando a metodologia CRISPR/Cas9. Nesse processo, o gene de resistência HXGPRT foi inserido como um marcador de seleção, permitindo a identificação dos parasitas geneticamente deficientes em NCLIV_001830 (Figura 14a).

Células HFF foram então infectadas por 9 dias com parasitas geneticamente modificados (*Δncliv_001830*) e com parasitas parentais NcLiv, com o objetivo de avaliar o papel dessa proteína na virulência e na replicação parasitária. Observou-se que, na ausência da proteína NCLIV_001830, houve uma diminuição significativa no tamanho das placas formadas, em comparação com os parasitas parentais (Figuras 14b e 14c). Esses resultados sugerem que a proteína é essencial para a replicação in vivo e desempenha um papel fundamental no ciclo biológico de *N. caninum*.

Dado que a NCLIV_001830 é exportada para o núcleo da célula hospedeira foi investigado seu impacto na expressão de genes chave da resposta imune em BMDMs infectados tanto com o parasita nocaute quanto com o parental. Analisando a expressão dos genes *Nos2* e *Nox2*, foi identificada uma diminuição significativa na expressão de ambos em células infectadas com os parasitas *Δncliv_001830*, em comparação com aqueles infectados com parasitas parentais (Figuras 14d e 14e). Essa redução na expressão gênica sugere que a NCLIV_001830 pode ter um papel crucial na regulação da expressão genética nas células hospedeiras, possivelmente modulando a resposta imunológica em favor da sobrevivência do parasita.

Por fim, ao avaliar o perfil de liberação da citocina IL-12p40 pelos macrófagos após 18 horas de infecção. Observou-se uma clara diminuição na liberação desta citocina extracelular em células infectadas com o parasita *Δncliv_001830*, em comparação com as infectadas pelo parasita parental (Figura 14f). Essa diminuição na liberação de IL-12p40 reforça a hipótese de que NCLIV_001830 desempenha um papel central na modulação da resposta imune da célula hospedeira, contribuindo para a patogenicidade de *N. caninum*.

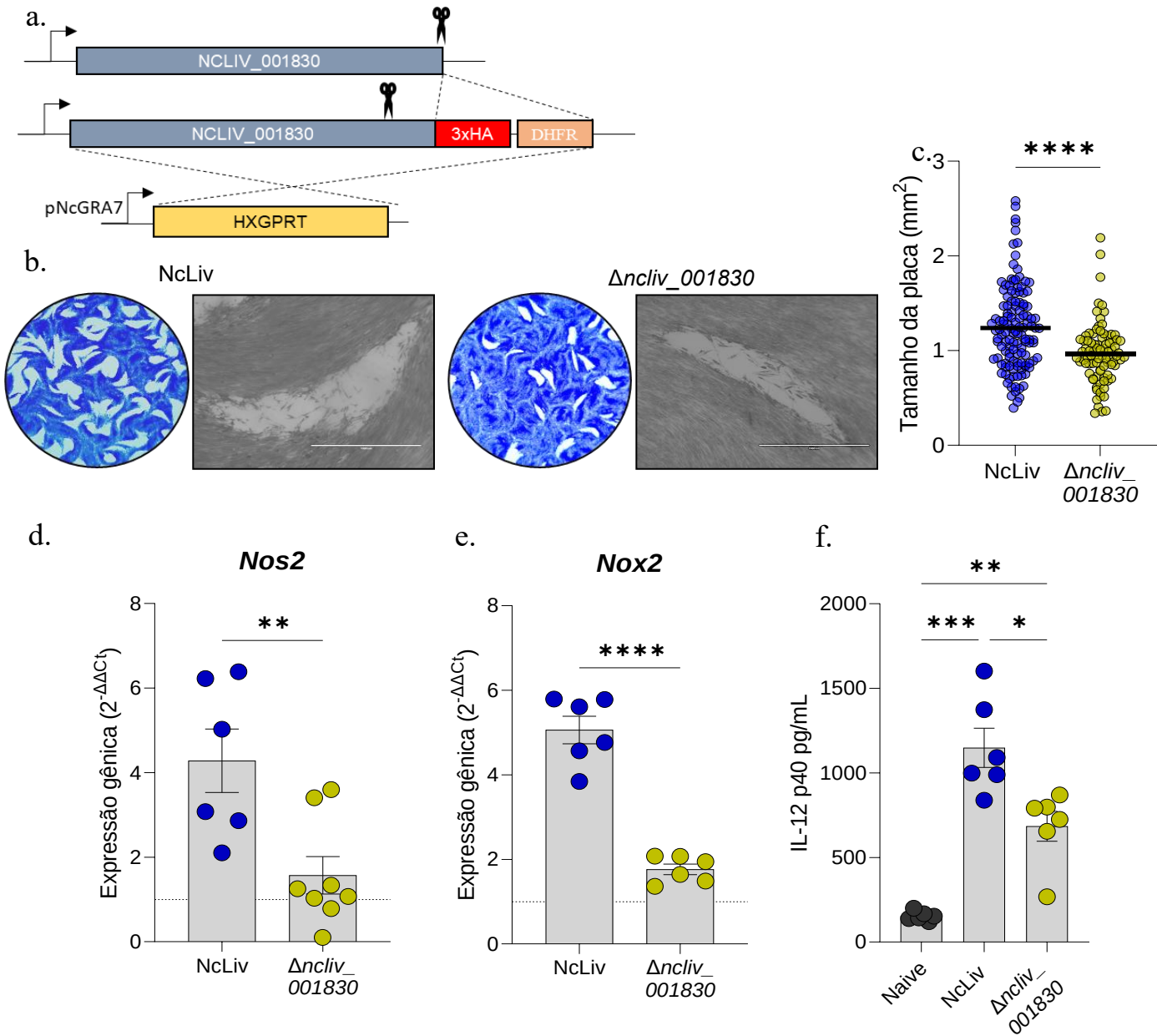


Figura 14. NCLIV_001830 modula a replicação e a virulência de *N. caninum*. a. Estratégia para a geração de *N. caninum* deficientes para NCLIV_001830. b. Fotografias e microfotografias dos focos de lise gerados pelos parasitas parentais e nocaute. Escala das microfotografias 1000µm. c. Área em mm² dos focos de lise aos 9 dias de infecção de células HFF. d. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nos2*. e. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nox2*. f. IL12p40 liberado por BMDMs infectados com parasitas parentais e nocaute. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.14 A ausência de NCLIV_001830 não altera o parasitismo na fase hiperaguda nem a liberação de IL12p40 e NO peritoneal

Com o objetivo de entender o papel da NCLIV_001830 como uma molécula reguladora da virulência e efetora em *N. caninum*, camundongos foram infectados com uma dose não letal de taquizoítos (1×10^6) e avaliados após 1 e 7 dias de infecção. Durante a fase hiperaguda da infecção, não foi identificado um papel direto da NCLIV_001830 no parasitismo peritoneal, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na carga parasitária entre camundongos infectados com $\Delta ncliv_001830$ e aqueles infectados com NcLiv (Figura 15a).

Além disso, a concentração de IL-12p40 no peritônio de camundongos infectados com parasitas nocaute e parentais foi medida, e os resultados indicaram que a produção de IL-12p40 em modelos *in vivo* não está relacionada à presença da proteína NCLIV_001830 (Figura 15b). Para completar a caracterização do papel desta proteína na modulação da resposta imune na fase hiperaguda, também foi analisada a concentração de NO peritoneal, onde não foram detectadas diferenças significativas em comparação com parasitas parentais (Figura 15c).

Na fase aguda da infecção, verificou-se que a depleção da proteína NCLIV_001830 no parasita resultou em uma redução significativa na carga parasitária após 7 dias de infecção, em comparação com parasitas NcLiv (Figura 15d). No entanto, as concentrações de IL-12p40 (Figura 15e) e NO (Figura 15f) permaneceram inalteradas nos camundongos infectados com parasitas $\Delta ncliv_001830$, em comparação com aqueles infectados com NcLiv. Esses achados indicam que, embora a proteína NCLIV_001830 não esteja diretamente envolvida na modulação da resposta imune em modelos murinos, ela é claramente essencial para a replicação de *N. caninum* durante o curso da infecção.

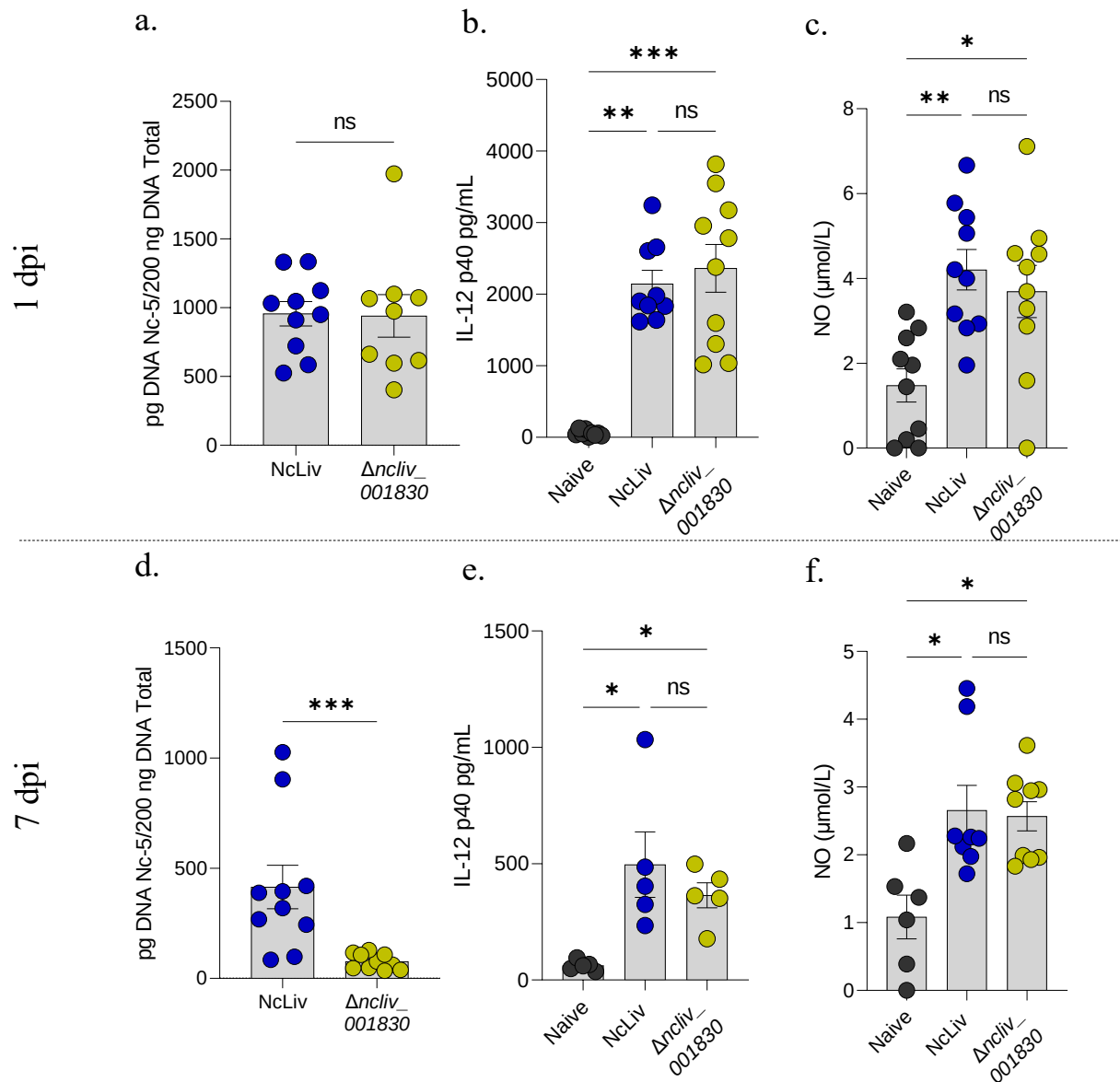


Figura 15. NCLIV_001830 está relacionada com a replicação parasitária na fase aguda da infecção. a. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoniais com 1 dpi. b. IL12p40 Liberado no peritônio com 1 dpi. c. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 1 dpi. d. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoniais com 7 dpi. e. IL12p40 Liberado no peritônio com 7 dpi. f. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 7 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.15 A ausência de NCLIV_001830 reduz o impacto da infecção e facilita estabelecimento da infecção crônica

Dando continuidade à caracterização funcional da proteína NCLIV_001830, foi realizada uma infecção experimental crônica, acompanhando-se a variação de peso dos camundongos durante 30 dias. Desde o início da infecção, foram observadas diferenças significativas na variação de peso entre os grupos infectados com $\Delta ncliv_001830$ e NcLiv. Os camundongos infectados com os parasitas nocaute apresentaram um aumento de peso significativo desde o início da infecção, em comparação aos camundongos infectados com NcLiv (Figura 16a). Esses resultados sugerem um papel crucial da proteína NCLIV_001830 na morbidade dos camundongos infectados, com sua ausência atenuando o impacto da infecção ao longo do tempo.

Após os 30 dias de infecção, foi avaliado o parasitismo cerebral dos camundongos, a fim de verificar a capacidade dos parasitas de estabelecer uma infecção crônica. Observou-se que os parasitas deficientes para NCLIV_001830 apresentaram uma capacidade reduzida de migrar para o cérebro, o que foi demonstrado por uma diminuição significativa na carga parasitária quando comparados com os parasitas parentais (Figura 16b). Assim, esses achados confirmam a relação da proteína NCLIV_001830 com a patogenicidade da doença e o estabelecimento de uma infecção crônica.

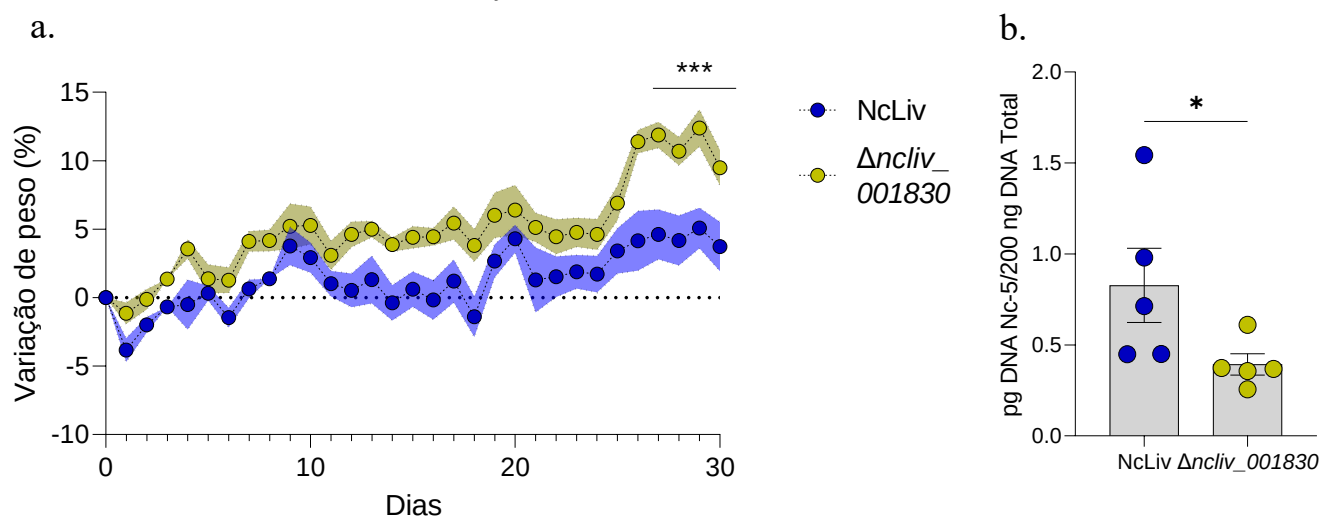


Figura 16. A NCLIV_001830 de *N. caninum* está relacionada com a cronicidade da neosporose. a. Variação de peso de camundongos C57BL/6 infectados com parasitas parentais e parasitas nocaute. **b.** Carga parasitária aos 30 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.16 A GRA83 de *N. caninum* está relacionada com a replicação do parasito em células HFF e a produção de IL12p40 em BMDMs

Dando continuidade à caracterização funcional das GRAs de *N. caninum*, a proteína GRA83 foi depletada utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9. A região codificante da proteína foi completamente removida e substituída pelo gene de resistência ao antibiótico MX (Figura 17a). Após a seleção dos parasitas geneticamente modificados, células HFF foram infectadas por um período de 9 dias com parasitas deficientes para GRA83 (NcΔ*gra83*) e NcLiv, a fim de avaliar a virulência *in vivo*. Observou-se que o parasita NcΔ*gra83* apresentou uma redução drástica em sua capacidade de formar focos de lise do mesmo tamanho que os parasitas NcLiv (Figuras 17b e 17c), demonstrando que a GRA83 desempenha um papel crucial na replicação de *N. caninum*.

Além disso, foi investigada a regulação da expressão gênica na célula hospedeira mediada pela GRA83. Para tanto, BMDMs foram infectadas por um período de 3 horas com os parasitas geneticamente modificados. Comparando com os parasitas NcLiv, não foram observadas alterações significativas na regulação da expressão dos genes *Nos2* (Figura 17d) e *Nox2* (Figura 17e). No entanto, as concentrações de IL12p40 liberadas por BMDMs infectadas com os parasitas nocaute foram significativamente reduzidas em comparação com aquelas infectadas com os parasitas parentais (Figura 17f). Esses resultados sugerem que a GRA83 é indispensável para o ciclo de replicação do parasita e que, além disso, pode atuar como uma molécula efetora importante na modulação da via de sinalização de IL12.

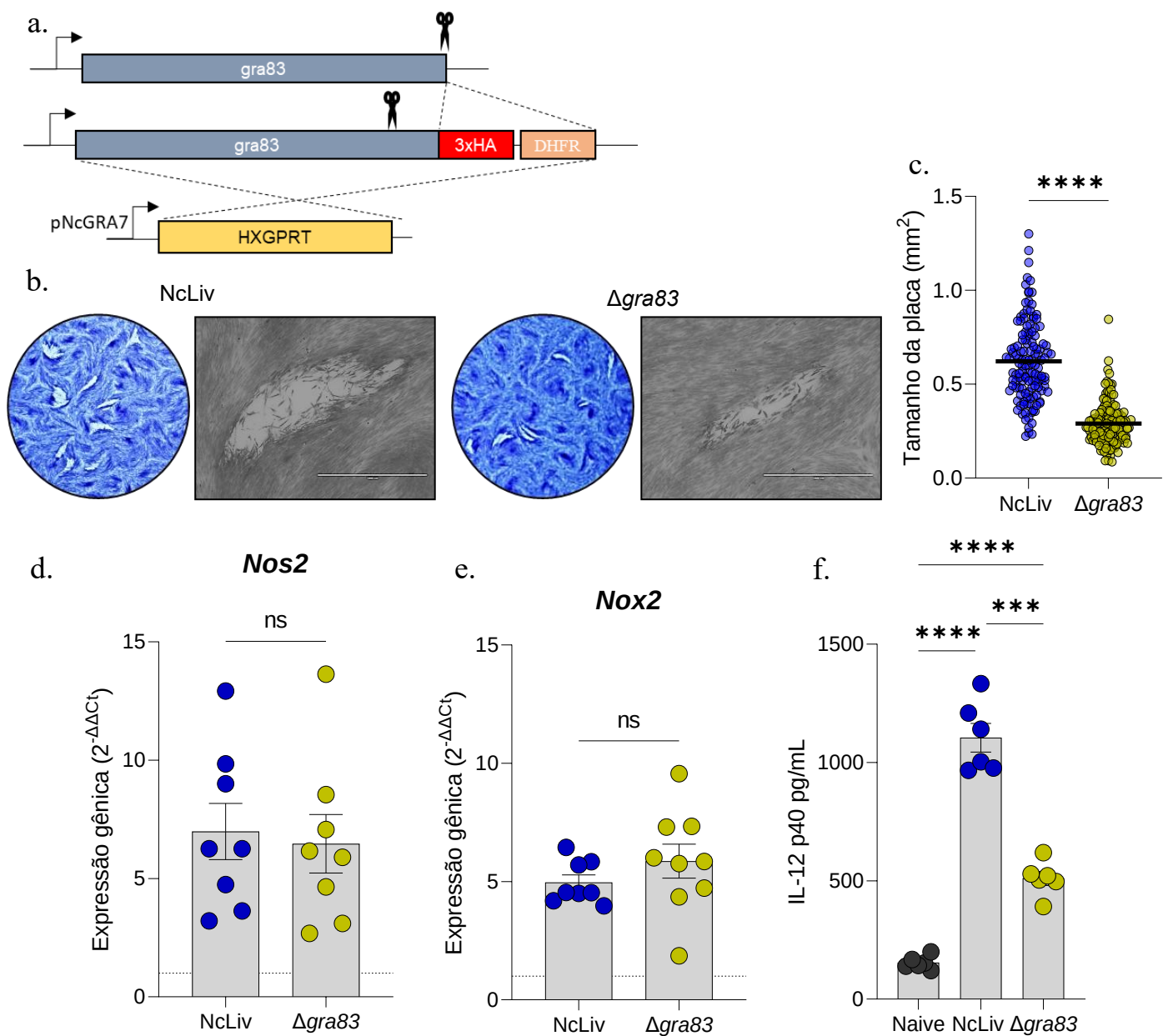


Figura 17. A replicação e liberação de IL12p40 são alterados na ausência de GRA83. a. Estratégia para a geração de *N. caninum* deficientes para GRA83. b. Fotografias e microfotografias dos focos de lise gerados pelos parasitas parentais e nocaute. Escala das microfotografias 1000μm. c. Área em mm² dos focos de lise aos 9 dias de infecção de células HFF. d. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nos2*. e. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nox2*. f. IL12p40 liberado por BMDMs infectados com parasitas parentais e nocaute. Nível de significância considerado p < 0,05.

5.17 O IL12p40 peritoneal é reduzido na ausência de GRA83 durante a infecção aguda

Para uma melhor caracterização do papel funcional da proteína GRA83 na interação parasita-hospedeiro, foram realizadas infecções experimentais de 1 e 7 dias com os parasitas NcΔ*gra83* e NcLiv, com o objetivo de avaliar o parasitismo, a produção de IL12p40 e óxido nítrico (NO) em um modelo murino.

Durante a fase hiperaguda da infecção, observou-se que os parasitas nocaute apresentaram um fenótipo semelhante aos parasitas parentais em relação ao parasitismo peritoneal, sem diferenças significativas na concentração de DNA do parasita detectado nas células do peritônio (Figura 18a). Em relação à liberação de IL12p40 (Figura 18b) e óxido nítrico (Figura 18c), os parasitas nocaute não mostraram alterações significativas quando comparados aos parasitas NcLiv. Esses achados sugerem que, durante a fase precoce da infecção por *N. caninum*, a proteína GRA83 não desempenha um papel relevante na modulação da interação entre o parasita e o hospedeiro.

Na fase aguda, aos 7 dias de infecção, a carga parasitária de NcΔ*gra83* manteve-se semelhante à dos parasitas parentais (Figura 18d). No entanto, ao avaliar os níveis de IL12p40, observou-se uma redução significativa na liberação dessa citocina nos camundongos infectados com NcΔ*gra83* em comparação aos infectados com NcLiv (Figura 18e). Em relação à produção de NO no peritônio durante a fase aguda, não foram detectadas alterações significativas entre os parasitas NcΔ*gra83* e NcLiv. Esses resultados indicam que a proteína GRA83 pode estar relacionada com a estimulação tardia da resposta imune do hospedeiro, desempenhando um papel específico na modulação da resposta imune durante a progressão da infecção.

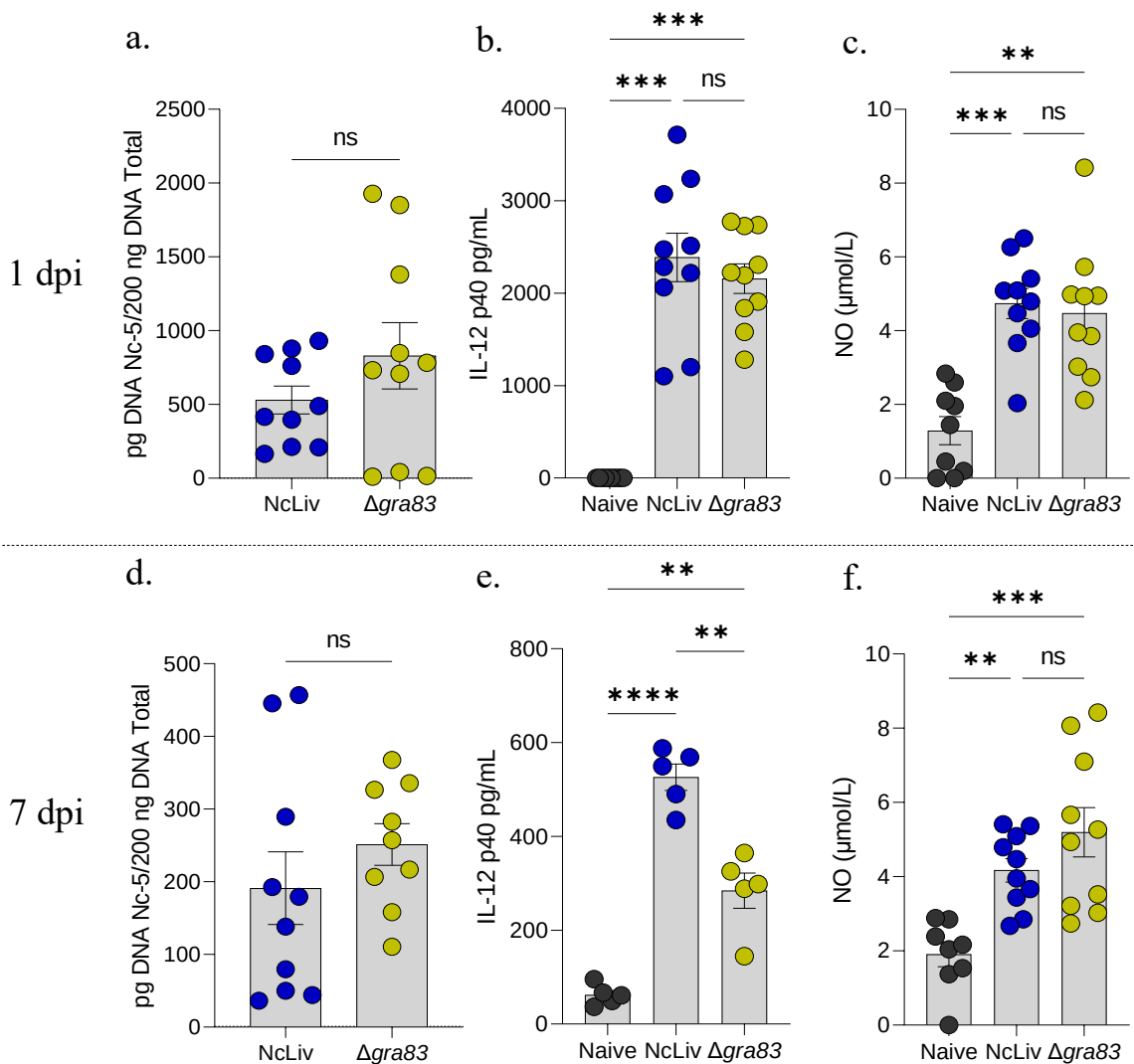


Figura 18. A GRA83 modula a liberação de IL12 durante a progressão da infecção por *N. caninum*. a. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoniais com 1 dpi. b. IL12p40 Liberado no peritônio com 1 dpi. c. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 1 dpi. d. Carga parasitária determinada por qPCR de células peritoniais com 7 dpi. e. IL12p40 Liberado no peritônio com 7 dpi. f. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 7 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.18 A GRA83 é necessária para o impacto da doença em modelos murinos e para o estabelecimento da cronicidade

Para concluir a caracterização funcional da GRA83 de *N. caninum*, foi desenvolvido um modelo crônico no qual o peso dos camundongos foi monitorado ao longo da infecção para avaliar a morbidade. Desde o início da infecção com uma dose não letal de taquizoítos de Nc Δ gra83 e NcLiv, observou-se um ganho de peso significativamente maior nos camundongos infectados com os parasitas nocaute (Figura 19a). Esses achados indicam que, na ausência da GRA83, o impacto da doença é atenuado, sugerindo que esta proteína é crucial para a patogenicidade de *N. caninum*.

Além disso, ao avaliar a carga parasitária nos cérebros dos camundongos após 30 dias de infecção, foi detectada uma menor concentração de DNA de *N. caninum* nos camundongos infectados com Nc Δ gra83 em comparação com os infectados com NcLiv (Figura 19b). Esses resultados reforçam a importância da GRA83 não apenas para a virulência do parasita, mas também para o estabelecimento de uma infecção crônica, indicando seu papel crucial na formação de cistos SNC.

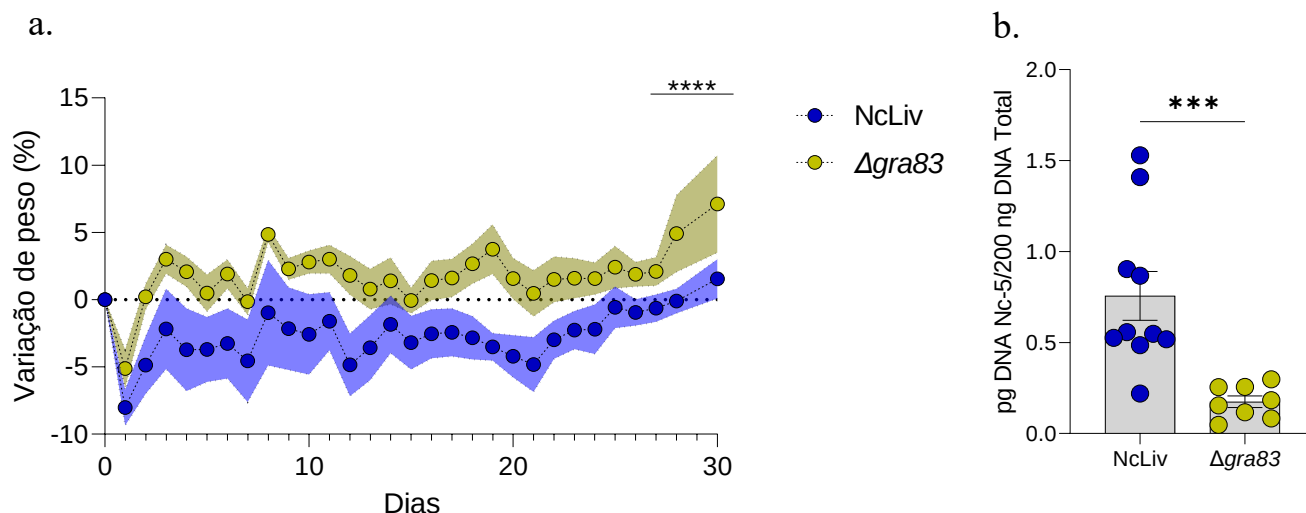


Figura 19. A GRA83 regula a virulência e o estabelecimento da infecção crônica de *N. caninum*. a. Variação de peso de camundongos C57BL/6 infectados com parasitas parentais e parasitas nocaute. b. Carga parasitária aos 30 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.19 A GRA específica de *N. caninum*, NSG1, regula a liberação de IL12 de BMDMs

Para elucidar o papel da proteína NSG1, específica de *N. caninum*, foi realizado o nocaute do gene utilizando a técnica CRISPR/Cas9. Além disso, foi inserido um gene de resistência ao antibiótico MX como marcador de seleção para garantir a eficiência do processo (Figura 20a). Após a seleção com o antibiótico, os parasitas geneticamente deficientes para NSG1 (*NcΔnsg1*) e os parasitas parentais *NcLiv*, usados como controle, foram utilizados para infectar células HFF com o objetivo de avaliar a formação de focos de lise. Após 9 dias de cultivo, observou-se que o tamanho das placas formadas pelos parasitas *NcΔnsg1* não apresentou diferenças significativas em comparação com os parasitas parentais (Figuras 20b e 20c), sugerindo que a NSG1 não desempenha um papel direto na replicação parasitária.

Aprofundando a compreensão do impacto da ausência de NSG1 na interação parasita-hospedeiro, BMDMs foram infectados durante 3 horas com os parasitas nocaute e os parentais, com o intuito de avaliar a expressão dos genes *Nos2* e *Nox2*, ambos cruciais para a resposta imune contra *N. caninum*. Surpreendentemente, a ausência da proteína NSG1 não resultou em alterações significativas na expressão desses genes quando comparados com os parasitas parentais (Figuras 20d e 20e).

Por fim, a liberação de IL12p40, uma citocina chave na resposta imune contra *N. caninum*, foi mensurada em macrófagos infectados. Foi observado que a ausência de NSG1 levou a uma diminuição significativa na secreção de IL12p40 (Figura 20f). Esse achado sugere que, apesar de NSG1 não influenciar diretamente o perfil de expressão gênica do hospedeiro, essa proteína pode desempenhar um papel na modulação da resposta imune, particularmente na regulação da secreção de citocinas que são vitais para o controle do parasita em modelos *in vitro*.

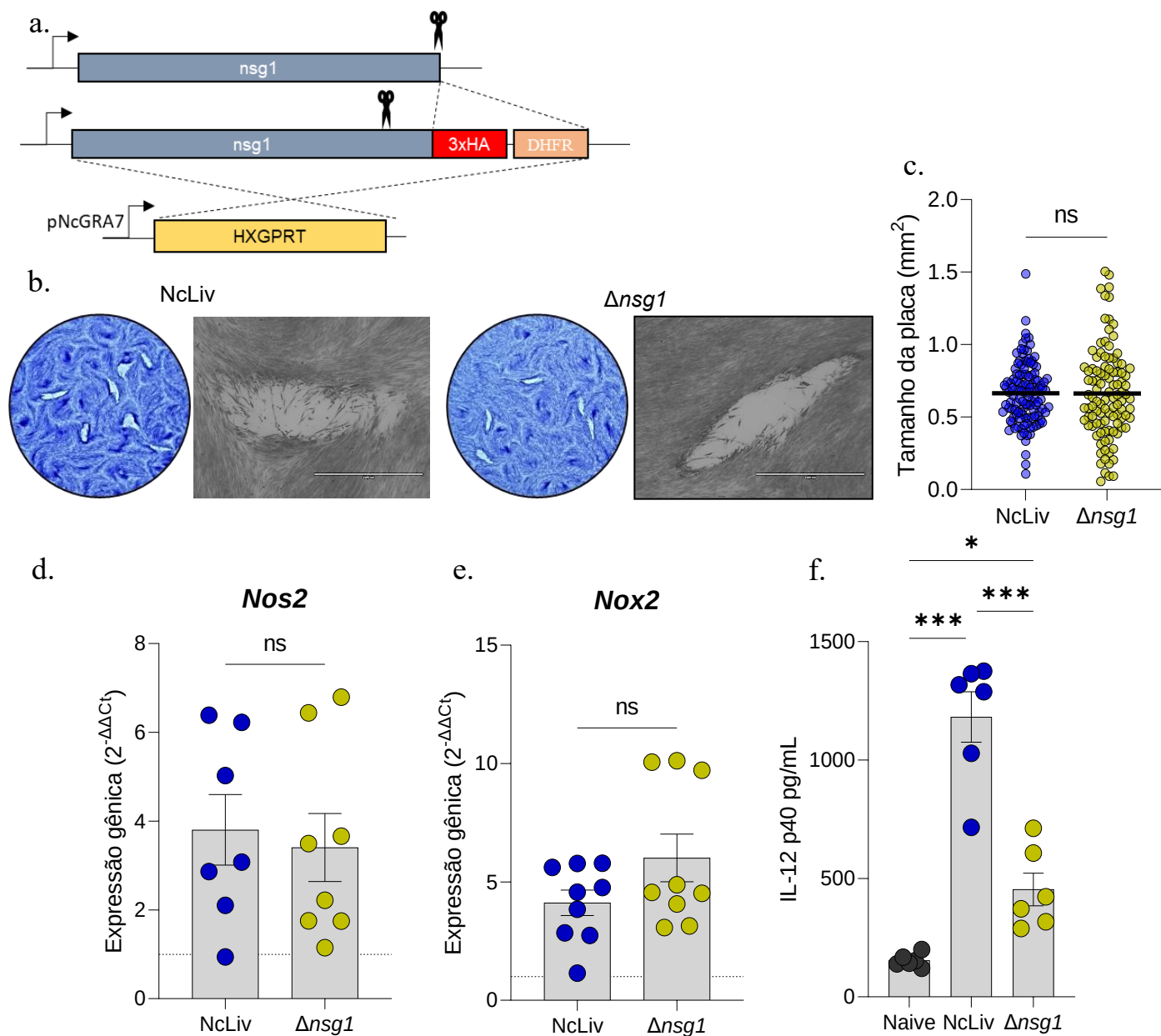


Figura 20. NSG1 não está relacionada com a virulência *in vitro* mas sim com a produção de IL12. a. Estratégia para a geração de *N. caninum* deficientes para NSG1. b. Fotografias e microfotografias dos focos de lise gerados pelos parasitas parentais e nocaute. Escala das microfotografias 1000 μm . c. Área em mm^2 dos focos de lise aos 9 dias de infecção de células HFF. d. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nos2*. e. Valores de variação relativa na expressão gênica do gene *Nox2*. f. IL12p40 liberado por BMDMs infectados com parasitas parentais e nocaute. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.20 A NSG1 não tem um papel direto na interação parasita-hospedeiro durante as fases iniciais da infecção

A fim de investigar o papel da proteína NSG1 na infecção por *N. caninum*, foram realizadas infecções hiperagudas e agudas utilizando doses não letais dos parasitas *NcΔnsg1* e *NcLiv*. Na fase hiperaguda, os resultados mostraram que não houve alterações significativas na quantidade de DNA de *N. caninum* presente no peritônio dos camundongos entre os dois grupos experimentais (Figura 21a). Além disso, a produção de IL12 e óxido nítrico também não foi afetada pela ausência da NSG1 (Figuras 21b e 21c).

Durante a fase aguda da infecção, aos 7 dias, foi observado que a carga parasitária nos camundongos infectados com *NcΔnsg1* permaneceu inalterada em comparação aos camundongos infectados com *NcLiv* (Figura 21d). Da mesma forma, não houve diferenças na produção de IL12 (Figura 21e) e NO (Figura 21f). Esses achados sugerem que a NSG1 não desempenha um papel essencial nas fases iniciais da infecção por *N. caninum*. No entanto, esses resultados indicam a necessidade de investigações adicionais para esclarecer a função da NSG1, especialmente em outros contextos da infecção ou em fases posteriores da doença.

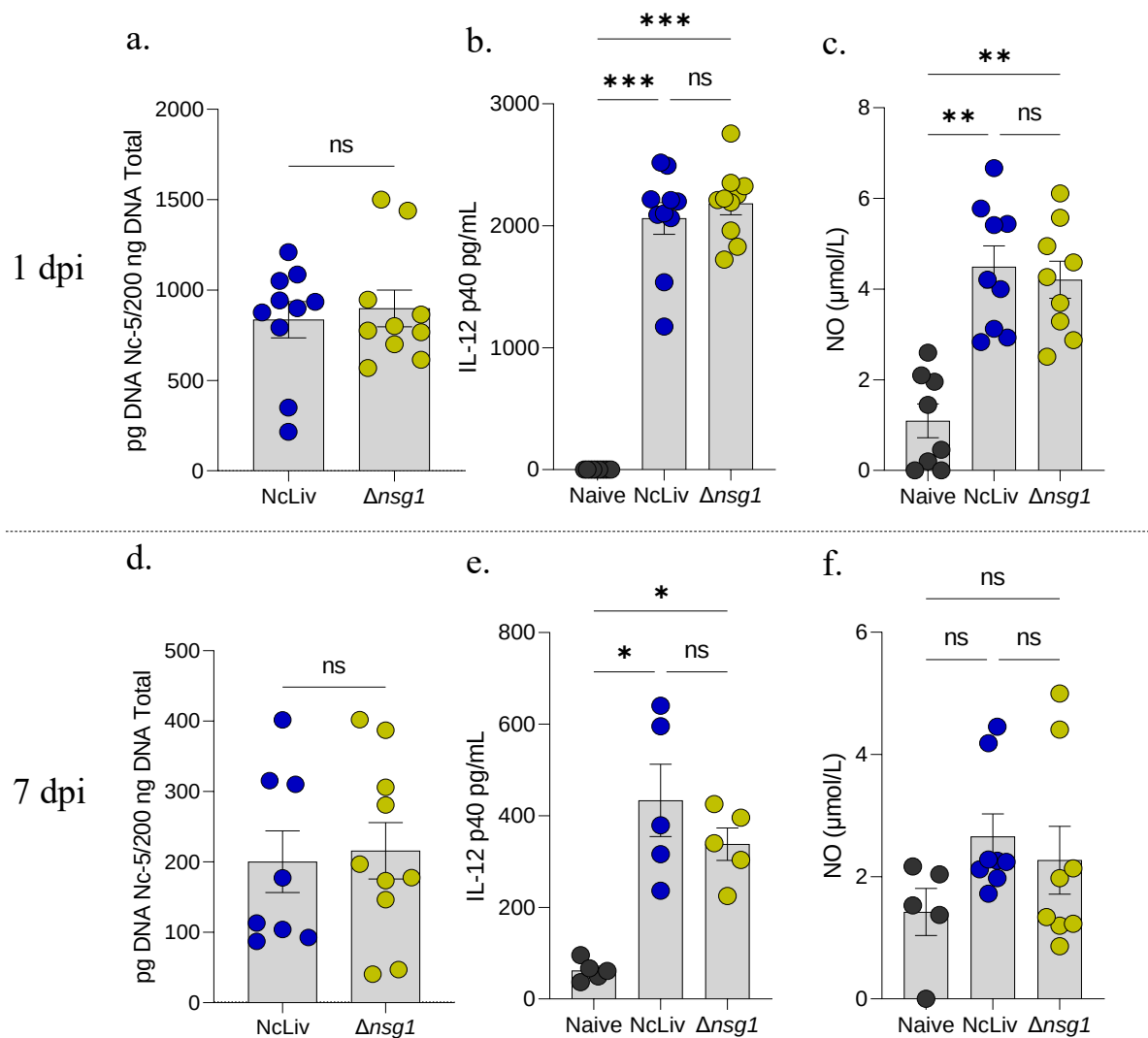


Figura 21. A NSG1 não desempenha um papel direto na fase inicial da infecção. a. Carga parasitaria determinada por qPCR de células peritoneais com 1 dpi. b. IL12p40 Liberado no peritônio com 1 dpi. c. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 1 dpi. d. Carga parasitaria determinada por qPCR de células peritoneais com 7 dpi. e. IL12p40 Liberado no peritônio com 7 dpi. f. Oxido nítrico total liberado no peritônio com 7 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

5.21 A ausência de NSG1 altera o impacto da infecção e não se relaciona com a cronicidade da doença

Visto que a NSG1 não é essencial para as fases iniciais da infecção, foi investigado se a proteína tem um papel na patogenicidade da neosporose. Foram infectados camundongos com doses não letais de *NcΔnsg1* e NcLiv e a variação do peso foi acompanhada durante 30 dias. Observou-se que na ausência da NSG1, os camundongos tiveram uma recuperação do peso significativamente maior quanto comparado com os camundongos infectados com NcLiv (Figura 22a). Sugerindo que a proteína é essencial e tem um papel na patogenicidade de *N. caninum* em modelos murinos.

Finalmente, a carga parasitária dos cérebros foi avaliada depois de 30 dias de infecção e surpreendentemente não houve alterações nas concentrações de DNA de *N. caninum* detectado nos cérebros de camundongos infectados com *NcΔnsg1* quando comparados com NcLiv (Figura 22b). Esses achados comprovam a hipótese de que a proteína pode ser fundamental para a infectividade de *N. caninum* e da mesma forma demonstram que a proteína NSG1 não é necessária para a migração do parasita ao SNC.

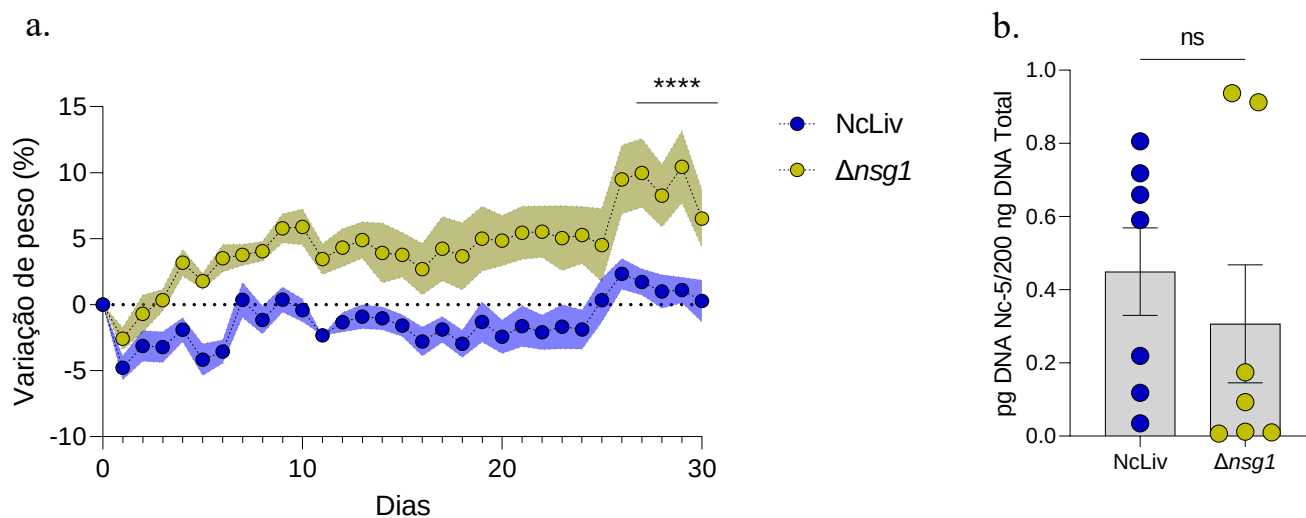


Figura 22. A proteína NSG1 regula a patogenicidade de *N. caninum*. a. Variação de peso de camundongos C57BL/6 infectados com parasitas parentais e parasitas nocaute. b. Carga parasitária aos 30 dpi. Nível de significância considerado $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O filo Apicomplexa abrange uma vasta diversidade de parasitas intracelulares obrigatórios. Esses parasitas desenvolveram uma série de mecanismos que contribuíram significativamente para o seu sucesso evolutivo. Entre esses mecanismos estão presentes as estratégias especializadas de invasão, que lhes permitem adquirir nutrientes de forma eficiente do hospedeiro, a capacidade de sobreviver dentre das células hospedeiras, e a habilidade de realizar uma replicação intracelular eficiente. Um elemento essencial nessas estratégias é a liberação precisa e coordenada de moléculas efetoras a partir de organelas secretoras, como as micronemas, Roptrias e grânulos densos. Essa liberação coordenada é essencial para a capacidade de invadir células hospedeiras e evadir a resposta imune do hospedeiro, estabelecendo uma infecção sucedida (SIBLEY, 2004).

As organelas especializadas desempenham um papel fundamental no ciclo parasitário. As micronemas, por exemplo, estão envolvidas na fixação inicial e invasão das células hospedeiras, liberando proteínas que regulam a entrada do parasita nos hospedeiros. Por outro lado, as Roptrias e os Grânulos Densos contribuem para a formação do VP, sendo a estrutura que protege ao parasita da resposta imune do hospedeiro. Além disso, as proteínas liberadas pelos Grânulos Densos também são capazes de modificar o ambiente da célula, gerando um nicho favorável para a sobrevivência e a replicação dos parasitas (BLADER et al., 2015; DUBEY et al., 2017).

Os Grânulos Densos são organelas secretoras especializadas encontradas ao longo do filo Apicomplexa, geralmente com 200 nm de diâmetro e caracterizadas por uma única membrana. A quantidade de grânulos densos varia significativamente entre espécies, sendo reduzido o número em espécies do género *Eimeria* ou sendo completamente abundantes em espécies do género *Sarcocystis* (MERCIER et al., 2005). O número de proteínas GRAs secretadas pelas organelas também é dependente da espécie, aqui, observamos a partir da pesquisa bibliográfica e as predições feitas pelo HyperLOPIT, que organismos como *T. gondii* possuem um total aproximado de 184 proteínas. O extenso número de proteínas de *T. gondii* pode ser atribuído a sua vasta gama de hospedeiros intermediários, assim como a sua importância deste parasita na saúde pública, que faz dele foco de inúmeras pesquisas sobre sua biologia parasitária (GRIFFITH; PEARCE; HEASLIP, 2022; KIM; WEISS, 2004).

Outros parasitas dentro do filo Apicomplexa possuem algumas GRAs descritas. Por exemplo, o Banco de Dados de Proteínas de Grânulos Densos (DGPD) (HU et al., 2022), que contém dados organizados sobre o número total de proteínas GRAs em espécies como *Plasmodium falciparum*, com um total de 19 GRAs, *Hammondia hammondi*, com 29 GRAs, *Cystoisospora suis* com 9 GRAs e *N. caninum* com aproximadamente 16 GRAs descritas. Foi observado que esses números podem não corresponder exatamente às GRAs ortólogas observadas, principalmente devido à dificuldade de manipular esses parasitas em laboratório e de realizar estratégias *in vitro* para estudar sua biologia celular. Fica evidente que há uma subestimação da diversidade de GRAs entre as espécies do filo Apicomplexa, o que pode sugerir hipóteses sobre a variedade de hospedeiros intermediários desses parasitas.

N. caninum e *T. gondii* são parasitas classicamente relacionados, o que gera um paradigma, pois são virtualmente idênticos em sua morfologia. Ao nível genético, esses dois parasitas apresentam um alto grau de conservação, com aproximadamente 82,4% das regiões codificantes mantidas em ambos os genomas (BERNÁ et al., 2021). Portanto, estabelecer diferenças e semelhanças entre os dois parasitas permite identificar fatores evolutivos associados à sua patogenicidade e ao espectro de hospedeiros. A partir de sequências de DNA ribossomal 18S ou da subunidade I da citocromo c oxidase, as relações filogenéticas entre esses parasitas são facilmente identificáveis, como demonstrado anteriormente (OGEDENGBE et al., 2016). Considerando a diversidade de GRAs e utilizando estratégias de concatenação das sequências dessas proteínas, neste estudo foi possível estabelecer as semelhanças evolutivas entre *T. gondii* e *N. caninum*, posicionando-os filogeneticamente dentro do filo Apicomplexa.

Partindo das análises de ortologia, foi evidenciado que *N. caninum* pode ter um número maior de GRAs (147) comparado com o relatado na literatura previamente. O número pode subestimar completamente a diversidade graças a existência de GRAs exclusivas do parasita. Por exemplo, recentes pesquisas têm descrito proteínas como a primeira GRA específica de *Neospora* (NSG1), uma proteína que não tem ortólogos na família Sarcocystidae e pode providenciar antígenos específicos para o diagnóstico e vacinas contra *N. caninum*. (MINEO et al., 2022). Outro exemplo de GRA específica de *N. caninum* é a NcGRA11b, presente

no VP e cuja função ainda não foi reportada, já que não tem relação com a virulência do parasita tanto em modelos *in vitro* como em modelos *in vivo* (YANG et al., 2021a).

A análise da sintenia dos ortólogos revela alguns rearranjos em ambos os genomas, como a translocação cromossômica da região inicial do cromossomo VIIa de *T. gondii* para o cromossomo IX de *N. caninum*, que contém proteínas como WNG1. Esses rearranjos já foram observados anteriormente (REID et al., 2012) e podem ser explicados pela divergência evolutiva desses parasitas. Além disso, um estudo recente confirmou as diferenças genômicas entre *T. gondii* e *N. caninum*, evidenciando uma grande inversão no cromossomo XII de *N. caninum* (BERNÁ et al., 2021). Nesse estudo, foi observada a presença de ortólogos não sintênicos das proteínas GRA19, GRA20 e ROP3 nesse cromossomo, revelando que essa inversão envolve um processo de amplificação de alguns genes que foram realocados no genoma de *N. caninum*. Adicionalmente, a família de genes GRA é altamente diversa e claramente apresenta evidências de seleção positiva, duplicação e perda de genes em ambos os parasitas. Com base nos ortólogos sintênicos analisados, observamos uma diversidade de perdas genéticas, com aproximadamente 21% dos genes de *T. gondii* não apresentando ortólogos em *N. caninum*.

Os alinhamentos de sequências proteicas são comumente utilizados para identificar as semelhanças e diferenças entre proteínas, sendo vitais para entender a função das proteínas, sua evolução e diversas relações através de mutações. A relação evolutiva entre sequências é relativamente alta quando a identidade das sequências por pares é superior ao 40%, mas entra em uma zona de incerteza quando a identidade das sequências está 20% e 35 % (JIA; KILINC; JERNIGAN, 2023). Com base nos alinhamentos proteína-proteína realizados entre os *N. caninum* e o *T. gondii*, observamos que um alto nível de relação, com um 60,9% das proteínas analisadas apresentando uma identidade superior ao 40%.

Ensaio de afinidade por biotinylação são ferramentas robustas que permitem a identificação de famílias de proteínas ou de interações proteicas com uma proteína de interesse. Utilizando as GRAs como isca, novas proteínas componentes do VP em *N. caninum* foram previamente descritas. Por exemplo, utilizando a proteína GRA17, uma proteína componente da membrana do VP, foram identificadas proteínas previamente conhecidas e 11 novas GRAs para *N. caninum*, destacando-se a caracterização da família de proteínas GRA11 (composta

por 5 proteínas), GRA3, GRA25, GRA27, GRA38, GRA45 e GRA61 (YANG et al., 2021a). O mesmo conjunto de dados gerados a partir desse BioID permitiu, posteriormente, caracterizar funcionalmente novas GRAs para *N. caninum*, como a GRA27, envolvida na virulência do parasita, e as GRA61 e GRA85, cuja função não foi esclarecida, uma vez que não apresentaram relação com a virulência do parasita (LU et al., 2024).

Os resultados obtidos por meio do ensaio de BioID permitiram confirmar a diversidade de GRAs ortólogas entre *N. caninum* e *T. gondii*. Aproximadamente 56% das proteínas listadas foram identificadas nas espectrometrias de massas, seja a partir de extratos proteicos utilizando uma proteína endógena de *N. caninum* ou através da integração de proteínas exógenas no parasita. Esses dados destacam a importância de comparar as GRAs entre essas duas espécies para entender as semelhanças e diferenças funcionais que podem influenciar a patogenicidade e a interação com o hospedeiro. Embora a identificação de proteínas exclusivas ou distintas das listadas por ortologia e localização subcelular pelo HyperLOPIT não tenha sido o foco das nossas análises, uma abordagem seletiva voltada para proteínas não categorizadas poderia ser uma estratégia crucial para a identificação de novas GRAs em estudos futuros.

As GRAs são tipicamente proteínas de baixo peso molecular, variando entre 20 a 75 kDa. Elas geralmente possuem um peptídeo sinal hidrofóbico na região N-terminal, que direciona sua secreção para VP. No VP, essas proteínas podem ser parcialmente solúveis ou associadas às membranas do vacúolo parasitóforo e às paredes do cisto, apresentando, nesse caso, domínios transmembrana que as tornam parcialmente insolúveis. A identificação dessas proteínas envolve, entre outros critérios, a determinação de sua localização subcelular no VP, frequentemente utilizando técnicas de co-localização com GRAs já bem caracterizadas (GRIFFITH; PEARCE; HEASLIP, 2022; MERCIER; CESBRON-DELAUW, 2015). Deste modo, com o objetivo de descrever algumas GRAs de *N. caninum* a partir das análises de ortologia e BioID, realizamos uma marcação endógena das proteínas selecionadas incorporando epítomos de hemaglutinina na região C-terminal da proteína, usando a metodologia de CRISPR/Cas9, seguido de IFA para determinar a localização específicas das proteínas.

Neste estudo, foi identificada e localizada a proteína ortóloga NCLIV_052280 de *N. caninum* no VP, com um tamanho estimado de 41,7 kDa, utilizando técnicas de IFA. A proteína ortóloga em *T. gondii*, GRA62 (TGME49_215360), foi previamente descrita a partir de análises de BioID, sendo localizada no VP e apresentando um peso predito de 43 kDa. Embora a função de GRA62 ainda não tenha sido completamente para *T. gondii* (CYGAN et al., 2021), nossa identificação da proteína ortóloga em *N. caninum* amplia o conhecimento sobre a conservação dessas proteínas entre as duas espécies. Da mesma forma, foi explorada a proteína GRA83, que recentemente foi caracterizada por meio de estratégias semelhantes para *T. gondii* (TGME49_297900). Esta proteína, com um peso estimado de 83 kDa, foi localizada no VP e demonstrou ser uma molécula efetora crucial para a modulação da resposta imune do hospedeiro (THIND et al., 2023). No presente estudo, foi possível identificar eficientemente a proteína ortóloga em *N. caninum*, NCLIV_006800, também no VP, com um tamanho estimado de 84,4 kDa.

Por outro lado, GRAs previamente identificadas para *N. caninum* foram alvo presente estudo (MINEO et al., 2022). As proteínas GRA48 com um peso estimado de 36,7 kDa e a Primeira GRA específica de *N. caninum* (NSG1) com 35,5 kDa foram localizadas no VP de acordo com o descrito previamente. Esses achados ressaltam tanto a conservação evolutiva e funcional das GRAs entre *T. gondii* em *N. caninum*, sublinhando a importância de estudos de genômica e proteômica comparativa para elucidar possíveis fatores moleculares que permitam compreender como os parasitas modulam a interação parasita-hospedeiro.

No presente estudo, foi caracterizada a proteína NCLIV_001830, caracterizada por ser uma "GRA Nuclear," cuja identificação foi baseada em análises de Sintenia e BioID. Através das análises de HyperLOPIT dos dados obtidos do ToxoDB, identificou-se uma proteína predita como GRA em *T. gondii* (proteína hipotética: TGME49_294970), que inicialmente não apresentava ortólogos listados em *N. caninum*. No entanto, análises de sintenia revelaram a presença de um gene na região cromossômica homóloga de *N. caninum* (FR823380:1673089..1705506), com características semelhantes à proteína de *T. gondii*, que também foi detectada nos ensaios de BioID. No presente trabalho, localizamos essa proteína no VP de *N. caninum*, sugerindo que ela é efetivamente uma GRA e possivelmente a ortóloga da TGME49_294970 de *T. gondii*. Esses resultados destacam a importância de integrar

diferentes abordagens, como BioID, análise de sintenia e dados de localização subcelular, para a identificação de novas GRAs em parasitas do filo Apicomplexa. A combinação dessas metodologias permite uma caracterização mais abrangente e precisa das proteínas envolvidas na interação parasita-hospedeiro, contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares que governam a patogenicidade desses parasitas.

As GRAs desempenham diversas funções na interação parasita-hospedeiro, como a aquisição de nutrientes para o parasita, a associação do VP com organelas do hospedeiro e o citoesqueleto, transporte e fosforilação de outras GRAs e outros grupos de proteínas, regulação do ciclo celular do hospedeiro, regulação e ativação de vias associadas a resposta imune entre outros (GRIFFITH; PEARCE; HEASLIP, 2022). Como proteínas presentes no VP e a membrana do mesmo, as GRAs estão intimamente relacionadas com o ciclo lítico do parasita, sendo essenciais para o estabelecimento do VP, a criação do microambiente ideal para a replicação, e o egresso do parasita (DUBEY et al., 2017). A deficiência de algumas GRAs para organismos como *T. gondii* encontram-se relacionadas com a diminuição da capacidade de replicação do parasita. Por exemplo, a proteína GRA39 de *Toxoplasma gondii* está relacionada à virulência do parasita. Isso é evidenciado por uma diminuição crítica na replicação *in vitro*, observada através da redução no tamanho dos focos de lise. Além disso, foi constatada uma redução nos depósitos de lipídios, sugerindo que a capacidade de replicação do parasita está associada à aquisição de nutrientes (NADIPURAM et al., 2016). Outro estudo, que identificou 15 novas GRAs de *Toxoplasma gondii* por meio da técnica BioID, avaliou o crescimento *in vitro* do parasita após a ablação gênica. Os resultados demonstraram que, das 15 GRAs, apenas duas (TGME49_266410 e TGME49_315910) apresentaram defeitos no crescimento e na formação dos focos de lise (ZHENG et al., 2022).

De maneira semelhante aos estudos anteriores com *T. gondii*, pesquisas recentes também têm caracterizado GRAs em *N. caninum*, avaliando o papel dessas proteínas na replicação parasitária *in vitro*. Por exemplo, a GRA27 HFF (LU et al., 2024), GRA2 (DONG et al., 2021a), GRA6 (ZHAO et al., 2020) e a GRA17 (YANG et al., 2018) demonstraram estar relacionadas ao crescimento intravacuolar e à replicação de *N. caninum* em experimentos *in vitro*. No presente estudo, a análise dos tamanhos das placas formadas pela lise de parasitas nocaute para as proteínas GRA448, GRA62, GRA83 e a NCLIV_001830 confirmou que

essas proteínas desempenham um papel crucial na replicação parasitária e, por conseguinte, na virulência *in vitro* de *N. caninum*. Esses achados destacam a importância dessas proteínas no ciclo de vida do parasita, reforçando sua relevância para a proliferação e agressividade do patógeno em modelos *in vitro*.

Um aspecto particularmente interessante a ser considerado é a função da GRA83. Embora tenha sido demonstrado que, em *N. caninum*, a GRA83 é essencial para a replicação, estudos em *T. gondii* indicam que a proteína ortóloga correspondente não apresenta uma relação direta com a replicação *in vitro* (THIND et al., 2023). Essa divergência funcional, apesar da conservação ortóloga entre as espécies, sugere que, embora essas proteínas compartilhem similaridade estrutural, suas funções na biologia parasitária podem variar significativamente dependendo da espécie em questão.

Em contrapartida, entre as várias proteínas GRA previamente descritas para *N. caninum*, muitas não apresentam uma função claramente associada à replicação do parasita em modelos *in vitro*. Estudos anteriores mostraram que algumas dessas proteínas, como a GRA23 e a família de GRA11 (a-e) (YANG et al., 2021a), desempenham papéis que podem não estar diretamente ligados à proliferação do parasita. Análises realizadas em células HFF revelaram que as proteínas GRA61 e GRA85 não causaram alterações significativas no tamanho das placas formadas quando comparadas aos parasitas parentais (LU et al., 2024), sugerindo que esses componentes não são essenciais para o processo de replicação *in vitro*. Além disso, a proteína NSG1, que foi previamente descrita (MINEO et al., 2022) e aprofundada neste estudo, também não mostrou estar envolvida diretamente na replicação do parasita em condições *in vitro*. A ausência de NSG1 não resultou em mudanças na formação de pontos de lise nem na taxa de replicação, ambos se mantendo comparáveis aos observados nos parasitas parentais. Essa constatação é relevante, pois destaca que, embora a NSG1 possa ter outros papéis biológicos importantes, ela não é crucial para a proliferação do parasita em ambientes *in vitro*.

Em modelos murinos, as proteínas GRAs desempenham um papel fundamental na virulência dos parasitas. No caso de *T. gondii*, a deleção das proteínas TGME49_266410 e TGME49_315910 em cepas do tipo II revelou sua importância crítica na patogenicidade do parasita. Camundongos infectados com as cepas nocaute apresentaram maior sobrevida e

uma diminuição significativa da carga parasitária cerebral aos 30 dias de infecção (ZHENG et al., 2022). De maneira semelhante, embora a GRA55 não tenha influenciado as fases agudas da infecção por *T. gondii*, ela demonstrou ser essencial para o estabelecimento de cistos cerebrais durante a fase crônica (NADIPURAM et al., 2020). As proteínas GRA39 (NADIPURAM et al., 2016) também mostrou estar diretamente ligadas à virulência do parasita, sendo fundamentais tanto para a sobrevivência dos camundongos quanto para o desenvolvimento da doença crônica.

Para *N. caninum*, tem sido investigado o papel da GRA17 e da GRA27, onde camundongos BALB/6 foram infectados com parasitas deficientes para a proteína e mostraram uma maior sobrevida que os parentais, adicionalmente, estes camundongos apresentaram uma carga parasitaria reduzida aos 30 dias de infecção nos cérebros, demonstrando o papel da GRA27 na patogenicidade de *N. caninum* (YANG et al., 2018, 2021b). Por outro lado, a GRA2 de *N. caninum* foi diretamente relacionada com a disseminação parasitária sistêmica, onde aos 7 e 15 dia de infecção, os parasitas nocaute não eram capazes de invadir órgãos como o coração, fígado e pulmões, além disso, os camundongos infectados com os parasitas nocaute, não sucumbiram ante a infecção do mesmo modo que os parasitas parentais (DONG et al., 2021a). No nosso estudo relatamos que com um dia de infecção os parasitas deficientes para as proteínas GRA48 e GRA62, tiveram uma diminuição significativa na carga parasitaria peritonia, sugerindo um papel no estabelecimento inicial da infecção. Com 7 dias de infecção, a GRA62 e a NCLIV_001830, tiveram alterações na carga parasitaria, mostrando talvez uma deficiência na disseminação do parasita, e por fim, para a fase crônica da infecção, todas as proteínas, excetuando a NSG1, mostraram uma relação direta com a diminuição do DNA parasitário no cérebro, mostrando uma relação direta com a cronicidade da infecção por *N. caninum*.

Complementarmente, foi observado que com exceção da GRA62, todas as GRAs avaliadas neste estudo, possuem um papel regulatório na patogenicidade da neosporose, sendo que na sua ausência, o percurso da doença até a cronificação foi menos crítico, quando comparado com os parasitas parentais.

Comparando com os resultados da proteína ortóloga GRA83 em *T. gondii*, observamos um papel inverso em relação à virulência. Na ausência de GRA83, *T. gondii* apresentou um

aumento significativo de parasitas no peritônio, bem como um aumento de parasitas no cérebro durante a fase crônica da infecção (THIND et al., 2023). Juntamente com os nossos resultados, essas observações confirmam que as diferenças biológicas dos parasitas são independentes da ortologia das proteínas GRAs, já que, aparentemente, a GRA83 desempenha um papel crucial em ambas as infecções, embora de maneira oposta.

Foi relatado que algumas GRAs tem a capacidade de se translocar ao núcleo da célula hospedeira. Por exemplo, a proteína reguladora de *T. gondii* GRA16 é translocada ao núcleo, sendo capaz de reclutar a proteína c-MYC, uma proteína que promove a expressão de genes relacionados a progressão, crescimento celular e apoptose (PANAS; BOOTHROYD, 2020). Outro caso de translocação ao núcleo, ocorre com a proteína TEEGR, exclusiva de *T. gondii*, capaz de migrar ao núcleo do hospedeiro, controlando a expressão de ciclinas, regulando o ciclo celular da célula hospedeira pela ativação de quinases dependente de ciclinas, como a CDK2 (PANAS et al., 2019). Na infecção por *N. caninum* foi relatado que a GRA7 regula a expressão de genes associados as proteínas ligadores de guanilato (GBP1 e GBP2) assim como as GTPases relacionadas à imunidade IRGs, induzidos por IFN- γ (IRGa6 e IRGb6) (WANG et al., 2021a). Os resultados observados no presente estudo revelaram que a nova proteína GRA, NCLIV_001830, possui a capacidade de se translocar para o núcleo das células hospedeiras. Essa característica é notável, pois indica um possível envolvimento direto dessa proteína na modulação de processos celulares nucleares. Além disso, a NCLIV_001830, em conjunto com a proteína GRA62, demonstrou a capacidade de regular a expressão de genes cruciais na resposta imune inata, como *Nos2* e *Nox2*. A regulação desses genes sugere que essas proteínas desempenham um papel central na modulação das defesas imunológicas do hospedeiro, possivelmente influenciando o curso da infecção por *N. caninum*. Esses achados indicam que as proteínas NCLIV_001830 e GRA62 podem atuar como efetores importantes no contexto da infecção, manipulando a resposta imune do hospedeiro para favorecer a sobrevivência e proliferação do parasita.

A interleucina 12 (IL-12) desempenha um papel crucial na resposta imune contra os parasitas *T. gondii* e *N. caninum*. IL12 é responsável por promover a ativação e diferenciação de células T CD4⁺ em células Th1, que secretam IFN- γ , uma citocina essencial para a ativação de macrófagos e controle intracelular desses parasitas. Além disso, IL-12 estimula as células

NK a produzirem IFN- γ , fortalecendo a resposta imune inata e adaptativa, limitando a replicação dos parasitas e contribuindo para o controle da infecção.

Sabe-se que *T. gondii* promove a produção de IL12 em macrófagos murinos, sendo as proteínas GRA15 e GRA24 importantes ativadores desta citocina (MUKHOPADHYAY; ARRANZ-SOLÍS; SAEIJ, 2020). GRA24 estimula a ativação da p38 MAPK e por consequência a liberação de IL12 independente da via TLR/MyD88 (MERCER et al., 2020). Da mesma forma, a GRA83 e a GRA15 induzem a translocação de NF- κ B ao núcleo, regulando a produção de IL12 em modelos murinos (THIND et al., 2023).

Nos nossos resultados, observamos que as proteínas GRA62, GRA83, NCLIV_001830 e NSG1 de *N. caninum* também são capazes de regular a produção de IL-12, destacando seu papel como moléculas efetoras na resposta imune inata. Esses achados sublinham a importância de estudos futuros para elucidar os mecanismos pelos quais *N. caninum* utiliza essas proteínas para modular a resposta imune do hospedeiro, proporcionando uma compreensão mais profunda da patogênese e potencial desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Esses achados reforçam a complexidade das funções das proteínas GRA, indicando que nem todas estão diretamente envolvidas na replicação parasitária, mas podem estar associadas a outros aspectos da biologia do parasita, como modulação da resposta imune do hospedeiro ou manutenção da estrutura do vacúolo parasitóforo. Portanto, é fundamental que futuras pesquisas explorem outros contextos biológicos e funcionais para compreender completamente o papel dessas proteínas na virulência e sobrevivência de *N. caninum*.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelam que a diversidade de proteínas GRAs em *Neospora caninum* tem sido subestimada. No entanto, estratégias que integram análises filogenéticas, genômicas e proteômicas são essenciais para esclarecer essas lacunas e aprofundar o entendimento dessas proteínas. A identificação de novas GRAs é fundamental para compreender a complexidade da biologia parasitária de *N. caninum*, pois oferece detalhes importantes sobre os mecanismos pelos quais o parasita manipula o hospedeiro, assegurando seu êxito evolutivo.

A identificação e caracterização funcional das proteínas GRA48, GRA68, GRA83, NSG1, e da proteína nuclear NCLIV_001830 demonstraram o papel crucial dessas GRAs na replicação de *N. caninum*, na virulência do parasita, e nos mecanismos efetores que induzem a resposta imune dos hospedeiros. A caracterização dessas proteínas oferece informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas contra a neosporose.

BIBLIOGRAFIA

ADOMAKO-ANKOMAH, Y. et al. Differential locus expansion distinguishes Toxoplasmatinae species and closely related strains of *Toxoplasma gondii*. **mBio**, v. 5, n. 1, p. e01003- 01013, 4 fev. 2014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01003-13>

ALAEDDINE, F. et al. Molecular cloning and characterization of NcROP2Fam-1, a member of the ROP2 family of rhoptry proteins in *Neospora caninum* that is targeted by antibodies neutralizing host cell invasion in vitro. **Parasitology**, v. 140, n. 8, p. 1033-1050, jul. 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000383>

BARROS, P. DA S. C. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase is required for parasite restriction and inflammatory modulation during *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 276, p. 108990, dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108990>

BARYLYUK, K. et al. A Comprehensive Subcellular Atlas of the *Toxoplasma* Proteome via hyperLOPIT Provides Spatial Context for Protein Functions. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 5, p. 752- 766.e9, 11 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.011>

BERNÁ, L. et al. Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. **Genome Research**, v. 31, n. 5, p. 823-833, 5 jan. 2021. <https://doi.org/10.1101/gr.262832.120>

BLADER, I. et al. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 463-485, 15 out. 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, dez. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)

CORREIA, A. et al. Predominant role of interferon- γ in the host protective effect of CD8⁺ T cells against *Neospora caninum* infection. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14913, 9 out. 2015. <https://doi.org/10.1038/srep14913>

CYGAN, A. M. et al. Proximity-Labeling Reveals Novel Host and Parasite Proteins at the Toxoplasma Parasitaphorous Vacuole Membrane. **mBio**, v. 12, n. 6, p. e0026021, 21 dez. 2021. <https://doi.org/10.1128/mBio.00260-21>

DA SILVA, M. V. et al. Dectin-1 Compromises Innate Responses and Host Resistance against Neospora caninum Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 245, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00245>

DAVOLI-FERREIRA, M. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during Neospora caninum infection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29289, 5 jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep29289>

DÉBARE, H. et al. In vitro cellular responses to Neospora caninum glycosylphosphatidylinositols depend on the host origin of antigen presenting cells. **Cytokine**, v. 119, p. 119-128, jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.014>

DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. Toxoplasma Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 933-939, 22 mar. 1996. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81071-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81071-5)

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathologic findings of Neospora caninum infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>

DONG, J. et al. Disruption of Dense Granular Protein 2 (GRA2) Decreases the Virulence of Neospora caninum. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 634612, 2021a. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.634612>

DONG, J. et al. GRA12, a novel dense granule protein from Neospora caninum. **Parasitology International**, v. 81, p. 102268, 1 abr. 2021b. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102268>

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1 maio 1988.

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. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis in Animals. [s.l.] **CRC Press**, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315152561>

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, Special Issue: Towards good management practises in parasite control. v. 180, n. 1, p. 90-108, 4 ago. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 113, 19 ago. 2004. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>

FEREIG, R. M. et al. *Neospora* GRA6 possesses immune-stimulating activity and confers efficient protection against *Neospora caninum* infection in mice. **Veterinary Parasitology**, v. 267, p. 61-68, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.02.003>

FEREIG, R. M.; NISHIKAWA, Y. From Signaling Pathways to Distinct Immune Responses: Key Factors for Establishing or Combating *Neospora caninum* Infection in Different Susceptible Hosts. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 384, maio 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050384>

FERREIRA FRANÇA, F. B. et al. TNF-TNFR1 Signaling Enhances the Protection Against *Neospora caninum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 789398, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.789398>

FRIEDRICH, N. et al. Members of a Novel Protein Family Containing Microneme Adhesive Repeat Domains Act as Sialic Acid-binding Lectins during Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 2064-2076, 15 jan. 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060988>

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 1 jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>

GRIFFITH, M. B.; PEARCE, C. S.; HEASLIP, A. T. Dense granule biogenesis, secretion, and function in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 69, n. 6, p. e12904, 2022. <https://doi.org/10.1111/jeu.12904>

GUIONAUD, C. et al. Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. **Parasitology**, v. 137, n. 11, p. 1605-1619, set. 2010. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000442>

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. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00193-8)

HEMPHILL, A. et al. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1 jan. 2013. <https://doi.org/10.2741/E593>

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 261-278, set. 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000485>

HU, H. et al. DGPD: a knowledge database of dense granule proteins of the Apicomplexa. **Database**, v. 2022, p. baac085, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.1093/database/baac085>

JIA, K.; KILINC, M.; JERNIGAN, R. L. New alignment method for remote protein sequences by the direct use of pairwise sequence correlations and substitutions. **Frontiers in Bioinformatics**, v. 3, 12 out. 2023. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1227193>

JIMÉNEZ-PELAYO, L. et al. Immune response profile of caruncular and trophoblast cell lines infected by high- (Nc-Spain7) and low-virulence (Nc-Spain1H) isolates of *Neospora caninum*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 218, 8 maio 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3466-z>

JIMENEZ-RUIZ, E. et al. Vacuolar protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 209, n. 1-2, p. 18-25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.007>

- JIN, X. et al. Activation of ERK Signaling via TLR11 Induces IL-12p40 Production in Peritoneal Macrophages Challenged by *Neospora caninum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1393, 26 jul. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01393>
- JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, ago. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- KELLER, N. et al. Identification of a *Neospora caninum* Microneme Protein (NcMIC1) Which Interacts with Sulfated Host Cell Surface Glycosaminoglycans. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 3187-3198, jun. 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3187-3198.2002>
- KELLER, N. et al. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8, p. 4791-4800, ago. 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4791-4800.2004>
- KHAN, A. et al. Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. **Engineering**, v. 6, n. 1, p. 10-19, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.02.010>
- KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, The Seventh International Congress on Toxoplasmosis. v. 34, n. 3, p. 423-432, 9 mar. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>
- KOZLOV, A. M. et al. RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 35, n. 21, p. 4453-4455, 1 nov. 2019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- KRZYWINSKI, M. et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1639-1645, set. 2009. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

LALLY, N. et al. A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum* 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 239-243, 1 ago. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00070-4)

LEINEWEBER, M. et al. First Characterization of the *Neospora caninum* Dense Granule Protein GRA9. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 6746437, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6746437>

LI, S. et al. Extracellular Vesicles Secreted by *Neospora caninum* Are Recognized by Toll-Like Receptor 2 and Modulate Host Cell Innate Immunity Through the MAPK Signaling Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 24 jul. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01633>

LI, S. et al. 14-3-3 Protein of *Neospora caninum* Modulates Host Cell Innate Immunity Through the Activation of MAPK and NF- κ B Pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 37, 25 jan. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00037>

LI, W. et al. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2893-2902, 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4490-3>

LI, Z. et al. FATCAT 2.0: towards a better understanding of the structural diversity of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W60-W64, 2 jul. 2020. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa443>

LIDDELL, S. et al. Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum* 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 153-158, 15 maio 1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00031-0)

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Ruminant Parasitology*. v. 36, n. 1, p. 205-222, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 14 jul. 2017.<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.), v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOVETT, J. L.; HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 107, n. 1, p. 33-43, 15 mar. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00228-5)

LU, Z. et al. Functional characterization of three novel dense granule proteins in *Neospora caninum* using the CRISPR-Cas9 system. **Acta Tropica**, v. 256, p. 107250, 1 ago. 2024.<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107250>

MA, L. et al. Rhoptry protein 5 (ROP5) Is a Key Virulence Factor in *Neospora caninum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 370, 2017a. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00370>

MA, L. et al. *Neospora caninum* ROP16 play an important role in the pathogenicity by phosphorylating host cell STAT3. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 135-147, 30 ago. 2017b.<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.020>

MARIM, F. M. et al. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15263, 17 dez. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015263>

MARIN, M. S. et al. Toll-like receptors 3, 7 and 8 are upregulated in the placental caruncle and fetal spleen of *Neospora caninum* experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 236, p. 58-61, 15 mar. 2017a. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.002>

MARIN, M. S. et al. Immunization with inactivated antigens of *Neospora caninum* induces toll-like receptors 3, 7, 8 and 9 in maternal-fetal interface of infected pregnant heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 12-17, 30 ago. 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.005>

MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V. et al. Identification of Neospora caninum proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 9, p. 1740-1750, 2010. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900664>

MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V. et al. Identification of novel rhoptry proteins in Neospora caninum by LC/MS-MS analysis of subcellular fractions. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 5, p. 629-642, 1 maio 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.004>

MERCER, H. L. et al. Toxoplasma gondii dense granule protein GRA24 drives MyD88-independent p38 MAPK activation, IL-12 production and induction of protective immunity. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 5, p. e1008572, maio 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008572>

MERCIER, C. et al. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitaphorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 829-849, jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>

MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M.-F. Toxoplasma secretory granules: one population or more? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 60-71, fev. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002>

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). Anais... Em: 2010 GATEWAY **COMPUTING ENVIRONMENTS WORKSHOP** (GCE). nov. 2010. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/5676129>>. Acesso em: 6 ago. 2024 <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

MINEO, T. W. P. et al. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to Neospora caninum infection. **Veterinary Research**, v. 40, n. 4, p. 32, 2009. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009015>

MINEO, T. W. P. et al. Neospora caninum excreted/secreted antigens trigger CC-chemokine receptor 5-dependent cell migration. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 797-805, 1 jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.12.003>

MINEO, T. W. P. et al. 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. <https://doi.org/10.1128/msphere.00896-21>

MIRANDA, V. DOS S. et al. Toll-Like Receptor 3-TRIF Pathway Activation by *Neospora caninum* RNA Enhances Infection Control in Mice. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 4, p. e00739-18, 25 mar. 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00739-18>

MOTA, C. M. et al. *Neospora caninum* Activates p38 MAPK as an Evasion Mechanism against Innate Immunity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01456>

MOTA, C. 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**, v. 10, 25 maio 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00243>

MUKHOPADHYAY, D.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J. P. J. Toxoplasma GRA15 and GRA24 are important activators of the host innate immune response in the absence of TLR11. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 5, p. e1008586, maio 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008586>

NADIPURAM, S. M. et al. In Vivo biotinylation of the toxoplasma parasitaphorous vacuole reveals novel dense granule proteins important for parasite growth and pathogenesis. **mBio**, v. 7, n. 4, jul. 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00808-16>

NADIPURAM, S. M. et al. Proximity biotinylation reveals novel secreted dense granule proteins of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. **PloS One**, v. 15, n. 5, p. e0232552, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232552>

NAGULESWARAN, A. et al. *Neospora caninum* Microneme Protein NcMIC3: Secretion, Subcellular Localization, and Functional Involvement in Host Cell Interaction. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6483-6494, out. 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6483-6494.2001>

NISHIKAWA, Y. et al. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation

of peritoneal macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 811-816, jul. 2001. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.811-817.2001>

NISHIKAWA, Y. et al. Neospora caninum Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 18, p. e01350-18, 31 ago. 2018. <https://doi.org/10.1128/AEM.01350-18>

OGEDENGBE, M. E. et al. Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidia (sarcocystidae; apicomplexa) based on nuclear 18s RDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus Hammondia. **Parasitology Open**, v. 2, p. e2, jan. 2016. <https://doi.org/10.1017/pao.2015.7>

PANAS, M. W. et al. Toxoplasma Controls Host Cyclin E Expression through the Use of a Novel MYR1-Dependent Effector Protein, HCE1. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 10.1128/mbio.00674-19, 30 abr. 2019. <https://doi.org/10.1128/mBio.00674-19>

PANAS, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Toxoplasma Uses GRA16 To Upregulate Host c-Myc. **mSphere**, v. 5, n. 3, p. 10.1128/msphere.00402-20, 24 jun. 2020. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00402-20>

PASTOR-FERNÁNDEZ, I. et al. Characterization of the Neospora caninum NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle. **Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 97-113, jan. 2016a. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001511>

PASTOR-FERNÁNDEZ, I. et al. The tandemly repeated NTPase (NTPDase) from Neospora caninum is a canonical dense granule protein whose RNA expression, protein secretion and phosphorylation coincides with the tachyzoite egress. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 352, 21 jun. 2016b. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1620-4>

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. **Contributions to Microbiology**, v. 15, p. 164-187, 2008. <https://doi.org/10.1159/000136357>

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 308-312, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00236.x>

REID, A. J. et al. Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia Differing in Host Range and Transmission Strategy. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002567, 22 mar. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002567>

ROCCHI, M. S. et al. Selection of *Neospora caninum* antigens stimulating bovine CD4⁺ve T cell responses through immuno-potency screening and proteomic approaches. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 91, 3 ago. 2011. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-91>

SCHARES, G. et al. Structural analysis of free and protein-bound glycosyl-phosphatidylinositols of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 155-161, 5 jan. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00168-1)

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, jul. 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science** (New York, N.Y.), v. 304, n. 5668, p. 248-253, 9 abr. 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>

SOHN, C. S. et al. Identification of Novel Proteins in *Neospora caninum* Using an Organelle Purification and Monoclonal Antibody Approach. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18383, 4 abr. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018383>

SOKOL-BORRELLI, S. L.; COOMBS, R. S.; BOYLE, J. P. A Comparison of Stage Conversion in the Coccidian Apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, and *Neospora caninum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 3 dez. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608283>

STEENWYK, J. L. et al. ClipKIT: A multiple sequence alignment trimming software for accurate phylogenomic inference. **PLOS Biology**, v. 18, n. 12, p. e3001007, 2 dez. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001007>

THIND, A. C. et al. The *Toxoplasma gondii* effector GRA83 modulates the host's innate immune response to regulate parasite infection. **mSphere**, v. 8, n. 5, p. e00263-23, 28 set. 2023. <https://doi.org/10.1128/msphere.00263-23>

WALSH, C. P. et al. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 253-258, 1 mar. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00169-7)

WANG, F. et al. Function of *Neospora caninum* dense granule protein 7 in innate immunity in mice. **Parasitology Research**, v. 120, n. 1, p. 197-207, jan. 2021a. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06961-4>

WANG, J. et al. A new microneme protein of *Neospora caninum*, NcMIC8 is involved in host cell invasion. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 21-27, abr. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.004>

WANG, X. et al. Microneme Protein 6 Is Involved in Invasion and Egress by *Neospora caninum*. **Pathogens** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 2, p. 201, 13 fev. 2021b. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020201>

YANG, C. et al. NcGRA17 is an important regulator of parasitaphorous vacuole morphology and pathogenicity of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 264, p. 26-34, 15 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.018>

YANG, C. et al. Biotinylation of the *Neospora caninum* parasitaphorous vacuole reveals novel dense granule proteins. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 521, 9 out. 2021a. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05023-7>

YANG, C. et al. Biotinylation of the *Neospora caninum* parasitaphorous vacuole reveals novel dense granule proteins. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 521, 9 out. 2021b. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05023-7>

- ZHANG, X. et al. Host defense against *Neospora caninum* infection via IL-12p40 production through TLR2/TLR3-AKT-ERK signaling pathway in C57BL/6 mice. **Molecular Immunology**, v. 139, p. 140-152, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.08.019>
- ZHAO, P. et al. Effects of Dense Granular Protein 6 (GRA6) Disruption on *Neospora caninum* Virulence. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 562730, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.562730>
- ZHAO, P. et al. A Newly Discovered Dense Granule Protein 3 in *Neospora caninum*. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 4, p. 1581-1585, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00402-7>
- ZHENG, X.-N. et al. Functional Characterization of 15 Novel Dense Granule Proteins in *Toxoplasma gondii* Using the CRISPR-Cas9 System. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 1, p. e03078-22, 14 dez. 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03078-22>

Anexo I. Comitê de  tica



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de  tica 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 n  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 n  11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n  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 26 de Setembro de 2023.

(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 n  11.794, of October 8th, 2008, of Decree n  6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of september 26th, 2023).

Vigência do Projeto	In�cio: 01/12/2016 Término: 31/12/2024
Espécie / Linhagem / Grupos Taxon�micos	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

Alter  o Realizada: Alteração na data término de 31/12/2023 para 31/12/2024.

Uberlândia, 26 de setembro de 2023.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de  tica na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R. N  4028/2023

Anexo II. Lista de GRAs

Gene ID	Product Description	Gene Symbol	HyperLOPIT-MAP	Nc Ortolog	PMID		
TGME49_253330	Rhoptry kinase family protein,	BPK1	dense granules	NCLIV_007770	23291621		
TGME49_261650	hypothetical protein	CST4	#N/D	NCLIV_025840	31040239	32019789	
TGME49_258870	hypothetical protein	CST7	dense granules	NCLIV_027600	32019789		
TGME49_310790	hypothetical protein	CST9	ER 2	NCLIV_054840	32019789		
TGME49_221210	cyclophilin	Cyclophilin	ER 2	NCLIV_004790	32374791		
TGME49_259830	diacylglycerol kinase catalytic domain-containing protein	DGK2	dense granules	NCLIV_027060	26962945	30742070	
TGME49_233010	cell-cycle-assocaited protein kinase ERK7, putative	ERK7	dense granules	NCLIV_032840	32073987	34607461	
TGME49_259172	mRNA export factor GLE1-like, putative	GLE1-Like	nucleus - chromatin	#N/D			
TGME49_270250	dense granule protein GRA1	GRA01	dense granules	NCLIV_036400	7615684	21390541	19885333
TGME49_227620	dense granule protein GRA2	GRA02	dense granules	NCLIV_045650	7615684	28570716	9712765
TGME49_227280	dense granule protein GRA3	GRA03	dense granules	NCLIV_045870	16149193	19885333	
TGME49_310780	dense granule protein GRA4	GRA04	dense granules	NCLIV_054830	19885333	10498186	10251823
TGME49_286450	dense granule protein GRA5	GRA05	dense granules	NCLIV_014150	11522359	10198072	
TGME49_275440	dense granule protein GRA6	GRA06	dense granules	NCLIV_052880	10498186		
TGME49_203310	dense granule protein GRA7	GRA07	dense granules	NCLIV_021640	18809661		
TGME49_254720	dense granule protein GRA8	GRA08	dense granules	NCLIV_008990	29869623	30949853	
TGME49_251540	dense granule protein GRA9	GRA09	dense granules	NCLIV_066630	33182702	15491588	
TGME49_268900	dense granule protein GRA10	GRA10	#N/D	NCLIV_037450	24832208		
TGME49_212410	dense granule protein GRA11A	GRA11A	dense granules	#N/D	28526607	25757795	
TGME49_237800	dense granule protein GRA11	GRA11B	#N/D	#N/D	28526607	25757795	
TGME49_288650	dense granule protein GRA12	GRA12	dense granules	NCLIV_041120	18840447	31908049	31266861
TGME49_220890	dense granule protein GRA12A	GRA12A	PM - integral	NCLIV_004670	33883265		
TGME49_275860	dense granule protein GRA12B	GRA12B	dense granules	NCLIV_007080	33883265		
TGME49_275850	dense granule protein GRA12C	GRA12C	#N/D	#N/D	33883265		
TGME49_308970	dense granule protein GRA12D	GRA12D	dense granules	NCLIV_053420	33883265		
TGME49_237880	dense granule protein GRA13	GRA13	dense granules	#N/D	27486190		
TGME49_239740	dense granule protein GRA14	GRA14	dense granules	NCLIV_016360	18765740	34898650	
TGME49_275470	dense granule protein GRA15	GRA15	dense granules	#N/D	21199955	32453782	31416833
TGME49_208830	dense granule protein GRA16	GRA16	dense granules	NCLIV_003340	23601110		
TGME49_222170	dense-granule antigen DG32	GRA17	dense granules	NCLIV_005560	25974303		
TGME49_288840	hypothetical protein	GRA18	dense granules	NCLIV_041250	30320549		

TGME49_245432	dense granule protein GRA19	GRA19	dense granules	NCLIV_062690	23356236	26473595
TGME49_200010	dense granule protein GRA20	GRA20	dense granules	NCLIV_062680		
TGME49_241610	dense granule protein GRA21	GRA21	#N/D	#N/D	23356236	30211128
TGME49_215220	hypothetical protein	GRA22	dense granules	NCLIV_052190	32374791	23623919
TGME49_297880	dense granule protein DG32	GRA23	dense granules	NCLIV_006780	25974303	
TGME49_230180	dense granule protein GRA24	GRA24	dense granules	#N/D	32453782	
TGME49_290700	hypothetical protein	GRA25	dense granules	NCLIV_042680		
TGME49_231960	dense granule protein GRA28	GRA28	dense granules	#N/D		
TGME49_269690	dense granule protein GRA29	GRA29	dense granules	NCLIV_036830	32907954	32374791
TGME49_232000	dense granule protein GRA30	GRA30	dense granules	NCLIV_032000	30211128	32374791
TGME49_220240	dense granule protein GRA31	GRA31	dense granules	NCLIV_012370	30211128	
TGME49_212300	dense granule protein GRA32	GRA32	dense granules	NCLIV_049090		32374791
TGME49_247440	dense granule protein GRA33	GRA33	dense granules	#N/D	36210525	
TGME49_203290	dense granule protein GRA34	GRA34	dense granules	NCLIV_021660		32374791
TGME49_226380	hypothetical protein	GRA35	dense granules	NCLIV_046580	38376248	
TGME49_213067	hypothetical protein	GRA36	dense granules	NCLIV_013180		
TGME49_236890	dense granule protein GRA37	GRA37	dense granules	NCLIV_050790		32374791
TGME49_312420	dense granule protein GRA38	GRA38	dense granules	NCLIV_055980		32374791
TGME49_289380	hypothetical protein	GRA39	dense granules	NCLIV_041740	32907954	27486190
TGME49_219810	dense granule protein GRA40	GRA40	dense granules	NCLIV_060810		32374791
TGME49_500312	dense granule protein GRA41	GRA41	#N/D	FR823391:5,147,783..5,148,286	28436089	
TGME49_236870	dense granule protein GRA42	GRA42	#N/D	NCLIV_050780	30622189	
TGME49_237015	hypothetical protein	GRA43	dense granules	#N/D	30622189	
TGME49_228170	inner membrane complex protein IMC2A	GRA44	dense granules	NCLIV_045260		
TGME49_316250	hypothetical protein	GRA45	dense granules	NCLIV_058760		
TGME49_208370	dense granule protein GRA46	GRA46	IMC	NCLIV_003050		
TGME49_254000	dense granule protein GRA47	GRA47	dense granules	NCLIV_008310	38380952	32374791
TGME49_267740	dense granule protein GRA48	GRA48	dense granules	NCLIV_069360	32374791	36515555
TGME49_244530	dense granule protein GRA49	GRA49	dense granules	NCLIV_019080	32374791	36515555
TGME49_203600	hypothetical protein	GRA50 (CST2)	dense granules	NCLIV_021410		
TGME49_230705	hypothetical protein	GRA51 (CST3)	dense granules	#N/D		
TGME49_319340	hypothetical protein	GRA52 (CST5)	dense granules	NCLIV_010740		
TGME49_260520	hypothetical protein	GRA53 (CST6)	dense granules	NCLIV_026520		
TGME49_204340	hypothetical protein	GRA54 (CST8)	dense granules	#N/D		

TGME49_309760	hypothetical protein	GRA55	dense granules	NCLIV_053890				
TGME49_309930	melibiase subfamily protein	GRA56	endomembrane vesicles	NCLIV_054050				
TGME49_217680	dense granule protein GRA57	GRA57	dense granules	NCLIV_062460			32374791	
TGME49_268790	dense granule protein GRA58	GRA58	dense granules	NCLIV_037560	32374791		36916910	
TGME49_313440	dense granule protein GRA59	GRA59	dense granules	NCLIV_056730	32374791		37827122	
TGME49_204270	dense granule protein GRA60	GRA60	#N/D	NCLIV_020960				
TGME49_269950	dense granule protein GRA61	GRA61	dense granules	NCLIV_036640				
TGME49_215360	dense granule protein GRA62	GRA62	dense granules	NCLIV_052280				
TGME49_217530	dense granule protein GRA63	GRA63	dense granules	NCLIV_062300				
TGME49_202620	dense granule protein GRA64	GRA64	dense granules	NCLIV_022320				
TGME49_241240	dense granule protein GRA65	GRA65	dense granules	NCLIV_017220	36210525			
TGME49_320490	dense granule protein GRA66	GRA66	dense granules	NCLIV_009780				
TGME49_279100	mitochondrial association factor 1a	GRA67	dense granules	#N/D	36210525			
TGME49_249990	dense granule protein GRA70	GRA70	dense granules	NCLIV_066100	32374791	37498952	36916910	
TGME49_309600	dense granule protein GRA71	GRA71	dense granules	NCLIV_069130	36916910			
TGME49_272460	dense granule protein GRA72	GRA72	dense granules	NCLIV_034850	38380952	37498952		
TGME49_299780	dense granule protein GRA76	GRA76	dense granules	NCLIV_060500	37832712			
TGME49_273980	dense granule protein GRA80	GRA80	dense granules	NCLIV_033760	38093015			
TGME49_243940	dense granule protein GRA81	GRA81	#N/D	NCLIV_018540	38093015			
TGME49_277230	dense granule protein GRA82	GRA82	dense granules	#N/D	38093015			
TGME49_297900	dense granule protein GRA83	GRA83	dense granules	NCLIV_006800	37768053			
TGME49_243200	hypothetical protein	IMC29	dense granules	NCLIV_017990				
TGME49_272420	phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase,	LCAT	endomembrane vesicles	NCLIV_034880				
TGME49_220950	hypothetical protein	MAF1	dense granules	#N/D				
TGME49_270240	MAG1	MAG1	dense granules	NCLIV_036410				
TGME49_209755	cyst matrix protein MAG2	MAG2	#N/D	NCLIV_004020	32075884			
TGME49_208740	microneme adhesive repeat protein MCP3	MCP3	dense granules	NCLIV_003260	31040239			
TGME49_208730	microneme adhesive repeat protein MCP4	MCP4	Golgi	NCLIV_003250	31040239			
TGME49_201180	megakaryocyte stimulating factor MSF	MSF	dense granules	NCLIV_023220	24885521			
TGME49_254470	Myc-regulation protein MYR1	MYR1	dense granules	NCLIV_008760				
TGME49_270700	membrane protein MYR2	MYR2	#N/D	NCLIV_036070				
TGME49_237230	membrane protein MYR3	MYR3	dense granules	#N/D				
TGME49_211460	membrane protein MYR4	MYR4	dense granules	NCLIV_011500				
N/A	hypothetical protein	NcGRA11b	#N/D	NCLIV_012020				

TGME49_292350	hypothetical protein	NcGRA27	#N/D	NCLIV_043760	
TGME49_200360	hypothetical protein	NcGRA47?	dense granules	NCLIV_038210	
TGME49_314260	hypothetical protein	NcGRA61	rhoptries 1	NCLIV_057330	
N/A	GH18885, related	NSG1	#N/D	NCLIV_066730	
TGME49_277240	NTPase I	NTPase I	dense granules	#N/D	
TGME49_277270	NTPase II	NTPase II	dense granules	#N/D	
TGME49_248500	hypothetical protein	NUP37	dense granules	NCLIV_064460	
TGME49_306560	hypothetical protein	NUP67	dense granules	NCLIV_044750	
TGME49_232600	phospholipase, patatin family protein	PLP1	ER 2	NCLIV_032560	
TGME49_304955	serine/threonine specific protein phosphatase	PPM11C	#N/D	NCLIV_001230	
TGME49_237500	protein phosphatase 2C domain-containing protein	PPM3A	dense granules	NCLIV_051240	
TGME49_202610	protein phosphatase 2C domain-containing protein	PPM3D	dense granules	NCLIV_022340	
TGME49_270320	protein phosphatase 2C domain-containing protein	PPMC3	rhoptries 1	NCLIV_036340	
TGME49_269920	phosphatidylserine decarboxylase	PSD1	dense granules	NCLIV_036670	
TGME49_202780	rhoptry kinase family protein ROP25	ROP25	dense granules	NCLIV_022130	
TGME49_308093	rhoptry kinase family protein (incomplete catalytic triad)	ROP32	dense granules	#N/D	
TGME49_270920	rhoptry kinase family protein ROP32	ROP32	dense granules	NCLIV_035860	
TGME49_201130	rhoptry kinase family protein ROP33	ROP33	dense granules	NCLIV_023260	
TGME49_240090	rhoptry kinase family protein ROP34, putative	ROP34/WNG2	dense granules	NCLIV_000650	
TGME49_304740	rhoptry kinase family protein ROP35	ROP35/WNG1	dense granules	NCLIV_044410	
TGME49_262050	rhoptry kinase family protein ROP39	ROP39	rhoptries 2	#N/D	
TGME49_281675	protein kinase, putative	ROP45	dense granules	NCLIV_023580	
TGME49_234950	protein kinase (incomplete catalytic triad)	ROP48	dense granules	#N/D	
TGME49_289540	hypothetical protein	SFP1	dense granules	NCLIV_041790	
TGME49_222370	SAG-related sequence SRS13	SRS13	PM - peripheral 1	NCLIV_005760	
TGME49_234370	SAG-related sequence SRS42	SRS42	dense granules	NCLIV_049510	
TGME49_264660	SAG-related sequence SRS44	SRS44/CST1	dense granules	NCLIV_040495	
TGME49_239010	hypothetical protein	TEEGR (HCE)	dense granules	#N/D	
TGME49_289620	cathepsin CPC1	TgCPC1	micronemes	NCLIV_041870	17164247
TGME49_276130	cathepsin CPC2	TgCPC2	rhoptries 2	NCLIV_007010	17164247
TGME49_240060	hypothetical protein	TgIST1	dense granules	#N/D	
TGME49_201860	hypothetical protein	TGME49_201860	dense granules	NCLIV_022900	
TGME49_204320	hypothetical protein	TGME49_204320	dense granules	NCLIV_020910	
TGME49_208070	inositol polyphosphate kinase	TGME49_208070	dense granules	NCLIV_002970	

TGME49_208430	serine proteinase inhibitor PI-2, putative	TGME49_208430	dense granules	NCLIV_003100	
TGME49_213388	hypothetical protein	TGME49_213388	nucleus - chromatin	NCLIV_013350	
TGME49_214410	hypothetical protein	TGME49_214410	dense granules	#N/D	
TGME49_215160	hypothetical protein	TGME49_215160	dense granules	NCLIV_052150	
TGME49_215910	hypothetical protein	TGME49_215910	dense granules	NCLIV_060220	
TGME49_215980	hypothetical protein	TGME49_215980	dense granules	NCLIV_060160	
TGME49_216070	hypothetical protein	TGME49_216070	nucleus - chromatin	NCLIV_060050	
TGME49_225120	hypothetical protein	TGME49_225120	dense granules	NCLIV_047570	
TGME49_225160	hypothetical protein	TGME49_225160	dense granules	NCLIV_047520	
TGME49_226420	peptidase family M3 protein	TGME49_226420	dense granules	NCLIV_046540	
TGME49_228760	hypothetical protein	TGME49_228760	dense granules	NCLIV_044850	
TGME49_229390	hypothetical protein	TGME49_229390	dense granules	NCLIV_030320	
TGME49_230190	hypothetical protein	TGME49_230190	dense granules	NCLIV_030840	
TGME49_232270	histidine acid phosphatase superfamily protein	TGME49_232270	dense granules	NCLIV_032260	
TGME49_240830	hydrolase, alpha/beta fold family protein	TGME49_240830	mitochondrion - soluble	NCLIV_0169	
TGME49_241300	hypothetical protein	TGME49_241300	#N/D	#N/D	
TGME49_244280	hypothetical protein	TGME49_244280	dense granules	#N/D	
TGME49_246590	hypothetical protein	TGME49_246590	nucleus - chromatin	NCLIV_063380	
TGME49_247050	hypothetical protein	TGME49_247050	nucleus - chromatin	NCLIV_063720	
TGME49_247220	nudix -type motif 9 isoform a family protein	TGME49_247220	dense granules	NCLIV_063740	
TGME49_247530	hypothetical protein	TGME49_247530	dense granules	#N/D	
TGME49_248990	hypothetical protein	TGME49_248990	dense granules	NCLIV_065090	
TGME49_250955	KRUF family protein	TGME49_250955	dense granules	#N/D	
TGME49_253140	hypothetical protein	TGME49_253140	nucleus - chromatin	NCLIV_007680	
TGME49_258458	hypothetical protein	TGME49_258458	#N/D	NCLIV_028060	36515555
TGME49_262400	lipase	TGME49_262400	dense granules	NCLIV_025430	
TGME49_263560	hypothetical protein	TGME49_263560	dense granules	NCLIV_024380	
TGME49_266050	hypothetical protein	TGME49_266050	dense granules	#N/D	
TGME49_266410	hypothetical protein	TGME49_266410	dense granules	NCLIV_039510	36515555
TGME49_268970	hypothetical protein	TGME49_268970	dense granules	NCLIV_037380	
TGME49_272350	mRNA export protein	TGME49_272350	nucleus - chromatin	NCLIV_034950	
TGME49_275460	hypothetical protein	TGME49_275460	dense granules	NCLIV_052900	
TGME49_279350	hypothetical protein	TGME49_279350	dense granules	NCLIV_038440	
TGME49_280380	poly(ADP-ribose) glycohydrolase	TGME49_280380	dense granules	NCLIV_019770	

TGME49_282170	hypothetical protein	TGME49_282170	dense granules	NCLIV_023780	
TGME49_500200	intraconoidal microtubule-associated protein ICMAP3	ICMAP3	dense granules	NCLIV_015040	
TGME49_288000	hypothetical protein	TGME49_288000	dense granules	NCLIV_040650	
TGME49_291630	hypothetical protein	TGME49_291630	dense granules	NCLIV_043130	
TGME49_294200	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	TGME49_294200	dense granules	NCLIV_000940	
TGME49_294970	hypothetical protein	TGME49_294970	dense granules	NCLIV_001830	
TGME49_294980	hypothetical protein	TGME49_294980	dense granules	#N/D	
TGME49_301480	hypothetical protein	TGME49_301480	dense granules	#N/D	
TGME49_304720	hypothetical protein	TGME49_304720	dense granules	NCLIV_044430	
TGME49_306890	hypothetical protein	TGME49_306890	dense granules	NCLIV_053260	
TGME49_308950	histidine acid phosphatase superfamily protein	TGME49_308950	dense granules	NCLIV_053400	
TGME49_314265	hypothetical protein	TGME49_314265	nucleus - chromatin	NCLIV_057340	
TGME49_315910	hypothetical protein	TGME49_315910	dense granules	#N/D	36515555
TGME49_320630	phosphotransferase enzyme family protein	TGME49_320630	dense granules	NCLIV_009640	
TGME49_323100	hypothetical protein	TGME49_323100	dense granules	#N/D	
TGME49_323110	hypothetical protein	TGME49_323110	dense granules	#N/D	
TGME49_235140	hypothetical protein	TgNSM	dense granules	#N/D	
TGME49_208450	protease inhibitor PI2	TgPI2	dense granules	NCLIV_003120	
TGME49_246130	serpin (serine proteinase inhibitor) superfamily protein	TgPI-1	dense granules	NCLIV_063150	