

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

RUTH OPEYEMI AWOYINKA

**ANÁLISE BIOINFORMÁTICA COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DE
GRÂNULOS DENSOS DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum***

UBERLÂNDIA

2023

RUTH OPEYEMI AWOYINKA

**ANÁLISE BIOINFORMÁTICA COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DE
GRÂNULOS DENSOS DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum***

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

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

**UBERLÂNDIA
2023**

RUTH OPEYEMI AWOYINKA

**ANÁLISE BIOINFORMÁTICA COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DE
GRÂNULOS DENSOS DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum***

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia.

Uberlândia, 20 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Newton de Medeiros Vidal (UFU)

Dr^a. Flávia Batista Ferreira (UFU)

A Deus, a todos aqueles que me inspiraram e me apoiaram nesta trajetória e à busca do conhecimento, da criatividade e da inovação, na esperança de que ele contribua para um futuro melhor e mais brilhante para todos nós.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela Sua presença e orientação divina durante toda a jornada. Seu apoio inabalável tem sido uma fonte de força e inspiração. Diante dos desafios e incertezas, Ele tem sido minha rocha firme, proporcionando-me a sabedoria, a resiliência e a criatividade necessárias para superar obstáculos e progredir. Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!

Aos meus pais, suas orações constantes, sacrifícios e confiança em minha capacidade e suas palavras de motivação têm sido a força motriz do meu sucesso. Obrigada por sempre estarem presentes para oferecer orientação, apoio financeiro e conforto emocional quando mais precisei. Seus sacrifícios e dedicação à minha educação não passaram sem ser percebidos e sou realmente grata por tudo o que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, obrigada por serem meus incentivadores e minha fonte de inspiração. Obrigada pela paciência, pelo apoio moral e por sempre me ouvirem quando precisei desabafar. A presença de vocês me deu força e motivação para perseverar.

Aos meus amigos e colegas de curso, que têm sido uma fonte constante de apoio, amor e companheirismo ao longo de minha jornada. Vocês desempenharam um papel indispensável em minha vida, e sou abençoada por tê-los ao meu lado. Obrigada pelas experiências compartilhadas.

À minha família adotiva aqui no Brasil (Christabel, UMP da Sexta, Sexta Igreja IPB, Igreja Presbiteriana do Morumbi e Igreja Presbiteriana, Jardim Karaíba). Vocês me mostraram o verdadeiro significado de família, lembrando-me de que a família não é definida apenas pelo sangue, mas pelo amor e carinho que temos uns pelos outros. Seu apoio, tanto nos bons momentos quanto nos momentos difíceis, significou muito para mim.

A Vanesca, Dona Regina, Sarah, Rayanne, Silvia, Karlane, Halina e Paula, minha profunda gratidão pelo papel que vocês desempenharam em minha vida como uma figura materna longe de casa. Seu amor, orientação e cuidado têm sido um farol de luz, proporcionando-me conforto e força tanto nos momentos de alegria quanto nos de adversidade.

À Universidade Federal de Uberlândia, que me equipou com as habilidades e os conhecimentos necessários para meus empreendimentos futuros. A educação e as experiências que adquiri aqui foram fundamentais para moldar meu caminho ao sucesso. Aos professores, por sua competência, orientação e incentivo contínuo, que foram valiosos para meu crescimento acadêmico e pessoal. Ao CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos membros do Laboratório de Imunoparasitologia, obrigada pelo seu apoio e assistência durante o andamento da minha pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago W.P. Mineo, sua expertise, mentoria e apoio constantes foram fundamentais para a formação deste projeto. Seu comentário esclarecedor, suas críticas construtivas e sua dedicação ao meu desenvolvimento profissional foram inestimáveis. Aprendi muito com sua orientação e sou muito grata pela confiança que depositou em mim.

Aos meus co-orientadores, Profa. Dra. Caroline Martins Mota, e especificamente ao Me. Jhoan David Aguillón Torres. Sua colaboração e apoio foram fundamentais para garantir o sucesso deste projeto. Sua perspectiva única e suas contribuições construtivas enriqueceram muito a qualidade e a profundidade do meu trabalho. Agradeço o tempo e o esforço que investiram neste projeto, bem como seus compromissos com meu crescimento como pesquisadora.

Às minhas dedicadas e apoiadoras amigas e colegas do laboratório, Ana Paula, Mariana, Carolina, Débora, Bruna, Jessica, e aos outros integrantes do laboratório, obrigada por suas contribuições contínuas e companheirismo durante todo o tempo em que trabalhamos juntos. Seus esforços coletivos fizeram do nosso laboratório um local de inovação e colaboração, e sou grata pelos inúmeros momentos de crescimento e aprendizado que compartilhamos.

A todas as pessoas que, independentemente da distância, colaboraram de alguma maneira para a realização deste projeto. Agradeço imensamente!

“A sabedoria é o poder de enxergar e a inclinação para escolher o melhor e mais elevado alvo, juntamente com os meios mais seguros de alcançá-lo.”

(J.I. Packer)

RESUMO

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são parasitos intimamente relacionados dentro do filo Apicomplexa, com impacto significativo na medicina humana e veterinária. *N. caninum* é uma das principais causas de falha reprodutiva em bovinos, enquanto *T. gondii* infecta uma parte significativa da população humana. Ambos os parasitos compartilham ciclos de vida complexos, e sua capacidade de secretar proteínas de grânulos densos (GRAs) desempenha um papel fundamental em sua patogênese. As GRAs são importantes para a sobrevivência intracelular desses parasitos, pois influenciam as interações entre o hospedeiro e o parasito, a aquisição de nutrientes e a modulação das respostas imunológicas do hospedeiro. Apesar da grande semelhança entre esses parasitos, poucas pesquisas se concentraram nas GRAs de *N. caninum* (NcGRAs), e sua análise comparativa com as GRAs de *T. gondii* (TgGRAs) continua pouco estudada. O objetivo deste estudo é preencher essa lacuna por meio da realização de uma análise bioinformática utilizando bancos de dados públicos, fornecendo informações sobre a conservação e a divergência de GRAs nesses parasitos. Este estudo compila e caracteriza uma lista de GRAs em *T. gondii* e *N. caninum*, utilizando bancos de dados de acesso livre. Análises bioinformáticas, incluindo ortologia, sintenia, e avaliação de características estruturais como a análise de domínio e os motivos conservados, são realizadas. As estruturas 3D das GRAs são preditas usando o *AlphaFold2*, permitindo uma comparação detalhada de suas estruturas terciárias. As principais descobertas do estudo incluem a identificação de 185 TgGRAs e 146 NcGRAs ortólogas. Essas proteínas exibem identidade diferentes, com a maioria ficando dentro da faixa de 61-70%, sugerindo variações nos papéis funcionais. Além disso, as diferenças nos domínios transmembrana e peptídeos sinais indicam possíveis disparidades na localização subcelular e na funcionalidade entre as GRAs. A presença de outros domínios conservados destaca elementos funcionais compartilhados entre essas GRAs. A análise estrutural em 3D revela diferenças e semelhanças na arquitetura molecular dessas GRAs, esclarecendo ainda mais suas complexidades. Esta pesquisa contribui para uma compreensão mais profunda dos aspectos moleculares, da diversidade funcional e da história evolutiva das TgGRAs e NcGRAs, o que pode ter implicações de longo alcance para o desenvolvimento de intervenções e terapias para infecções de toxoplasmose e neosporose.

Palavras-chave: GRAs; domínios conservados; estruturas 3D; *Neospora caninum*; *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* are closely related parasites within the Apicomplexa phylum, with a significant impact on human and veterinary medicine. *N. caninum* is one of the main causes of reproductive failure in cattle, while *T. gondii* infects a significant part of the human population. Both parasites share complex life cycles, and their ability to secrete dense granule proteins (GRAs) plays a key role in their pathogenesis. GRAs are important for the intracellular survival of these parasites, as they influence host-parasite interactions, the acquisition of nutrients and the modulation of the host's immune responses. Despite the great similarity between these parasites, little research has focused on *N. caninum* GRAs (NcGRAs), and their comparative analysis with *T. gondii* GRAs (TgGRAs) remains poorly studied. The aim of this study is to fill this gap by carrying out a bioinformatic analysis using public databases, providing information on the conservation and divergence of GRAs in these parasites. This study compiles and characterises a list of GRAs in *T. gondii* and *N. caninum*, using open-access databases. Bioinformatic analyses, including orthology, synteny, and evaluation of structural features such as domain analysis and conserved motifs, are performed. The 3D structures of the GRAs are predicted using AlphaFold2, allowing a detailed comparison of their tertiary structures. The main findings of the study include the identification of 185 TgGRAs and 146 orthologous NcGRAs. These proteins exhibit different identities, with the majority falling within the 61-70% range, suggesting variations in functional roles. In addition, differences in transmembrane domains and signal peptides indicate possible disparities in subcellular localisation and functionality between GRAs. The presence of other conserved domains highlights shared functional elements between these GRAs. 3D structural analysis reveals differences and similarities in the molecular architecture of these GRAs, shedding further light on their complexities. This research contributes to a deeper understanding of the molecular aspects, functional diversity and evolutionary history of TgGRAs and NcGRAs, which may have far-reaching implications for the development of interventions and therapies for toxoplasmosis and neosporosis infections.

Keywords: GRAs; conserved domains; 3D structures; *Neospora caninum*; *Toxoplasma gondii*.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Distribuição de identidades de proteínas em sequências de GRAs.....	21
FIGURA 2 - Análise de domínio transmembrana e de peptídeo sinal de TgGRAs e NcGRAs.....	22
FIGURA 3 - Análise dupla de domínios transmembrana e peptídeos sinais em TgGRAs e NcGRAs.....	23
FIGURA 4 - Predição de estruturas 3D e pontuações de confiabilidade de GRAs ortólogas em <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	31
FIGURA 5 - Análise estrutural comparativa em 3D de proteínas ortólogas de grânulos densos (GRAs) em <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	33

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 - TgGRAs que apresentam domínios transmembrana e peptídeos sinais.....	24
TABELA 2 - NcGRAs que apresentam domínios transmembrana e peptídeos sinais.....	25
TABELA 3 - GRAs ortólogas com domínios transmembrana e peptídeos sinais compartilhados.....	26
TABELA 4 - Distribuição de domínio da superfamília PKc em TgGRAs e NcGRAs.....	28
TABELA 5 - Distribuição de domínio da superfamília SMC em TgGRAs e NcGRAs.....	29
TABELA 6 - Distribuição da superfamília do domínio SRS em TgGRAs e NcGRAs.....	29
TABELA 7 - Distribuição de domínio da proteína de tegumento grande em TgGRAs e NcGRAs.....	30
TABELA 8 - Distribuição da superfamília do domínio semelhante à fosfatase do tipo PPM em TgGRAs e NcGRAs.....	30
TABELA 9 - Distribuição de domínio da superfamília DWNN/RING Finger/ZINC Finger em TgGRAs e NcGRAs.....	31

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDD - *Conserved Domain Database*

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

FASTA - *FAST-All*

FATCAT - *Flexible structure AlignmentT by Chaining Aligned fragment pairs allowing Twists*

GO - *Gene Ontology*

GRA - Proteínas de Grânulos Densos

IVN - *Intravacuolar Network* (rede intravacuolar)

Nc - *Neospora caninum*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NcGRA - proteínas de grânulos densos de *Neospora caninum*

PKC - Proteína Quinase C

PPM - Proteína Fosfatase dependente de Metal

PV - Vacúolo Parasitóforo

PVM - Membrana do Vacúolo Parasitóforo

RSMD - *Root-Mean-Square Deviation*

SBC - *Stockholm Bioinformatics Centre*

Seq. - Sequências

SMC - Proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos

SRS - Sequências relacionadas ao SAG1

Tg - *Toxoplasma gondii*

TgGRA - proteínas de grânulos densos de *Toxoplasma gondii*

ToxoDB - *Toxoplasma Informatics Resources Database*

UCD - *University College Dublin*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 JUSTIFICATIVA.....	16
3 OBJETIVO.....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 METODOLOGIA.....	17
4.1 Identificação e compilação de dados de proteína.....	17
4.2 Extração da informação e das sequências das proteínas.....	17
4.3 Alinhamento de proteínas e cálculo de identidade.....	18
4.4 Anotação de peptídeo sinal e domínios transmembrana.....	18
4.5 Anotações funcionais e análise de domínio.....	18
4.6 Análise estrutural.....	19
4.7 Integração e análise estatística.....	19
5 RESULTADOS.....	20
5.1 As GRAs de <i>Toxoplasma gondii</i> , sua ortologia, sintenia em <i>Neospora caninum</i> e a identidade das proteínas.....	20
5.2 Análise dos Domínios Transmembrana e do Peptídeos Sinais de TgGRAs e NcGRAs..	21
5.3 Outros domínios conservados em TgGRAs e NcGRAs: Uma análise comparativa.....	27
5.4 Análise estrutural 3D de GRAs ortólogas em <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	31
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum, o agente causador da neosporose, é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, um grupo de espécies de parasitos que têm um impacto significativo na medicina humana e veterinária. (Dubey; Schares, 2011; Berná *et al.*, 2021). Desde sua descoberta, *N. caninum* foi relatado como causador de disfunção do sistema nervoso em cães e também emergiu como a principal causa de falha reprodutiva em bovinos em todo o mundo, resultando em perdas financeiras significativas para a indústria pecuária (Risco-Castillo *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021; Yue *et al.*, 2021). Uma variedade de animais, principalmente mamíferos como gatos, porcos, ovinos, equinos, bovinos e caprinos, entre outros, são hospedeiros intermediários de *N. caninum*, mas os cães domésticos e canídeos selvagens são hospedeiros definitivos capazes de realizar o ciclo sexuado no intestino (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2021; Villa *et al.*, 2021; De Campos *et al.*, 2022; Mineo *et al.*, 2022).

Toxoplasma gondii, o agente etiológico da toxoplasmose, é um parasito intimamente relacionado com *N. caninum* e presumivelmente a espécie melhor estudada do filo Apicomplexa (Fereig; Nishikawa, 2020; Amdouni *et al.*, 2021). Estima-se que *T. gondii* infecta cerca de um terço da população mundial de humanos e seja uma infecção igualmente comum em animais selvagens e domésticos (Sanchez; Besteiro, 2021; Qi *et al.*, 2022). *T. gondii* infecta os tecidos musculares, bem como o sistema nervoso central, resultando em uma infecção latente que geralmente não leva seus hospedeiros a desenvolverem a doença clínica. Esta infecção pode ser severa em certos grupos, como pacientes imunocomprometidos e o feto em desenvolvimento em casos de infecção congênita na primeira metade da gestação (Galal *et al.*, 2022; Waap *et al.*, 2022). Tendo como hospedeiros intermediários quase todos os vertebrados de sangue quente, os felídeos são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, onde se dá o ciclo de replicação sexuada do parasito no intestino destes animais, com posterior eliminação no ambiente de formas resistentes, porém infectivas (Borkens, 2021; Ahmadvour *et al.*, 2023).

Os ciclos biológicos de *T. gondii* e *N. caninum* são complexos, envolvendo diferentes estágios e hospedeiros. A infecção por esses parasitos pode acontecer por meio do contato com animais infectados ou suas fezes, consumo de alimentos ou água contaminados, ou ambos (Mukhopadhyay; Arranz-Solís; Saeij, 2020; Anghel *et al.*, 2021). Ambos os parasitos têm três estágios infecciosos, que incluem esporozoítos, que estão contidos em oocistos e são criados no intestino do hospedeiro definitivo; taquizoítos, que são a fase proliferativa e

causadora de doenças; e os bradizoítos, que são encontrados na fase de latência e se proliferam gradualmente para formar cistos teciduais, os quais podem persistir por períodos prolongados sem desencadear respostas inflamatórias (Fereig; Abdelbaky; Nishikawa, 2021; Pan *et al.*, 2022).

Ao invadir células hospedeiras, aderir às membranas celulares e se desenvolver no vacúolo parasitóforo (PV), uma organela membranosa especializada onde os parasitos se replicam, *T. gondii* e *N. caninum* liberam proteínas produzidas em organelas secretoras chamadas micronemas (MICs), roptrias (ROPs) e grânulos densos (GRAs) (Risco-Castillo *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). A secreção de proteínas de grânulos densos (GRAs), é uma parte crucial da estratégia de sobrevivência intracelular desses parasitos, que é essencial para as interações parasito-hospedeiro e o desenvolvimento do PV (Mercier *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2021; Abdou *et al.*, 2022). No lúmen do PV, existem nanotúbulos curvos de membrana que têm o duplo propósito de captar nutrientes dos hospedeiros e fixar os parasitos à membrana vacúolo parasitóforo (PVM), mantendo o ambiente de crescimento intracelular para os taquizoítos. Esses túbulos membranosos são estabelecidos por GRAs juntamente com lipídios, formando a estrutura da rede intravacuolar (IVN) (Guevara; Fox; Bzik, 2020; Risco-Castillo *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2021).

As GRAs desempenham várias funções, como influenciar as respostas imunes do hospedeiro, adquirir nutrientes, alterar a estrutura do vacúolo parasitóforo e manipular as vias de sinalização dentro da célula hospedeira (Yu *et al.*, 2021; Yue *et al.*, 2021). Certo número de GRAs foram encontradas e caracterizadas em *N. caninum*. Por exemplo, NcGRA7, resultou ser um fator essencial de virulência, já que permite a invasão da célula hospedeira e também é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro (Nishikawa *et al.*, 2018). Por outro lado, observou-se que a proteína NcGRA7 pode regular a apoptose da célula hospedeira e as vias de sinalização imune através da formação de complexos com proteínas do hospedeiro (Wang *et al.*, 2021; Abdou *et al.*, 2022). Outras GRAs que estão envolvidas na aquisição e manutenção de nutrientes são NcGRA2 e NcGRA6, estabelecendo e mantendo o PV e IVN (Yue *et al.*, 2021).

Da mesma forma, *T. gondii* possui uma variedade de GRAs que auxiliam na sua patogênese. Por exemplo, foi observado que a proteína TgGRA1, é necessária para a replicação do parasito nas células hospedeiras, contribui também para a evasão imune, invasão da célula hospedeira e o desenvolvimento da membrana do PV (Griffith; Pearce; Heaslip, 2022). Outras GRAs envolvidas no controle da resposta imune do hospedeiro e no

aumento da sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro são GRA2, GRA3, GRA4, GRA7, GRA8, GRA9, GRA12, e GRA60 (Guevara; Fox; Bzik, 2020; Dong *et al.*, 2021; Griffith; Pearce; Heaslip, 2022; Zheng *et al.*, 2023).

Embora estudos tenham mostrado altos níveis de similaridades entre esses dois parasitos (Ma *et al.*, 2020; Fereig; Omar; Alsayeqh, 2022), poucos relatos de pesquisas focaram nas funções das GRAs de *N. caninum*, e também na análise comparativa dessas GRAs entre os dois parasitos (Dong *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021). Até agora, a maioria das NcGRAs foram encontradas individualmente por meio de diferentes técnicas como a identificação por biotinylation por proximidade (BioID), uma abordagem que utiliza uma proteína GRA conhecida como isca para descobrir outras proteínas (Nadipuram *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). Buscas bioinformáticas também estão sendo utilizadas para identificar novas GRAs de *N. caninum* que mostram semelhanças com as conhecidas proteínas de grânulos densos do *T. gondii* (TgGRAs) (Dong *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2023). Um dos bancos de dados públicos utilizados para esse fim é *Toxoplasma Informatics Resources Database* (ToxoDB - VEuPathDB), uma ferramenta de livre acesso que disponibiliza aos usuários dados genômicos e funcionais das proteínas específicas para organismos da classe Conoidasida, incluindo os parasitos *T. gondii* e *N. caninum* (Harb; Roos, 2020; Hu *et al.*, 2022; Mayoral *et al.*, 2022).

Avanços recentes na tecnologia de imagem das proteínas mudaram significativamente o estado de visualização de resolução bidimensional (2D) para tridimensional (3D). Por esta razão, a DeepMind lançou oficialmente seu novo Banco de Dados de Estruturas de Proteínas *AlphaFold* (*AlphaFold2*) (Jumper *et al.*, 2021; Ivanov *et al.*, 2022). Usando a sequência primária predita de aminoácidos e sequências alinhadas de homólogos como molde, a rede *AlphaFold2* prevê diretamente as coordenadas 3D de todos os átomos pesados para uma determinada proteína, ajudando a mapear as diferenças e semelhanças entre proteínas homólogas, e também servindo como uma ferramenta útil para comparar as estruturas das GRAs de *N. caninum* e *T. gondii* (Zweckstetter, 2021; Keskin Karakoyun *et al.*, 2023).

2 JUSTIFICATIVA

Até o momento, poucos estudos examinaram os processos de interação parasito-hospedeiro em relação às proteínas de grânulos densos em *N. caninum*. Dado que as GRAs desempenham uma variedade de papéis cruciais na regulação da relação entre o parasito e a célula hospedeira, é muito importante identificar novas GRAs de *N. caninum*, caracterizar o seu envolvimento na patogênese do parasito e compreender as semelhanças destes GRAs com proteínas ortólogas num parasito melhor estudado, o *T. gondii*. Neste contexto, esta pesquisa visa fornecer informações sobre a conservação e divergência de ortólogos de GRAs entre *N. caninum* e *T. gondii*. Isso ajudará no desenvolvimento de intervenções direcionadas, como novas medidas terapêuticas, ferramentas de diagnóstico e vacinas para controlar a neosporose e a toxoplasmose, duas doenças importantes com impactos significativos na saúde animal e humana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Comparar, por meio de análises bioinformáticas utilizando bases de dados públicas, as proteínas preditas e descritas de grânulos densos (GRAs) de *N. caninum* e *T. gondii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Gerar uma lista de GRAs a partir dos dados disponíveis em diferentes bases de dados de livre acesso.
- Avaliar mediante análises de ortologia e sintenia a presença das proteínas listadas nos dois parasitos.
- Comparar mediante características estruturais das GRAs presentes nos dois parasitos como peptídeo sinal, domínios transmembrana e outros domínios conservados.
- Analisar a confiabilidade dos modelos 3D preditos das GRAs comuns dos dois parasitos pelo AlphaFold2.
- Comparar os modelos 3D do AlphaFold2 entre os dois parasitos, buscando diferenças ou semelhanças na estrutura terciária das proteínas.

4 METODOLOGIA

4.1 IDENTIFICAÇÃO E COMPILAÇÃO DE DADOS DE PROTEÍNA

O objetivo principal desta pesquisa é executar uma análise comparativa abrangente das proteínas de grânulos densos (GRAs) em *T. gondii* e suas ortólogas correspondentes em *N. caninum*. Portanto, foi realizada uma compilação de todos os genes reconhecidos e descritos como grânulos densos, fazendo referência a publicações acadêmicas disponíveis no *PubMed*, bem como consultando bancos de dados de acesso livre, como *NCBI*, *ToxoDB*, *Uniprot* e *GenBank*.

Além disso, empregando os recursos fornecidos pelo banco de dados *ToxoDB* (<https://toxodb.org/>), foi realizada uma exploração detalhada dos genes preditas como GRAs por meio do modelo HyperLOPIT (Barylyuk *et al.*, 2020) para *T. gondii*. Em seguida, a ferramenta *OrthoMCL DB* (<https://orthomcl.org/>) e *ToxoDB* foram empregadas para examinar e identificar genes ortólogos e sintênicos em *N. caninum* correspondentes a cada proteína da lista compilada. Ortologia é a relação entre genes em diferentes espécies que se originaram de um ancestral comum. Os genes ortólogos, evoluídos através da especiação, mantêm funções semelhantes apesar das mudanças evolutivas (Lechner *et al.*, 2014). Sintenia envolve o arranjo físico dos genes nos cromossomos. Genes no mesmo cromossomo herdados juntos formam uma relação sintênica (Liu; Hunt; Tsai, 2018). Essa abordagem sistemática estabelece a base para a análise comparativa rigorosa das GRAs e suas ortólogas, facilitando uma compreensão mais profunda das funções e da evolução dessas proteínas nas duas espécies de parasitos.

4.2 EXTRAÇÃO DA INFORMAÇÃO E DAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS

Para facilitar a comparação das proteínas, uma série de atributos estruturais foi extraída, abrangendo detalhes como tamanho da proteína, peso molecular, local genômico e a presença ou ausência de domínios transmembrana e peptídeos sinais. Além disso, a análise incluiu a identificação de domínios conservados anotados. Essas percepções estruturais foram obtidas com o uso dos bancos de dados *ToxoDB*, um recurso do *VEuPathDB Bioinformatics Resource Center* (<https://toxodb.org/toxo/app/>). Para permitir uma análise mais aprofundada, as sequências de proteínas pertinentes foram extraídas no formato FASTA. Esse conjunto de

dados e informações estruturais serve como base para a investigação comparativa, facilitando uma exploração detalhada das proteínas de interesse.

4.3 ALINHAMENTO DE PROTEÍNAS E CÁLCULO DE IDENTIDADE

As sequências foram submetidas a alinhamento no formato FASTA, utilizando o algoritmo *Clustal Omega*, disponível no *Conway Institute da University College Dublin (UCD)* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Esse processo de alinhamento foi realizado com o objetivo principal de identificar e quantificar as similaridades e disparidades presentes nas sequências de aminoácidos. Para validar a integridade do alinhamento, os resultados foram cruzados com domínios funcionais estabelecidos, atributos estruturais e dados empíricos, garantindo assim a fidelidade da análise.

4.4 ANOTAÇÃO DE PEPTÍDEO SINAL E DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA

Para validar as informações obtidas do *ToxoDB*, foi realizada uma análise para anotar os peptídeos sinais, domínios transmembrana e outros domínios evolutivamente conservados. A principal função do peptídeo sinal é direcionar a proteína para um compartimento celular específico, geralmente o retículo endoplasmático (RE) em células eucarióticas (Freudl, 2018). A principal função do domínio transmembrana é manter a proteína dentro ou através da membrana. Proteínas com domínios transmembrana geralmente funcionam como receptores, canais ou transportadores, permitindo a passagem controlada de moléculas através da membrana (Guna; Hegde, 2018). A predição de peptídeos sinais foi executada por meio de vários modelos, incluindo o *SignalP 6.0*, acessível via *DTU Health Tech's Bioinformatic Services* (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>), o *InterProScan* do Instituto Europeu de Bioinformática (*EMBL* - <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) e o *Phobius*, oferecido pelo Centro de Bioinformática de Estocolmo (*SBC* - <https://phobius.sbc.su.se/>). Para a identificação de domínios transmembrana, foi adotada uma abordagem paralela, empregando o *TMHMM 2.0*, disponível por meio do *DTU Health Tech's Bioinformatic Services*, o *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) e o *Phobius*. Essa análise conjunta teve como objetivo aumentar a precisão e a eficácia dos dados, reforçando a confiabilidade dos resultados.

4.5 ANOTAÇÕES FUNCIONAIS E ANÁLISE DE DOMÍNIO

Para compreender os mecanismos complexos subjacentes às variações de patogenicidade e especificidade do hospedeiro atribuídas às proteínas de grânulos densos (GRAs), foi adotada uma abordagem multifacetada. A função molecular, os processos biológicos e os componentes celulares associados a essas GRAs foram anotados por meio da utilização do recurso *Gene Ontology* (GO), que pode ser acessado pelo *National Human Genome Research Institute* (https://www.uniprot.org/help/gene_ontology). Esse processo de anotação esclareceu os papéis funcionais e o envolvimento dessas GRAs no contexto da patogenicidade e da especificidade do hospedeiro.

A investigação se estendeu à exploração de domínios conservados adicionais e motivos funcionais presentes nas sequências de proteínas. Essa exploração foi facilitada por duas ferramentas importantes: a ferramenta *Conserved Domain Database* (CDD), disponível em (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, CDD-NCBI), e o *InterProScan* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>). Essas ferramentas complementares foram empregadas para descobrir domínios e motivos conservados, fornecendo mais informações sobre os atributos estruturais e funcionais das proteínas analisadas.

4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL

Para obter conhecimentos mais profundos sobre essas GRAs, suas estruturas tridimensionais (3D) foram preditas por meio da aplicação de técnicas avançadas de modelagem computacional. O *AlphaFold2*, uma ferramenta de modelagem desenvolvida pela DeepMind Technologies em Londres, Reino Unido, foi empregada para essa finalidade. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). A confiabilidade dessas estruturas preditas foi avaliada de acordo com os intervalos de confiança associados fornecidos pelo *AlphaFold2*.

Posteriormente, as estruturas 3D preditas geradas por meio dessa técnica foram baixadas para uma análise comparativa mais aprofundada, com o objetivo principal de revelar a identidade, as semelhanças e as disparidades na estrutura terciária dessas proteínas. Essa análise estrutural foi realizada com o auxílio do *PyMOL* v. 2.5.5, (*PyMOL System software, Schrodinger, Inc.*), e o algoritmo *FATCAT - Pairwise Alignment* (https://fatcat.godziklab.org/fatcat/fatcat_pair.html). Essas ferramentas analíticas foram fundamentais para a análise aprofundada das estruturas 3D extraídas, permitindo uma exploração das características estruturais das GRAs.

4.7 INTEGRAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As outras análises estatísticas foram feitas usando *GraphPad Prism* v. 9.0 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). Testes de normalidade e homogeneidade foram realizados para determinar a distribuição dos dados. Posteriormente, testes ANOVA ou Kruskal-Wallis foram realizados para determinar diferenças entre grupos e testes de comparação múltipla para examinar comparações entre grupos. Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão se tiverem distribuição normal, ou mediana e erro médio se não tiverem distribuição normal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 As GRAs de *Toxoplasma gondii*, sua ortologia, sintenia em *Neospora caninum* e a identidade das proteínas.

Considerando o conjunto coletivo de proteínas de grânulos densos de *T. gondii* (TgGRAs) documentadas na literatura científica existente (*PubMed*), bancos de dados de acesso livre como *NCBI*, *ToxoDB*, *Uniprot*, *GenBank*, bem como as proteínas preditas como TgGRAs por meio da aplicação do modelo *HyperLOPIT*, foi obtido um total cumulativo de 185 TgGRAs. Após a implementação detalhada de técnicas de agrupamento ortólogo (*OrthoMCL DB*) e sintênico (*ToxoDB*) nesse conjunto de TgGRAs, foi determinado que 146 proteínas apresentam uma relação ortóloga e sintênica em *N. caninum*. Vale ressaltar que todas as proteínas ortólogas utilizadas nesse estudo foram as ortólogas que o *ToxoDB* indicou.

Na análise realizada com a ferramenta de alinhamento *Clustal Omega*, observou-se que as identidades das proteínas de *T. gondii* e *N. caninum* não apresentam preservação completa após o alinhamento das sequências das GRAs listadas. As porcentagens de identidade observadas exibem um espectro que varia de 20% a 100% de identidade, com a maioria das identidades na faixa de 61 a 70%, conforme ilustrado visualmente na Figura 1. É importante observar que algumas GRAs significativas como CST4 (61,90%), CST9 (63,01%) e GRA12A (65,25%), foram encontrados dentro dessa faixa de identidade.

Entre essas sequências de proteínas, a GRA3 surgiu com a menor identidade de proteína observada, registrando apenas 27,66%. Por outro lado, uma GRA predita e ainda não descrita experimentalmente, TGME49_272350 / NCLIV_034950, apresentou a maior porcentagem de identidade por meio do alinhamento realizado pelo *Clustal Omega*, chegando a 95,29%.

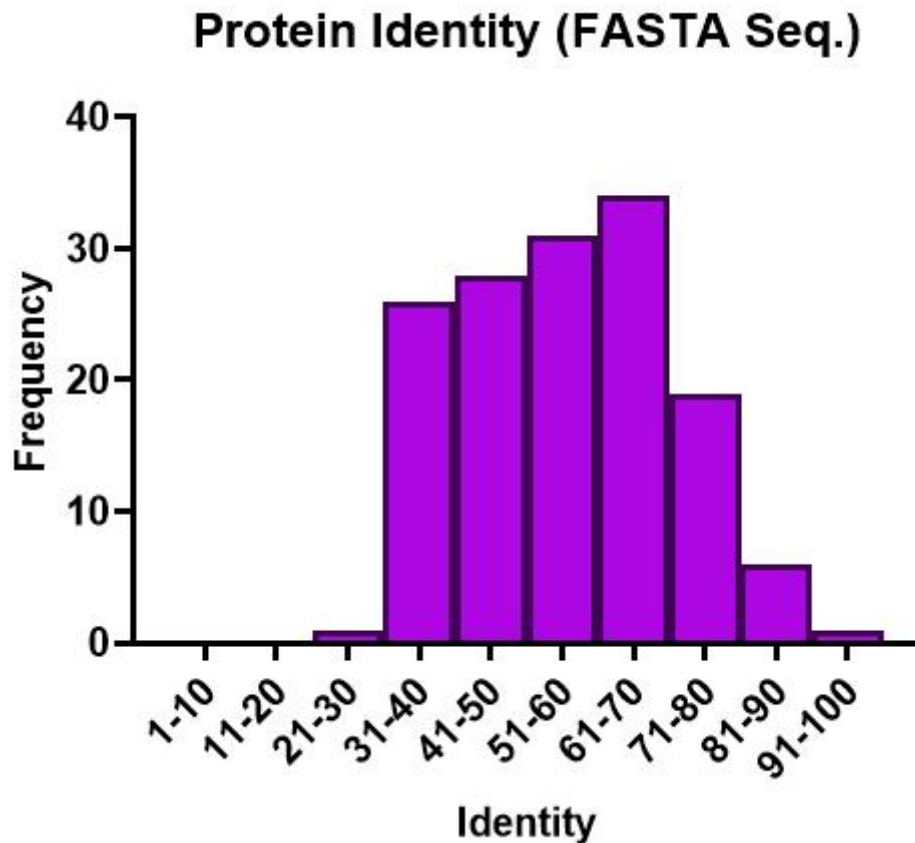


Figura 1: Distribuição de identidades de proteínas em sequências de GRAs. Intervalo de porcentagens de identidade de proteína resultante do alinhamento Clustal Omega das sequências de GRAs ortólogas em *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. As porcentagens de identidade variam de 20% a 100%, com mediana no intervalo de 61% a 70%.

5. 2. Análise dos Domínios Transmembrana e do Peptídeos Sinais de TgGRAs e NcGRAs

Foi realizada uma análise detalhada dos domínios transmembrana e peptídeos sinais no conjunto de dados de 146 TgGRAs e NcGRAs utilizando o algoritmo do *Phobius* (que foi escolhida devido à sua alta confiabilidade e precisão). Nessa análise, foi observado que um subconjunto de TgGRAs e NcGRAs possui domínios transmembrana.

Entre o conjunto total de dados de 146 TgGRAs, apenas 63 deles apresentam a presença de domínios transmembrana (conforme ilustrado na Fig. 2A). Da mesma forma, verificou-se que um total de 52 NcGRAs possuíam esse domínio (ilustrado na Fig. 2B). Vale ressaltar que esses domínios transmembrana não são nas mesmas TgGRAs e NcGRAs. Essa ocorrência discrepante de domínios transmembrana entre TgGRAs e NcGRAs aponta para possíveis distinções em sua localização subcelular ou papéis funcionais, que são aspectos primordiais da biologia parasitária.

A análise do algoritmo do *Phobius* revelou também que um subconjunto de TgGRAs e NcGRAs possuem peptídeos sinais, uma característica frequentemente associada a proteínas destinadas à secreção ou à localização na membrana. Especificamente, do total de 146 TgGRAs, 62 foram identificados como possuidores de peptídeos sinais (conforme ilustrado na Fig. 2C), enquanto um padrão semelhante foi observado nos NcGRAs, com 60 membros exibindo peptídeos sinais (Fig. 2D). A presença de peptídeos sinais em um número considerável desses GRAs sugere seu possível envolvimento em interações com células hospedeiras, bem como suas funções na secreção de moléculas efetoras.

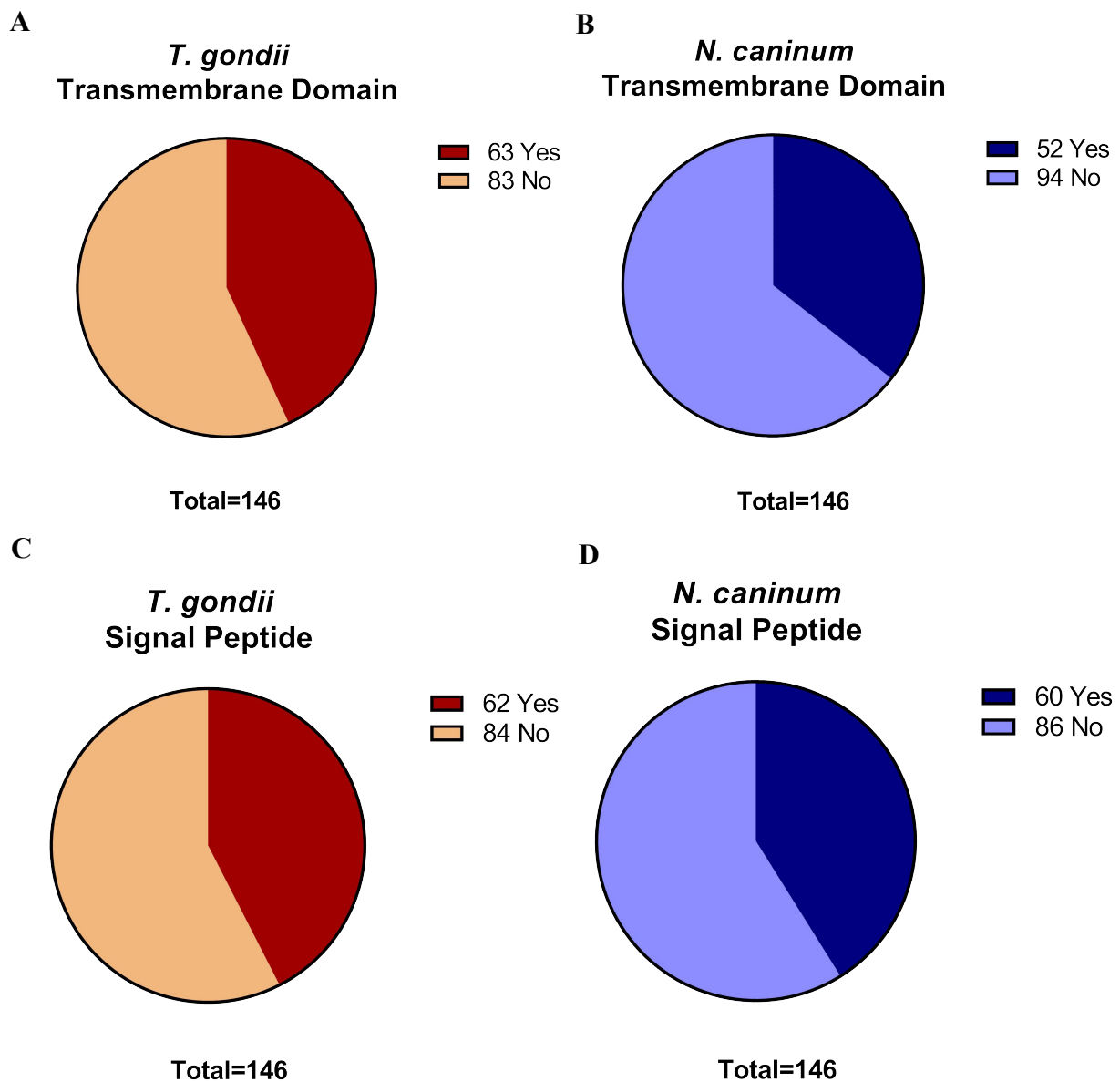
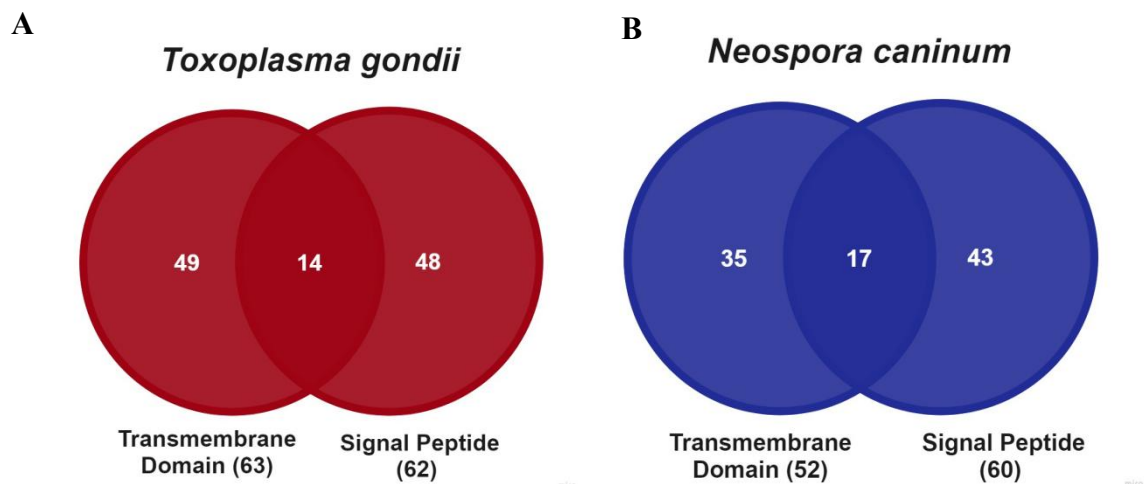


Figura 2: Análise do domínio transmembrana e do peptídeo sinal de TgGRAs e NcGRAs. Análise da presença de domínios transmembrana e peptídeos sinais em 146 TgGRAs e NcGRAs ortólogas, utilizando o algoritmo *Phobius*. (A) Entre as TgGRAs, 63 proteínas foram identificadas com domínios transmembrana. (B)

No conjunto de dados de NcGRAs, 52 proteínas apresentam domínios transmembrana. (C) Peptídeos de sinal foram detectados em 62 TgGRAs (D) e 60 NcGRAs, indicando seu potencial de secreção e envolvimento em interações hospedeiro-parasita.

Para explorar mais essa análise, foi realizada uma investigação para verificar se um subconjunto significativo dessas GRAs tem domínios transmembrana e peptídeos de sinais presentes ao mesmo tempo. A análise no conjunto de dados do *T. gondii* mostrou que um total de 14 TgGRAs exibem a presença de ambos os atributos estruturais, conforme ilustrado na Figura 3A e detalhado na Tabela 1. Uma exploração paralela no conjunto de dados do *N. caninum* revelou que 17 NcGRAs apresentam domínios transmembrana e peptídeos sinais, conforme apresentado na Figura 3B e detalhado na Tabela 2.

Foram investigadas também as convergências e divergências entre os dados obtidos para os dois parasitos, em relação a estes domínios. Essa análise comparativa revelou que apenas 10 GRAs ortólogas e sintênicas compartilham a presença de domínios transmembrana e peptídeos sinais no contexto do *T. gondii* e do *N. caninum*, conforme mostrado na Figura 3C e detalhado na Tabela 3. Essa ocorrência compartilhada de atributos estruturais entre GRAs ortólogas implica um possível papel funcional conservado nos domínios de ambos os parasitos. Além disso, a disparidade observada na prevalência de domínios transmembrana e peptídeos sinalizadores entre as TgGRAs e as NcGRAs sugere possíveis divergências evolutivas que podem ter afetado sua localização subcelular e papéis funcionais em seus hospedeiros.



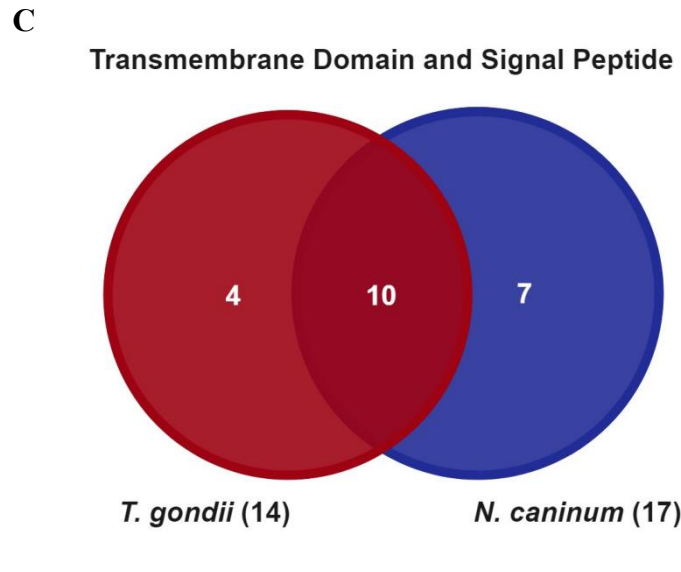


Figura 3: Análise dupla de domínios transmembrana e peptídeos sinais em TgGRAs e NcGRAs. Análise da presença de domínios transmembrana e peptídeos sinais em um subconjunto de GRAs ortólogas de *T. gondii* e *N. caninum*. (A) No conjunto de dados de *T. gondii*, foram identificados 14 TgGRAs com ambos os atributos estruturais. (B) O grupo de dados de *N. caninum* apresentou 17 NcGRAs com domínios transmembrana e peptídeos de sinal. (C) A análise comparativa revelou 10 GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum* que compartilham a presença de ambos os elementos estruturais.

Tabela 1: TgGRAs que apresentam domínios transmembrana e peptídeos sinais. Essa tabela detalha as 14 TgGRAs que possuem domínios transmembrana e peptídeos sinais.

Toxoplasma gondii

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol
TGME49_203310	dense granule protein GRA7	GRA07
TGME49_254720	dense granule protein GRA8	GRA08
TGME49_239740	dense granule protein GRA14	GRA14
TGME49_232000	hypothetical protein	GRA30
TGME49_213067	hypothetical protein	GRA36
TGME49_236870	hypothetical protein	GRA42
TGME49_208370	myosin heavy chain, putative	GRA46

TGME49_200360	hypothetical protein	GRA47
TGME49_204270	hypothetical protein	GRA60
TGME49_202620	hypothetical protein	GRA64
TGME49_273980	hypothetical protein	GRA80
TGME49_201180	hypothetical protein	MSF
TGME49_222370	SAG-related sequence SRS13	SRS13
TGME49_299780	hypothetical protein	#N/A

Tabela 2: NcGRAs que apresentam domínios transmembrana e peptídeos sinais. Essa tabela fornece informações sobre as 17 NcGRAs que exibem domínios transmembrana e peptídeos sinais.

Neospora caninum

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol
NCLIV_045870	dense granule protein GRA3	GRA03
NCLIV_052880	dense granule protein GRA6	GRA06
NCLIV_021640	dense granule protein GRA7	GRA07
NCLIV_008990	dense granule protein GRA8	GRA08
NCLIV_016360	dense granule protein GRA14	GRA14
NCLIV_032000	hypothetical protein	GRA30
NCLIV_037300	hypothetical protein	GRA41
NCLIV_038210	hypothetical protein	GRA47

NCLIV_019080	hypothetical protein	GRA49
NCLIV_022320	hypothetical protein	GRA64
NCLIV_033760	hypothetical protein	GRA80
NCLIV_023220	hypothetical protein	MSF
NCLIV_008760	hypothetical protein	MYR1
NCLIV_005760	SAG-related sequence SRS13	SRS13
NCLIV_028060	hypothetical protein	TgPI-2
NCLIV_060500	hypothetical protein	#N/A
NCLIV_047520	hypothetical protein	#N/A

Tabela 3: GRAs ortólogas com domínios transmembrana e peptídeos sinais compartilhados. Essa tabela detalha as 10 GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum* que compartilham a presença de domínios transmembrana e peptídeos de sinal.

Toxoplasma gondii* & *Neospora caninum

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
TGME49_203310	dense granule protein GRA7	GRA07	NCLIV_021640
TGME49_254720	dense granule protein GRA8	GRA08	NCLIV_008990
TGME49_239740	dense granule protein GRA14	GRA14	NCLIV_016360
TGME49_232000	hypothetical protein	GRA30	NCLIV_032000
TGME49_200360	hypothetical protein	GRA47	NCLIV_038210
TGME49_202620	hypothetical protein	GRA64	NCLIV_022320

TGME49_273980	hypothetical protein	GRA80	NCLIV_033760
TGME49_201180	hypothetical protein	MSF	NCLIV_023220
TGME49_222370	SAG-related sequence SRS13	SRS13	NCLIV_005760
TGME49_299780	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_060500

5.3 Outros domínios conservados em TgGRAs e NcGRAs: Uma análise comparativa

A análise de outros domínios conservados dentro do conjunto de dados de TgGRAs e NcGRAs forneceu uma visão das características estruturais compartilhadas. Esses domínios conservados desempenham um papel crucial no repertório funcional dessas proteínas e contribuem para a compreensão de suas possíveis funções na biologia parasitária.

Essa análise revelou que uma parte substancial das GRAs analisadas, aproximadamente 85 no total, possuem domínios conservados adicionais além dos domínios transmembrana e peptídeos sinais. Esses domínios conservados são indicativos de elementos funcionais compartilhados entre as TgGRAs e NcGRAs, sugerindo mecanismos e funções comuns nesses organismos parasitas.

O mais proeminente entre esses domínios conservados é a Superfamília da Proteína Quinase C (PKC), que é preservada em 9 subconjuntos ortólogos de TgGRAs e NcGRAs (Tabela 4). A alta prevalência desse domínio sugere sua importância na funcionalidade central desses GRAs. Em seguida, vem a Superfamília de Manutenção Estrutural de Cromossomos (SMC), conservada em 7 subconjuntos ortólogos de TgGRAs e NcGRAs (Tabela 5). Esse domínio também é conservado em um membro das TgGRAs e em outro membro das NcGRAs. A superfamília do domínio SAG1-Related Sequences (SRS) (Tabela 6) também é um domínio conservado, preservado em 3 subconjuntos ortólogos de ambas as GRAs.

O domínio da Proteína de Grande Tegumento é outra característica conservada encontrada nessas GRAs. Ele é preservado em 2 membros ortólogos de ambas as GRAs, 4 subconjuntos de NcGRAs e 3 subgrupos de TgGRAs (Tabela 7). A superfamília de Proteína Fosfatase dependente de Metal (PPM) é preservada em 4 subconjuntos ortólogos de TgGRAs

e NcGRAs (Tabela 8). Outro domínio conservado significativo é a superfamília DWNN/RING Finger/ZINC Finger, que é preservada em 2 subconjuntos ortólogos de ambas as GRAs e conservada em 1 subconjunto de NcGRAs (Tabela 9). Além disso, observou-se que várias outras TgGRAs e NcGRAs contêm domínios conservados adicionais. Estes domínios podem ser a chave para a compreensão da multifuncionalidade e adaptabilidade destes parasitos.

Tabela 4: Distribuição do domínio da superfamília PKc em TgGRAs e NcGRAs. Essa tabela descreve a presença do domínio da superfamília PKc em 9 subconjuntos de TgGRAs e NcGRAs.

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
TGME49_253330	Rhoptry kinase family protein, truncated (incomplete catalytic triad)	BPK1	NCLIV_007770
TGME49_233010	cell-cycle-associated protein kinase ERK7, putative	ERK7	NCLIV_032840
TGME49_202780	rhoptry kinase family protein ROP25	ROP25	NCLIV_022130
TGME49_270920	rhoptry kinase family protein ROP32	ROP32	NCLIV_035860
TGME49_201130	rhoptry kinase family protein ROP33	ROP33	NCLIV_023260
TGME49_240090	rhoptry kinase family protein ROP34, putative	ROP34/WNG2	NCLIV_000650
TGME49_304740	rhoptry kinase family protein ROP35	ROP35/WNG1	NCLIV_044410
TGME49_281675	protein kinase, putative	ROP45	NCLIV_023580
TGME49_320630	phosphotransferase enzyme family protein	#N/A	NCLIV_009640

Tabela 5: Distribuição do domínio da superfamília SMC em TgGRAs e NcGRAs. A tabela mostra a distribuição do domínio da superfamília SMC em 7 subconjuntos de TgGRAs e NcGRAs, bem como em membros individuais de ambos os parasitas.

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
TGME49_200010	hypothetical protein	GRA20	NCLIV_062680
TGME49_269690	hypothetical protein	GRA29	NCLIV_036830
TGME49_212300	hypothetical protein	GRA32	NCLIV_049090
TGME49_208370	myosin heavy chain, putative	GRA46	NCLIV_003050
TGME49_249990	hypothetical protein	GRA70	NCLIV_066100
TGME49_289540	hypothetical protein	SFP1	NCLIV_041790
TGME49_247050	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_063720
	hypothetical protein	GRA71	NCLIV_069130
TGME49_266410	hypothetical protein	#N/A	

Tabela 6: Distribuição da superfamília do domínio SRS em TgGRAs e NcGRAs.

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
TGME49_222370	SAG-related sequence SRS13	SRS13	NCLIV_005760
TGME49_234370	SAG-related sequence SRS42	SRS42	NCLIV_049510
TGME49_264660	SAG-related sequence SRS44	SRS44/CST1	NCLIV_040495

Tabela 7: Distribuição do domínio da proteína de tegumento grande em TgGRAs e NcGRAs. A tabela destaca a distribuição do domínio da proteína do tegumento grande em 2 membros de ambas as GRAs, 4 subconjuntos de NcGRAs e 3 subgrupos de TgGRAs.

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
	dense granule protein GRA8	GRA08	NCLIV_008990
	hypothetical protein	GRA18	NCLIV_041250
TGME49_209755	hypothetical protein	MAG2	
TGME49_304955	serine/threonine specific protein phosphatase	PPM11C	
TGME49_222370	SAG-related sequence SRS13	SRS13	NCLIV_005760
TGME49_247050	hypothetical protein	#N/A	
	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_023780
	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_015040
TGME49_314265	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_057340

Tabela 8: Distribuição da superfamília do domínio semelhante à fosfatase do tipo PPM em TgGRAs e NcGRAs.

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
TGME49_304955	serine/threonine specific protein phosphatase	PPM11C	NCLIV_001230
TGME49_237500	protein phosphatase 2C domain-containing protein	PPM3A	NCLIV_051240
TGME49_202610	protein phosphatase 2C domain-containing protein	PPM3D	NCLIV_022340
TGME49_270320	protein phosphatase 2C domain-containing protein	PPMC3	NCLIV_036340

Tabela 9: Distribuição do domínio da superfamília DWNN/RING Finger/ZINC Finger em TgGRAs e NcGRAs. A tabela detalha a distribuição do domínio da superfamília DWNN/RING Finger/ZINC Finger em dois subconjuntos de ambas as GRAs e um subconjunto de NcGRAs.

Gene Identity	Product Description	Gene Symbol	Nc Ortholog
TGME49_268900	dense granular protein GRA10	GRA10	NCLIV_037450
TGME49_304720	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_044430
	hypothetical protein	#N/A	NCLIV_030320

5.4 Análise estrutural 3D de GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum*

A utilização do algoritmo *AlphaFold2* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) possibilitou a predição de 129 estruturas 3D de GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum* (Fig. 4A). Esse desenvolvimento na predição estrutural oferece informações valiosas sobre a arquitetura molecular dessas proteínas essenciais. Para avaliar a confiabilidade das estruturas 3D previstas, o *AlphaFold2* forneceu pontuações de confiabilidade (C-Scores). Foram 5 pontuações variando de "Muito alta" a "Muito baixa"; 8 pontuações de 'muito alta', 35 de 'alta', 27 de 'média', 30 de 'baixa', e 29 de 'muito baixa'. (Fig. 4B). Essas pontuações servem como indicadores dos níveis de confiança associados a cada estrutura prevista, essenciais para garantir a precisão e a utilidade dos modelos resultantes.

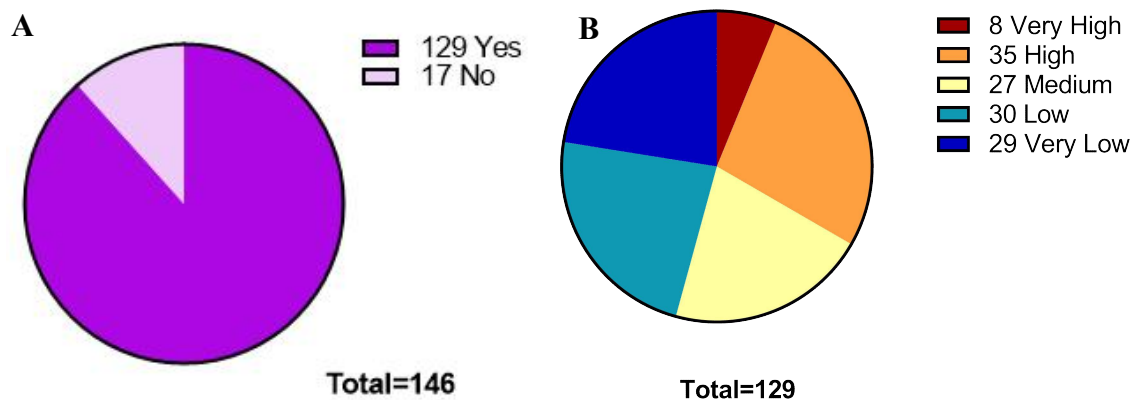


Figura 4: Predição de estruturas 3D e pontuações de confiabilidade de GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum*. (A) Utilizando o algoritmo AlphaFold2, foram preditas 129 estruturas 3D de GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum*. (B) Para avaliar a confiabilidade das estruturas 3D preditas, o AlphaFold2 atribuiu pontuações de confiabilidade (C-Scores) que variam de 'Muito alta' (Very High) a 'Muito baixa' (Very Low).

A análise subsequente dessas estruturas 3D foi realizada com o auxílio do *PyMol* e do *FATCAT*. Essa análise facilitou a identificação de diferenças, semelhanças e instâncias de conservação, perda ou ganho de domínio dentro das estruturas preditas. Essas ferramentas analíticas também forneceram as pontuações de RMSD, a torção da proteína e o valor p (p-Value) da comparação, ajudando mais na interpretação dos resultados. A Figura 5 e 6 ilustra que certas proteínas ortólogas de grânulos densos (GRAs) apresentam divergências estruturais evidentes. Essa observação é exemplificada pelas características estruturais contrastantes de Tg&NcGRA4 e Tg&NcMYR2. Entretanto, é igualmente evidente que também podem existir semelhanças estruturais próximas entre essas GRAs. Uma exemplificação dessa semelhança é vista no alinhamento estrutural entre TgCyclophilin e NcCyclophilin, bem como entre TGME49_215160 e NCLIV_052150, conforme mostrado na Figura 7 e 8.

A utilização da análise estrutural em 3D também oferece um caminho para reconhecer que nem todos os domínios são preservados universalmente, conforme abordado anteriormente. Um exemplo ilustrativo é apresentado na Figura 9, onde uma perda visível do domínio transmembrana é evidente no NcGRA17, apesar de sua presença no TgGRA17. Por outro lado, a Figura 10 ilustra o ganho desse mesmo domínio no NcGRA12B. A estrutura 3D revela ainda mais as diferenças na presença do peptídeo sinal. Como demonstrado na Figura 11, há uma perda observada do peptídeo sinal no NcGRA46, acompanhada por sua aquisição no NcGRA49 (12). A Figura 12 demonstra a preservação da superfamília PKc em TgBPK1 e NcBPK1. Em contrapartida, determinados domínios são exclusivos de uma das GRAs ortólogas. Conforme mostrado na Figura 14, a superfamília SMC está presente de forma distinta no TGME49_266410, enquanto a Figura 15 destaca a presença exclusiva da proteína de tegumento grande no NcGRA8. Essas distinções e semelhanças estruturais, conforme observadas por meio da análise 3D, fornecem informações importantes sobre a diversidade funcional e as semelhanças entre essas GRAs.

5

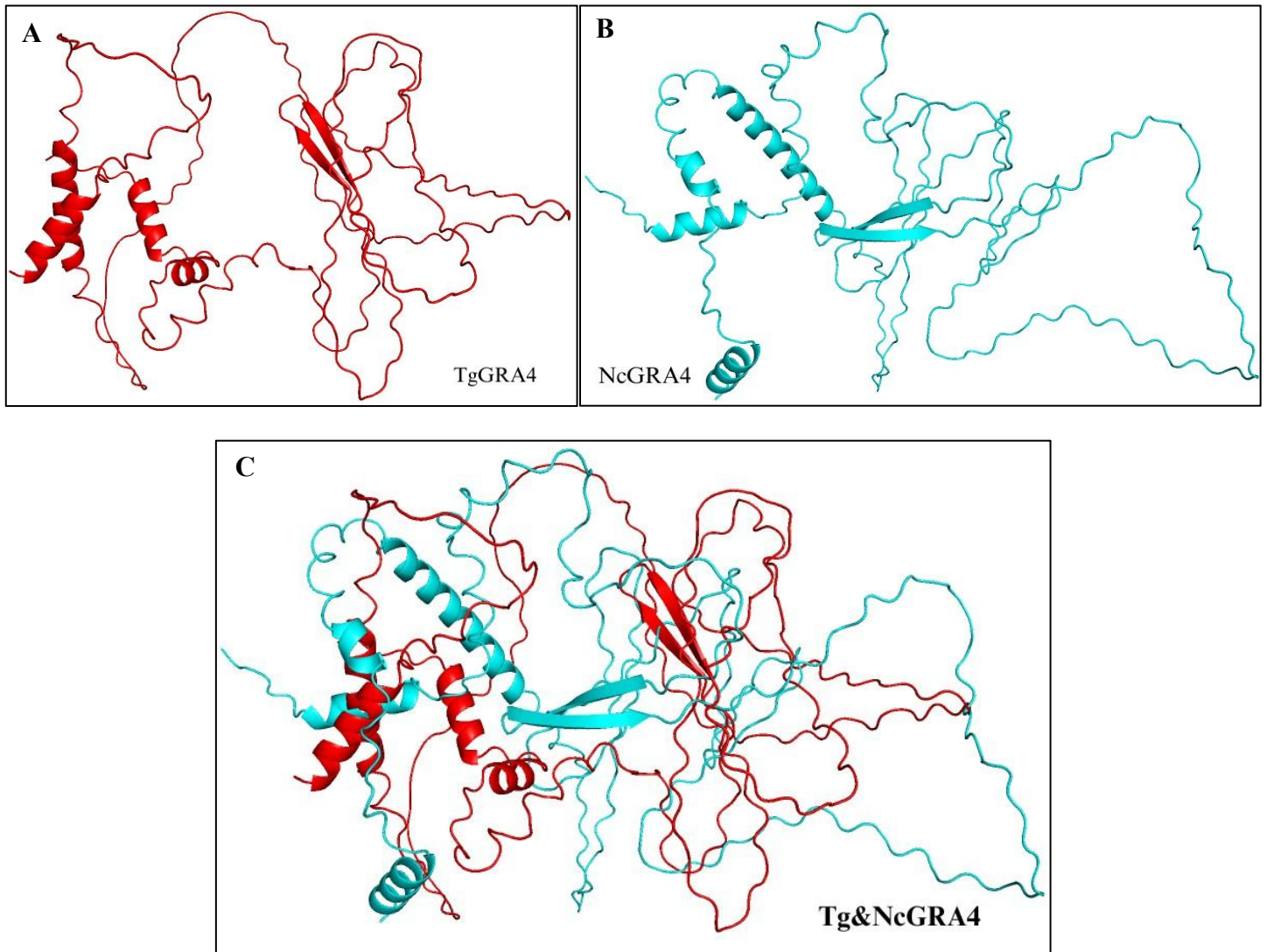


Figura 5: Demonstração de divergências estruturais significativas entre determinadas GRAs ortólogas, mostradas pelo contraste entre (A)TgGRA4 e (B) NcGRA4. (C) Alinhamento de A e B.

6

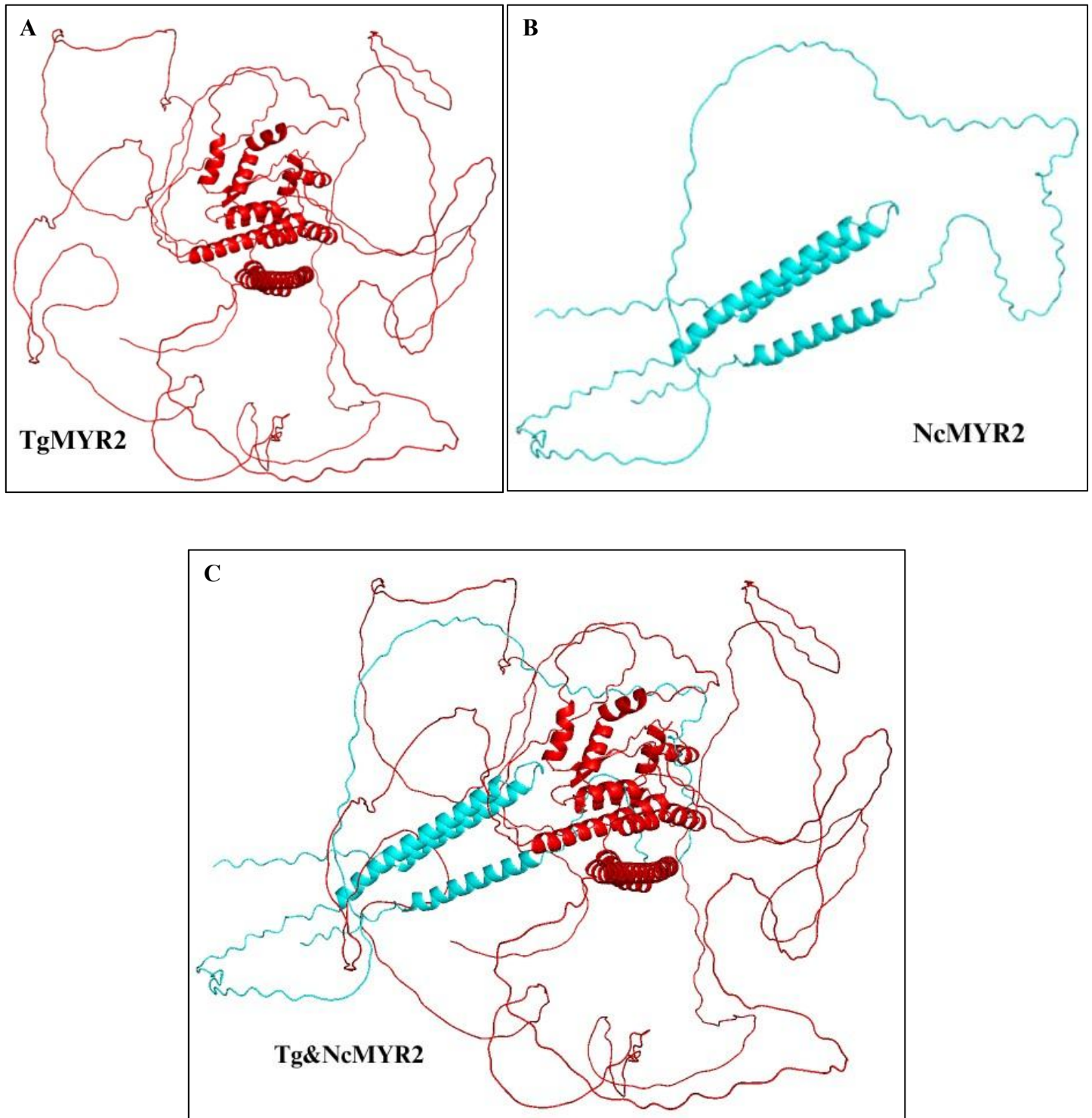


Figura 6: Demonstração de divergências estruturais significativas entre determinadas GRAs ortólogas, mostradas pelo contraste entre (A) TgMYR2 e (B) NcMYR2. (C) Alinhamento de A e B.

7

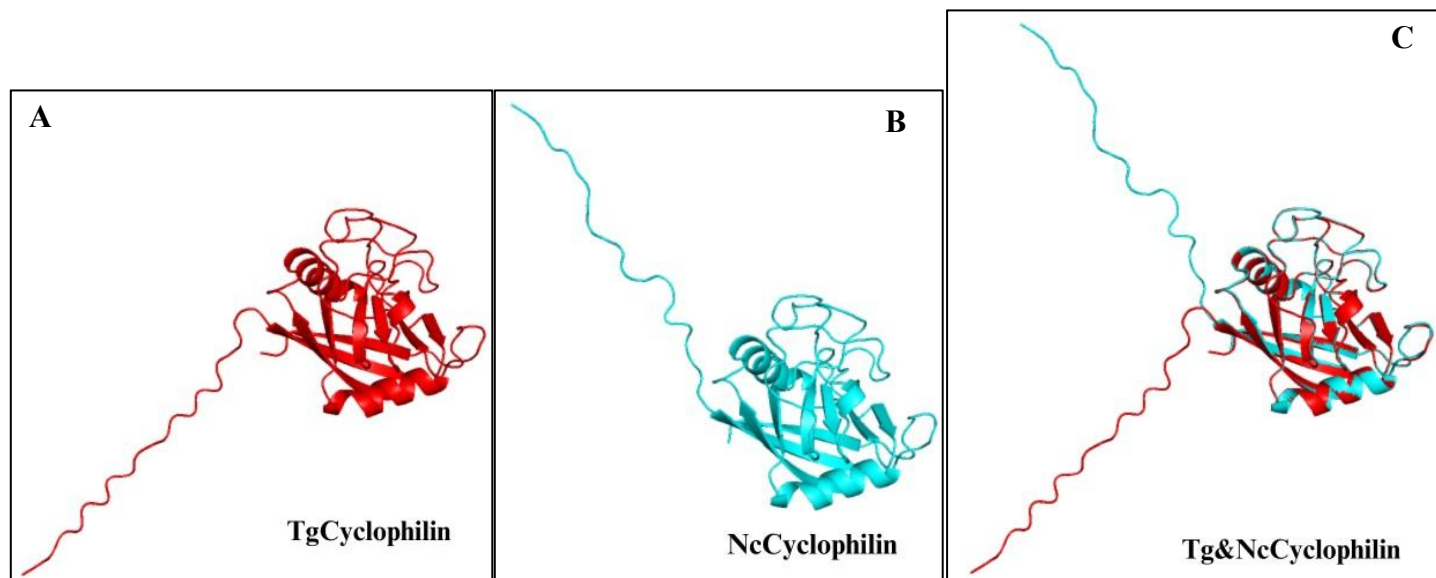


Figura 7: Ilustração de semelhanças estruturais próximas no alinhamento estrutural entre (A) TgCyclophilin e (B) NcCyclophilin. (C) Alinhamento de A e B.

8

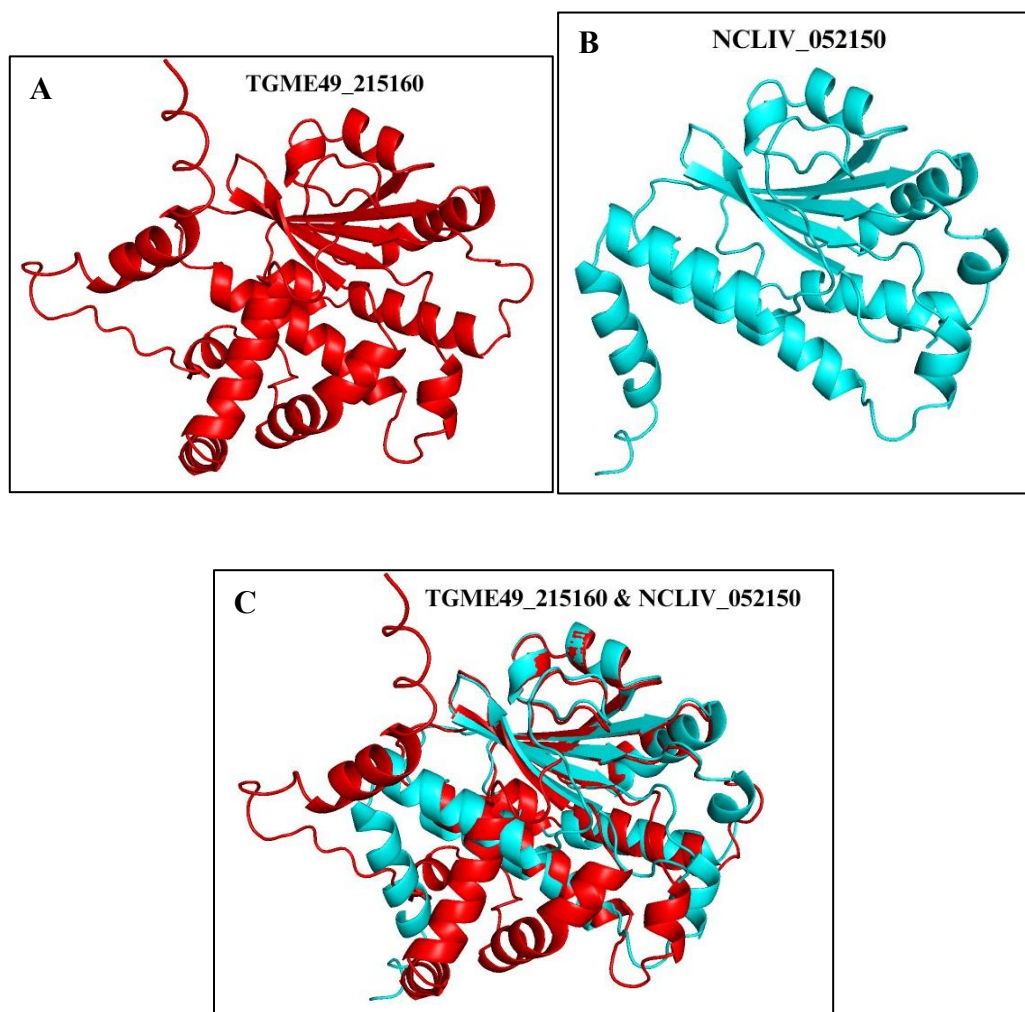


Figura 8: Ilustração de semelhanças estruturais próximas no alinhamento estrutural entre (A) TGME49_215160 e (B) NCLIV_052150. (C) Alinhamento de A e B.

9

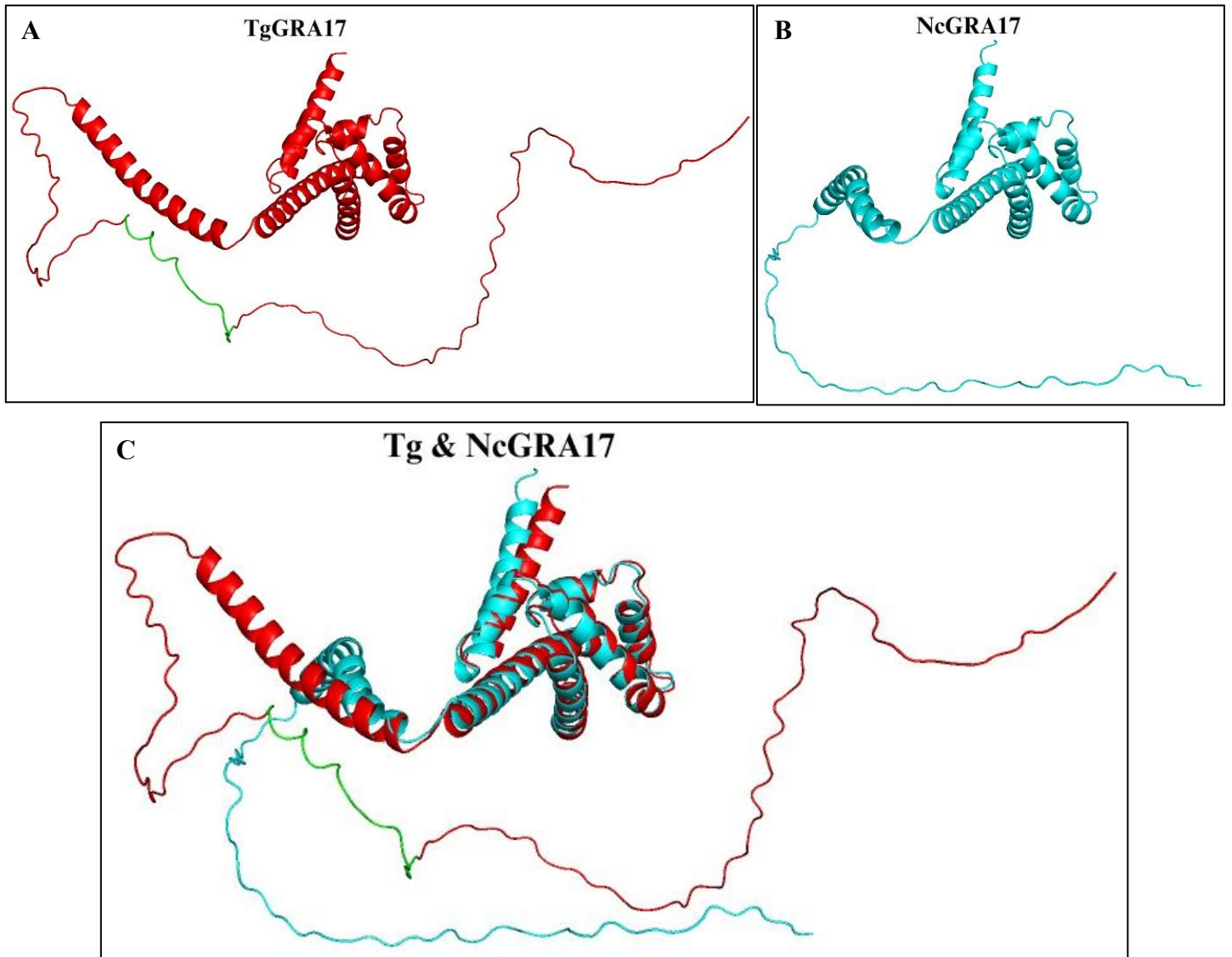


Figura 9: Perda visível do domínio transmembrana no (B) NcGRA17, apesar de sua presença no (A) TgGRA17 (parte em verde). (C) Alinhamento de A e B.

10

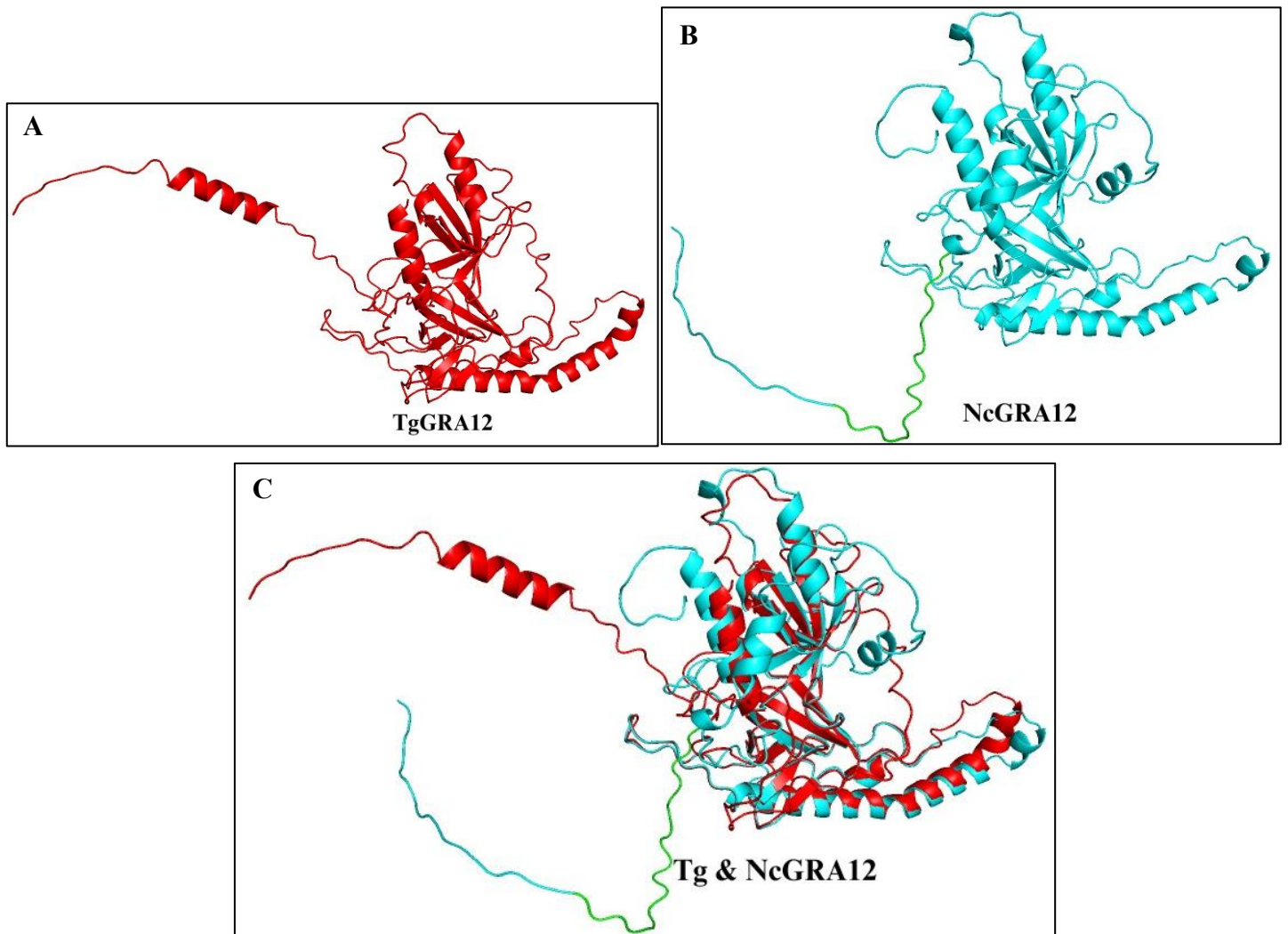


Figura 10: Ganho do domínio transmembrana no (B) NcGRA12B (parte em verde). (C) Alinhamento de A (TgGRA12B) e B (NcGRA12B).

11

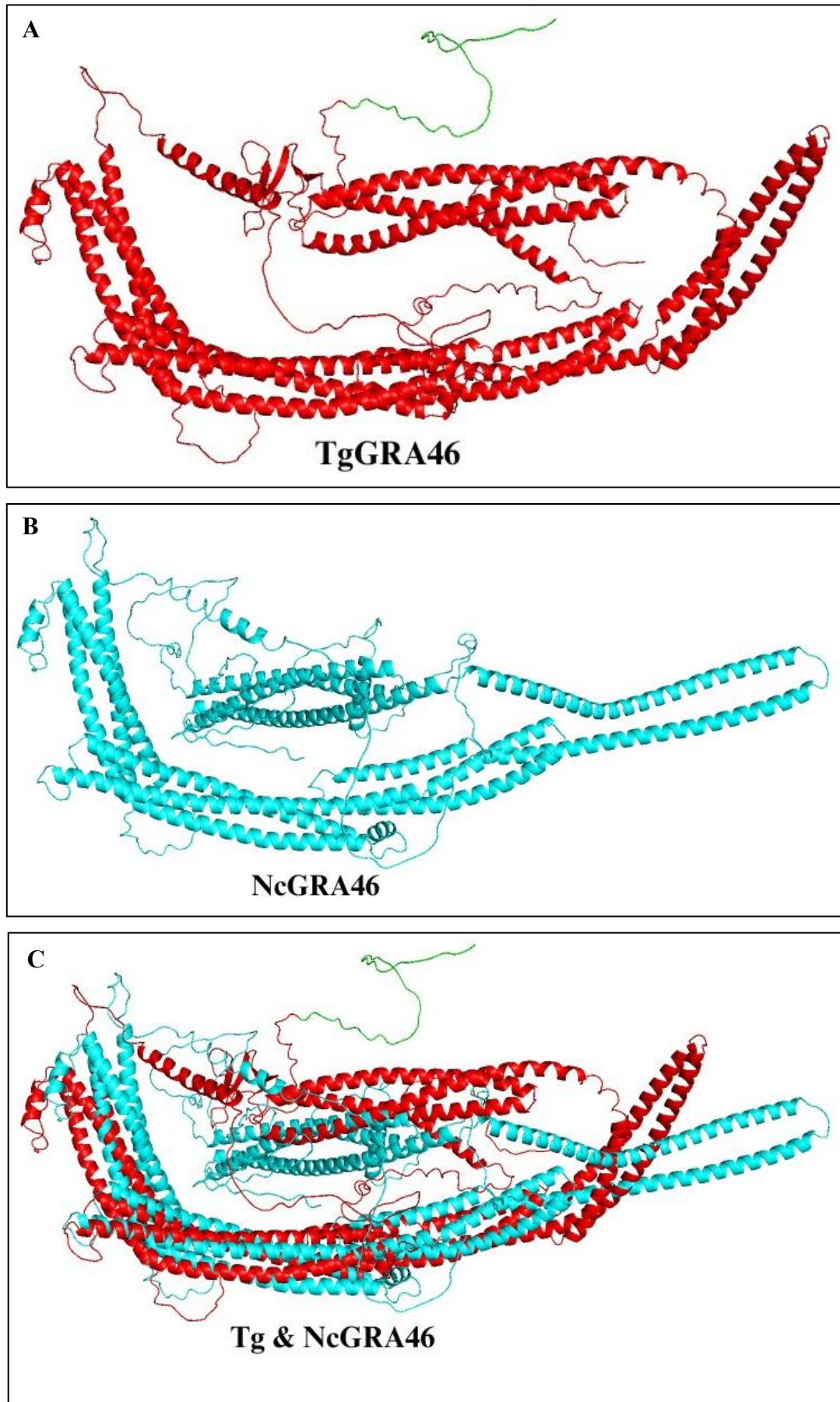


Figura 11: Perda do peptídeo sinal no (B) NcGRA46 (parte em verde).

12

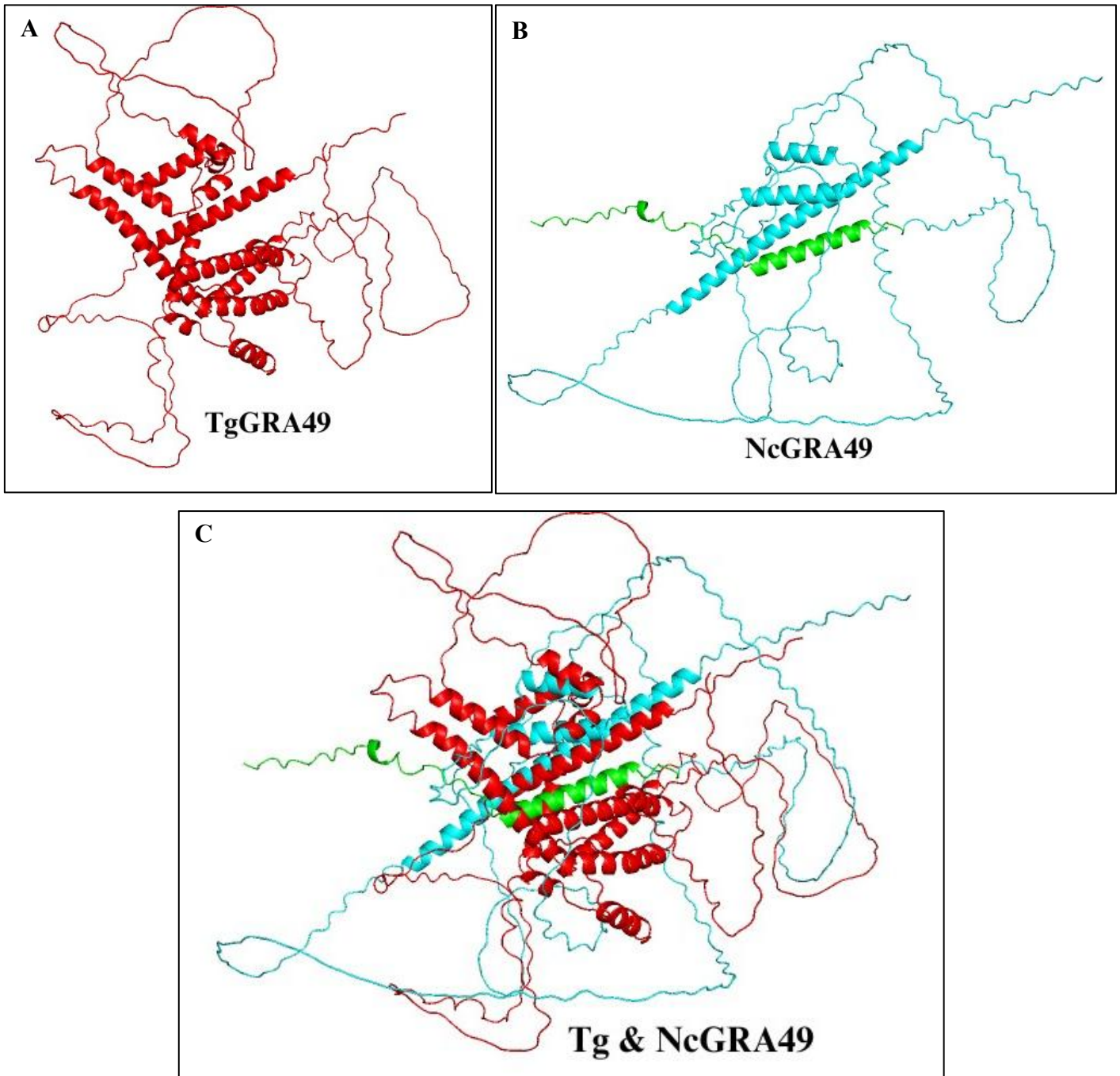


Figura 12: Aquisição do peptídeo sinal no (B) NcGRA49 (parte em verde).(C) Alinhamento de A (TgGRA49) e B (NcGRA49).

13

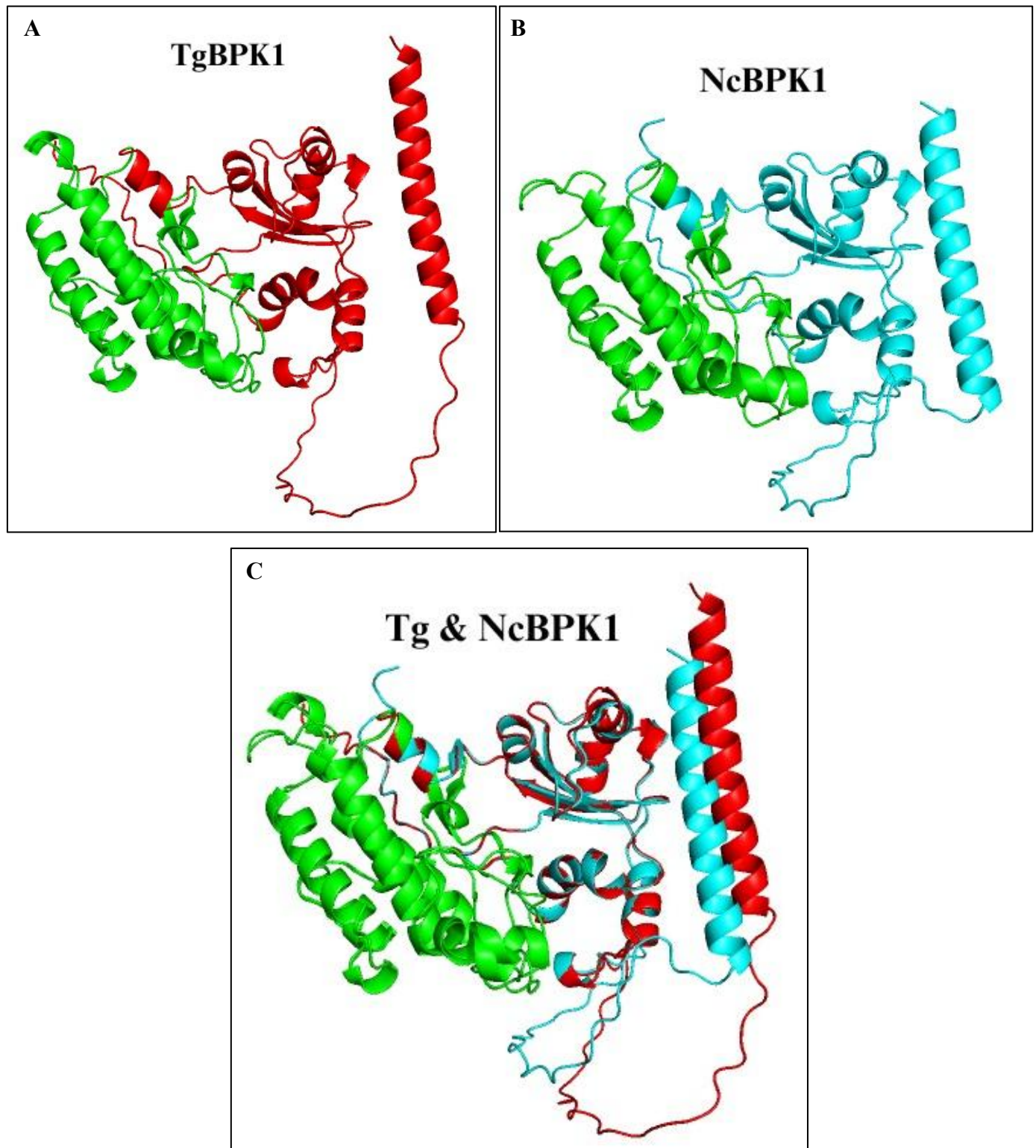


Figura 13: A preservação da superfamília PKc em (A)TgBPK1 e (B) NcBPK1 (parte em verde). (C) Alinhamento de A e B.

14

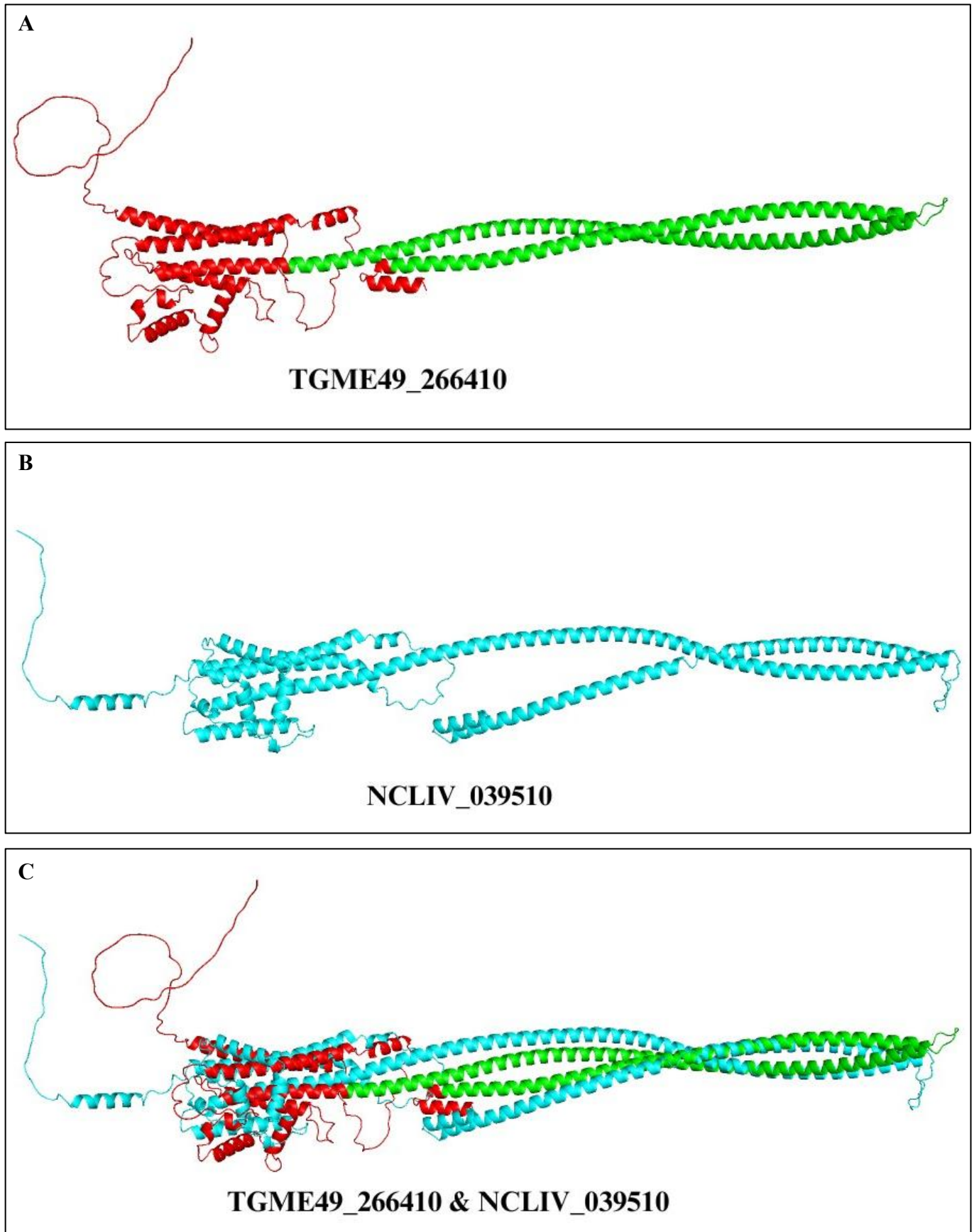


Figura 5H: Presença distinta da superfamília SMC em (A) TGME49_266410 (parte em verde). (C) Alinhamento de A (TGME49_266410) e B (NCLIV_039510).

15

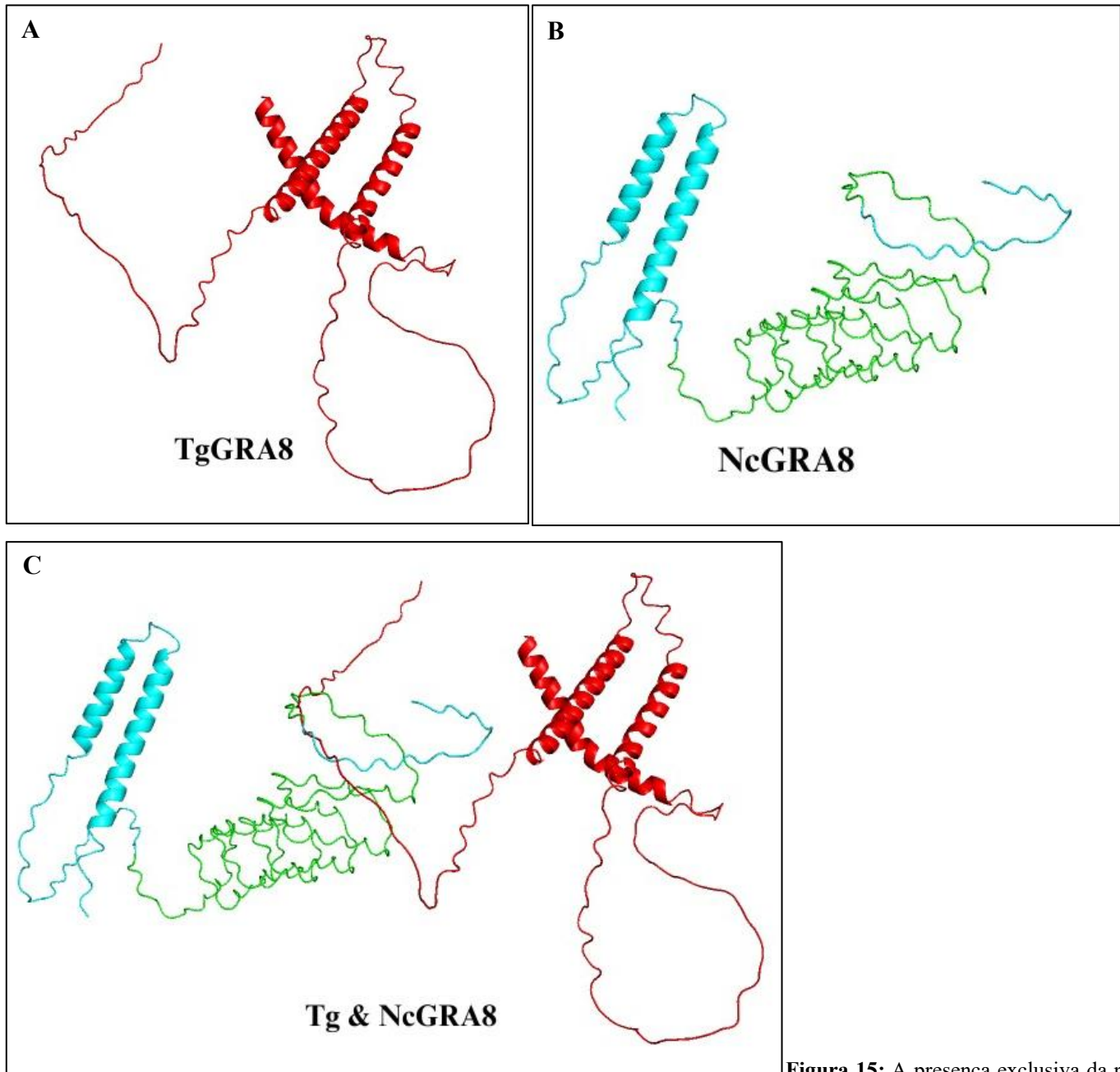


Figura 15: A presença exclusiva da proteína de tegumento grande no (B) NcGRA8 (parte em verde). (C) Alinhamento de A (TgGRA8) e B (NcGRA8).

Figura 5 - 15: Análise estrutural comparativa em 3D de proteínas ortólogas de grânulos densos (GRAs) em *T. gondii* e *N. caninum*. (5&6) As divergências estruturais são evidentes em certas GRAs ortólogas, ilustradas pelas diferenças entre Tg&NcGRA4 (5) e Tg&NcMYR2 (6). (7&8) São observadas semelhanças estruturais muito próximas, como mostrado no alinhamento entre TgCyclophilin e NcCyclophilin (7), e entre TGME49_215160 e NCLIV_052150 (8). (9) A perda visível do domínio transmembrana é evidente em NcGRA17, apesar de sua presença em TgGRA17, conforme mostrado na Figura, enquanto (10) NcGRA12B ganhou esse mesmo domínio. (11) As diferenças na presença do peptídeo sinal são evidentes, com a perda no NcGRA46 e (12) sua aquisição no NcGRA49. (13) A preservação da superfamília PKc é demonstrada em TgBPK1 e NcBPK1. (14) A superfamília SMC está presente de forma distinta em TGME49_266410 e (15) Presença exclusiva da proteína de tegumento grande em NcGRA8.

6 DISCUSSÃO

T. gondii e *N. caninum* são dois parasitos intimamente relacionados que pertencem ao filo Apicomplexan. Eles compartilham várias características e proteínas comuns devido à sua relação evolutiva (Dubey *et al.*, 2017). Nessa análise abrangente, foram exploradas as características das proteínas de grânulos densos de *T. gondii* (TgGRAs) e das proteínas de grânulos densos de *N. caninum* (NcGRAs), com foco em ortologia, sintenia, identidade proteica, domínios transmembrana, peptídeos sinais e domínios conservados. Essa análise esclarece as semelhanças e diferenças entre esses dois parasitos e fornece informações sobre suas possíveis funções e história evolutiva.

A análise das TgGRAs realizada neste estudo, que incorporou dados de diversas fontes acadêmicas e bancos de dados de acesso livre, resultou na identificação de um total de 185 TgGRAs. Essa lista de TgGRAs representa uma compilação significativa de membros conhecidos e preditos dessa família de proteínas, servindo como um recurso valioso para compreender o aspecto molecular dessas proteínas essenciais no contexto do *T. gondii* e para servir como modelo para descobrir novas NcGRAs (Szabo; Finney, 2017; Dong *et al.*, 2021). A aplicação subsequente de técnicas de agrupamento ortólogo e sintênico a esse conjunto de TgGRAs produziu resultados promissores. Especificamente, a análise revelou a presença de 146 proteínas que exibiram uma relação ortóloga e sintênica em *N. caninum*. Essa descoberta sugere um grau de conservação e ancestralidade compartilhada nas proteínas correspondentes entre *T. gondii* e *N. caninum*, apesar de suas funções e interações distintas em suas respectivas células hospedeiras, o que está de acordo com outros estudos anteriores (Reid *et al.*, 2012; Berná *et al.*, 2021). A presença de tais proteínas ortólogas e sintênicas ressalta a possível relevância funcional desses elementos compartilhados em ambos os parasitos.

Os resultados da análise de alinhamento do *Clustal Omega* nesse estudo revelaram que as identidades proteicas das TgGRAs e das NcGRAs não são totalmente preservadas. Essa observação ressalta a importância de compreender a extensão da conservação dessas proteínas essenciais, esclarecendo as possíveis variações e adaptações funcionais (Peterson *et al.*, 2009). As porcentagens de identidade apresentaram um amplo espectro, variando de 20% a 100%. Destaca-se que a faixa de identidade mais predominante ficou entre 61 e 70%, uma faixa visualmente representada na Figura 1 e que abrange uma proporção significativa das sequências alinhadas.

Dentro desse intervalo de identidades, é fundamental destacar a presença de proteínas GRA específicas, incluindo CST4 (61,90%), CST9 (63,01%) e GRA12A (65,25%), que

foram identificadas dentro do intervalo de identidade definido. Essas GRAs são conhecidas por sua importância funcional, e sua retenção dentro desse intervalo de identidade pode ter implicações funcionais (Guevara; Fox; Bzik, 2021; Tu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2021). A menor identidade observada no GRA3 (27,66%) está de acordo com os estudos existentes que destacam o GRA3 como uma proteína altamente variável (Ravindran; Boothroyd, 2008). Em contrapartida, a GRA predita, TGME49_272350 / NCLIV_034950, destaca-se com uma identidade alta de 95,29%.

Comparando esses resultados com pesquisas anteriores, os estudos destacaram o significado da variação da identidade das GRAs, enfatizando a importância dessas proteínas nas interações entre hospedeiro e parasito (Nishikawa *et al.*, 2018; Yue *et al.*, 2021). As pesquisas de Obed *et al.* (2022) e Mani *et al.* (2023) observaram a função crítica do GRA3 na modulação da transcrição da célula hospedeira, esclarecendo as possíveis implicações funcionais da baixa identidade observada. Esses resultados reforçam coletivamente a ideia de que, embora essas proteínas sejam ortólogas e compartilhem semelhanças, existem variações que podem estar ligadas a diferenças nas preferências do hospedeiro e nas estratégias patogênicas.

A exploração de domínios transmembrana e peptídeos sinais nesse conjunto de dados de TgGRAs e NcGRAs utilizando três algoritmos (*ToxoDB*, *TMHMM 2.0* e *Phobius*) forneceu informações importantes sobre os atributos estruturais dessas proteínas essenciais. Essas descobertas não apenas melhoram a compreensão dessas características estruturais, mas também abrem caminho para um entendimento mais amplo de suas possíveis funções na biologia parasitária. Os resultados destacados nesta análise são exclusivamente do algoritmo *Phobius* devido à sua alta confiabilidade e precisão (Käll; Krogh; Sonnhammer, 2004).

Esse estudo revelou diferenças significativas na presença de domínios transmembrana entre TgGRAs e NcGRAs. Especificamente, entre as 146 TgGRAs examinadas, apenas 63 exibem domínios transmembrana, enquanto no caso das NcGRAs, 52 possuem essa característica estrutural. Vale ressaltar que essas disparidades estruturais se somam ao crescente conjunto de evidências que indicam os diversos estratégias utilizadas por organismos parasitas para garantir sua sobrevivência e propagação em ambientes complexos de hospedeiros (David Sibley, 2011; Al-Bajalan *et al.*, 2017). Os resultados obtidos desse estudo estão alinhados com estudos anteriores que também destacaram essas variações nos domínios transmembrana entre proteínas relacionadas em organismos parasitas, enfatizando a plasticidade e a adaptabilidade desses patógenos (Sharpe; Stevens; Munro, 2010; Dubey *et al.*, 2017). Além disso, os peptídeos sinais são detectados em 62 TgGRAs e 60 NcGRAs. Essas

descobertas estão de acordo com pesquisas anteriores que enfatizaram a importância desses atributos estruturais na localização subcelular e nas funções das proteínas parasitárias (Bradley; Sibley, 2007; Fereig, Ragab M.; Nishikawa, 2020). A variação observada entre as duas espécies levanta questões sobre as distinções em sua localização subcelular e funções funcionais (Seliverstov *et al.*, 2015).

Análise mais avançada mostra que apenas 10 GRAs ortólogas compartilham essa conjunção de domínios transmembrana e peptídeos sinais. Embora alguns estudos mostram que as GRAs possuem domínios transmembrana e peptídeos sinais (Mercier *et al.*, 2005), a identificação desses domínios só em poucos subconjuntos de TgGRAs e NcGRAs destaca a heterogeneidade estrutural dentro dessas famílias de proteínas e sugere sua diversidade funcional. Essas descobertas oferecem informações importantes sobre os mecanismos pelos quais essas proteínas são direcionadas a locais celulares específicos e as possíveis funções que desempenham na interface hospedeiro-parasita. São necessárias mais pesquisas para compreender o significado funcional dessas características estruturais e suas implicações para a patogênese do *T. gondii* e do *N. caninum*.

A análise dos outros domínios conservados em TgGRAs e NcGRAs destaca as características estruturais compartilhadas entre essas proteínas. A presença de outros domínios conservados em aproximadamente 85 GRAs ressalta a semelhança em seus elementos funcionais. A prevalência da superfamília da Proteína Quinase C (PKC) sugere sua importância no papel funcional dessas proteínas, possivelmente implicando papéis na transdução e regulação de sinais mediados por quinase. A PKC também desempenha uma função importante na regulação da proliferação celular. Certas isoformas de PKC estão envolvidas na manutenção das células, enquanto outras induzem a morte celular (Lim; Sutton; Rao, 2015; Okat, 2018).

A presença de domínios compartilhados, como a Superfamília de Manutenção Estrutural de Cromossomos (SMC), indica que determinadas características estruturais são mantidas em subconjuntos de TgGRAs e NcGRAs. As proteínas SMC são essenciais para a organização e segregação dos cromossomos, e sua conservação nessas proteínas parasitárias implica um papel funcional na divisão celular ou na organização da cromatina, que pode desempenhar um papel crucial na manutenção da integridade desses genomas parasitários (Francia *et al.*, 2020). O domínio da sequência relacionada a SAG1 (SRS) é conhecido por sua função na mediação de interações entre proteínas de superfície e receptores do hospedeiro, contribuindo assim para os processos de adesão e invasão do parasita. Os domínios SRS conservados em TgGRAs e NcGRAs provavelmente têm implicações para suas interações parasita-hospedeiro,

alinhando-se com os resultados de outros estudos (Jung; Lee; Grigg, 2004; Theisen; Boothroyd, 2022). A presença de domínios da proteína de tegumento grande sugere seu possível envolvimento em funções associadas à membrana e interações com células hospedeiras. Essas proteínas também foram vistas como proteínas virais multifuncionais que desempenham papéis cruciais no ciclo de vida do herpesvírus, contribuindo para a montagem, replicação e disseminação do vírus e, ao mesmo tempo, ajudando o vírus a evitar as respostas imunológicas do hospedeiro (Gastaldello *et al.*, 2013; Xu; Che; Li, 2016). A superfamília de Proteína Fosfatase dependente de Metal (PPM) foi preservada em 4 subconjuntos de TgGRAs e NcGRAs. Esse domínio desempenha uma função na regulação do metabolismo do fosfato e na transdução de sinais, ressaltando sua importância no repertório funcional dessas GRAs (Gao; Cao; Wang, 2021). A superfamília DWNN/RING Finger/ZINC Finger foi conservada em 2 subconjuntos de ambos os GRAs e em 1 subconjunto de NcGRAs. Essa superfamília de domínios foi associada a interações proteína-proteína e atividade de ubiquitina ligase, sugerindo sua possível função na degradação de proteínas e evasão imunológica do hospedeiro (Pugh *et al.*, 2006). A presença de elementos estruturais e funcionais conservados nessas proteínas ortólogas é indicativa de mecanismos compartilhados essenciais para a sobrevivência do parasita. Os domínios conservados identificados nessa análise servem como alvos importantes para pesquisas futuras a fim de compreender os mecanismos moleculares que fundamentam a complexa biologia desses parasitos.

O uso de algoritmo *AlphaFold2*, em combinação com a análise estrutural subsequente, forneceu uma perspectiva detalhada sobre as estruturas 3D de GRAs ortólogas em *T. gondii* e *N. caninum*. O uso desse algoritmo é particularmente significativo, pois as metodologias anteriores para a construção de estruturas tridimensionais dependiam muito dos dados derivados da cristalografia de raios X, uma técnica bem estabelecida. No entanto, esse método é prejudicado por uma desvantagem substancial: sua natureza demorada e uma vulnerabilidade inerente à produção de resultados estruturalmente não confiáveis (Macêdo *et al.*, 2013).

O algoritmo *AlphaFold2* produziu 129 estruturas 3D previstas de GRAs ortólogos em *T. gondii* e *N. caninum* (Fig. 4A). Para garantir a confiabilidade dessas estruturas, o *AlphaFold2* forneceu pontuações de confiabilidade (C-Scores) com um intervalo de "Muito alto" a "Muito baixo" (Fig. 4B). Essas pontuações servem como indicadores críticos dos níveis de confiança associados a cada estrutura predita, essenciais para manter a precisão e a utilidade dos modelos resultantes. Em comparação com pesquisas anteriores usando o *AlphaFold2* (Jumper

et al., 2021), a inclusão dessas pontuações de confiabilidade aumenta a credibilidade dos resultados e garante a eficácia dos modelos estruturais.

A análise estrutural subsequente, realizada por meio do *PyMol* e do *FATCAT*, revelou a presença de variações estruturais e semelhanças entre as GRAs ortólogas, oferecendo uma percepção mais profunda de suas características moleculares. Essas ferramentas analíticas forneceram ainda pontuações de RMSD, torção de proteínas e “valores de p” para comparações estruturais, auxiliando na interpretação precisa dos resultados. As percepções obtidas com este estudo contribuem significativamente para a compreensão da parasitologia de *T. gondii* e *N. caninum*. As identidades variadas das proteínas, as diferenças nas características estruturais e a existência de vários domínios conservados ressaltam a complexidade das interações desses parasitos com seu ambiente hospedeiro. A análise estrutural em 3D aumenta ainda mais a concepção da base molecular dessas interações.

6 CONCLUSÃO

A análise das proteínas de grânulos densos de *T. gondii* (TgGRAs) e suas proteínas ortólogas em *N. caninum* (NcGRAs), apresentadas neste estudo, esclareceu aspectos críticos desses organismos parasitos intimamente relacionados. As descobertas relacionadas à identidade das proteínas, aos elementos estruturais e aos domínios conservados fornecem uma base para futuros esforços de pesquisa com o objetivo de esclarecer as funções específicas dessas proteínas nas interações com o hospedeiro e na patogenicidade. Além disso, a abordagem comparativa, incluindo estudos sobre domínios conservados e diferenças estruturais, promete ampliar a compreensão da relação evolutiva entre esses parasitos e as estratégias que eles empregam para infectar e manipular as células hospedeiras. Essas descobertas podem ter implicações de longo alcance para o desenvolvimento de novas intervenções e terapias direcionadas a essas proteínas parasitárias essenciais. A utilização de variações distintas de GRAs pode permitir a criação de ferramentas de diagnóstico precisas e adaptadas a cada parasito. Além disso, a identificação de GRAs com características semelhantes pode ajudar também no direcionamento de vacinas únicas para toxoplasmose e neosporose, aumentando assim a eficácia das medidas de controle de infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, Ahmed M. *et al.* Role of dense granule antigen 7 in vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice infected during early pregnancy. **Parasitology International**, [s. l.], v. 89, p. 102576, 2022.

AHMADPOUR, Ehsan *et al.* Overview of Apoptosis, Autophagy, and Inflammatory Processes in *Toxoplasma gondii* Infected Cells. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2023. Disponível em: /pmc/articles/PMC9966443/. Acesso em: 11 maio 2023.

AL-BAJALAN, Mariwan M.M. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* induce different host cell responses at proteome-wide phosphorylation events; a step forward for uncovering the biological differences between these closely related parasites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 116, n. 10, p. 2707–2719, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-017-5579-7>. Acesso em: 26 out. 2023.

AMDOUNI, Yosra *et al.* Molecular identification of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* in genital apparatus of naturally infected cows in North Tunisia. **Tropical Animal Health and Production** 2021 53:6, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-021-02975-x>. Acesso em: 11 abr. 2023.

ANGHEL, Nicoleta *et al.* Endochin-like quinolones (ELQs) and bumped kinase inhibitors (BKIs): Synergistic and additive effects of combined treatments against *Neospora caninum* infection in vitro and in vivo. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 17, n. July, p. 92–106, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.08.007>.

BARYLYUK, Konstantin *et al.* A Comprehensive Subcellular Atlas of the *Toxoplasma* Proteome via hyperLOPIT Provides Spatial Context for Protein Functions. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 752–766.e9, 2020. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S193131282030514X/fulltext>. Acesso em: 1 jun. 2023.

BERNÁ, Luisa *et al.* Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. **Genome Research**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 823–833, 2021. Disponível em: <https://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.262832.120>.

BORKENS, Yannick. *Toxoplasma gondii* in Australian macropods (Macropodidae) and its implication to meat consumption. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 16, p. 153, 2021. Disponível em: /pmc/articles/PMC8449172/. Acesso em: 13 maio 2023.

BRADLEY, Peter J.; SIBLEY, L. David. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 582, 2007. Disponível em: /pmc/articles/PMC2682365/. Acesso em: 26 out. 2023.

DAVID SIBLEY, L. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 240, n. 1, p. 72–91, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21349087/>. Acesso em: 26 out. 2023.

DE CAMPOS, Hevila Gabrieli Nascimento *et al.* Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies and risk factors in domiciliated dogs of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, [s. l.], v. 31, n. 2, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35544881/>. Acesso em: 5 jun. 2023

DONG, Jingquan *et al.* GRA12, a novel dense granule protein from *Neospora caninum*. **Parasitology International**, [s. l.], v. 81, p. 102268, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102268>. Acesso em: 6 fev. 2022.

DUBEY, J. P. *et al.* Neosporosis in animals. **Neosporosis in Animals**, [s. l.], p. 1–529, 2017. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781315152561/neosporosis-animals-dubey-hemphill-calero-bernal-gereon-schares>. Acesso em: 26 out. 2023.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 180, n. 1–2, p. 90–108, 2011.

FEREIG, Ragab M; ABDELBAKY, Hanan H; NISHIKAWA, Yoshifumi. Comparative Evaluation of Four Potent *Neospora caninum* Diagnostic Antigens Using Immunochromatographic Assay for Detection of Specific Antibody in Cattle. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2133, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102133>.

FEREIG, Ragab M.; NISHIKAWA, Yoshifumi. From Signaling Pathways to Distinct Immune Responses: Key Factors for Establishing or Combating *Neospora caninum* Infection in Different Susceptible Hosts. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7281608/>. Acesso em: 26 out. 2023.

FEREIG, Ragab M.; OMAR, Mosaab A.; ALSAYEQH, Abdullah F. Exploiting the Macrophage Production of IL-12 in Improvement of Vaccine Development against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Infections. **Vaccines**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36560492/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

FRANCIA, Maria E. *et al.* A Homolog of Structural Maintenance of Chromosome 1 Is a Persistent Centromeric Protein Which Associates With Nuclear Pore Components in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 295, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7343853/>. Acesso em: 26 out. 2023.

FREUDL, Roland. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0901-3>. Acesso em: 29 nov. 2023.

GALAL, Lokman *et al.* A unique *Toxoplasma gondii* haplotype accompanied the global expansion of cats. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9526699/>. Acesso em: 11 maio 2023.

GAO, Chen; CAO, Nancy; WANG, Yibin. Metal dependent protein phosphatase PPM family

in cardiac health and diseases. **Cellular signalling**, [s. l.], v. 85, p. 110061, 2021. Disponível em: /pmc/articles/PMC9107372/. Acesso em: 26 out. 2023.

GASTALDELLO, Stefano *et al.* Caspase-1 Promotes Epstein-Barr Virus Replication by Targeting the Large Tegument Protein Deneddylase to the Nucleus of Productively Infected Cells. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e1003664, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003664>. Acesso em: 7 nov. 2023.

GRIFFITH, Michael B.; PEARCE, Camille S.; HEASLIP, Aoife T. Dense granule biogenesis, secretion, and function in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1–20, 2022.

GUEVARA, Rebekah B.; FOX, Barbara A.; BZIK, David J. A Family of *Toxoplasma gondii* Genes Related to GRA12 Regulate Cyst Burdens and Cyst Reactivation. **mSphere**, [s. l.], v. 6, n. 2, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33883265/>. Acesso em: 26 out. 2023.

GUEVARA, Rebekah B.; FOX, Barbara A.; BZIK, David J. *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuole Membrane-Associated Dense Granule Proteins Regulate Maturation of the Cyst Wall. **mSphere**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2020. Disponível em: /pmc/articles/PMC6968655/. Acesso em: 30 maio 2023.

GUNA, Alina; HEGDE, Ramanujan S. Current Biology Review Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.004>. Acesso em: 29 nov. 2023.

HARB, Omar S.; ROOS, David S. ToxoDB: Functional Genomics Resource for *Toxoplasma* and Related Organisms. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 2071, p. 27–47, 2020. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9857-9_2. Acesso em: 31 maio 2023.

HU, Hang *et al.* DGPD: a knowledge database of dense granule proteins of the Apicomplexa. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, [s. l.], v. 2022, 2022. Disponível em: /pmc/articles/PMC9513560/. Acesso em: 15 maio 2023.

IVANOV, Yuri D. *et al.* Prediction of Monomeric and Dimeric Structures of CYP102A1 Using AlphaFold2 and AlphaFold Multimer and Assessment of Point Mutation Effect on the Efficiency of Intra- and Interprotein Electron Transfer. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1386, 2022. Disponível em: /pmc/articles/PMC8874714/. Acesso em: 30 mar. 2023.

JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [s. l.], v. 596, n. 7873, p. 583, 2021. Disponível em: /pmc/articles/PMC8371605/. Acesso em: 30 mar. 2023.

JUNG, Calvin; LEE, Cleo Y.F.; GRIGG, Michael E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 285–296, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15003490/>. Acesso em: 26 out. 2023.

KÄLL, Lukas; KROGH, Anders; SONNHAMMER, Erik L.L. A Combined Transmembrane

Topology and Signal Peptide Prediction Method. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 338, n. 5, p. 1027–1036, 2004.

KESKIN KARAKOYUN, Hilal *et al.* Evaluation of AlphaFold structure-based protein stability prediction on missense variations in cancer. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 14, 2023. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9988940/](https://pmc/articles/PMC9988940/). Acesso em: 30 mar. 2023.

LECHNER, Marcus *et al.* Orthology Detection Combining Clustering and Synteny for Very Large Datasets. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 105015, 2014. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4138177/](https://pmc/articles/PMC4138177/). Acesso em: 29 nov. 2023.

LIM, Pek Siew; SUTTON, Christopher Ray; RAO, Sudha. Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. **Immunology**, [s. l.], v. 146, n. 4, p. 508, 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4693901/](https://pmc/articles/PMC4693901/). Acesso em: 26 out. 2023.

LIU, Dang; HUNT, Martin; TSAI, Isheng J. Inferring synteny between genome assemblies: a systematic evaluation. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5791376/](https://pmc/articles/PMC5791376/). Acesso em: 29 nov. 2023.

LU, Zhenxiao *et al.* Development and validation of a machine learning algorithm prediction for dense granule proteins in Apicomplexa. **Parasites & vectors**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36918932/>. Acesso em: 22 maio 2023.

MA, Lei *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy cows in Hebei province, China. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1714636>, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 451–453, 2020

MACÊDO, Arlindo G. *et al.* SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-163>. Acesso em: 26 out. 2023.

MANI, Rajesh *et al.* Dense granule protein 3 of *Toxoplasma gondii* plays a crucial role in the capability of the tissue cysts of the parasite to persist in the presence of anti-cyst CD8⁺ T cells during the chronic stage of infection. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, p. 1272221, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1272221/full>. Acesso em: 26 out. 2023.

MAYORAL, Joshua *et al.* Dense Granule Protein GRA64 Interacts with Host Cell ESCRT Proteins during *Toxoplasma gondii* Infection. **mBio**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9426488/](https://pmc/articles/PMC9426488/). Acesso em: 15 maio 2023.

MERCIER, Corinne *et al.* Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 829–849, 2005.

MINEO, Tiago W. P. *et al.* Efficient Gene Knockout and Knockdown Systems in *Neospora caninum* Enable Rapid Discovery and Functional Assessment of Novel Proteins. **mSphere**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8754167/](https://pmc/articles/PMC8754167/). Acesso em: 31 mar. 2023.

MUKHOPADHYAY, Debanjan; ARRANZ-SOLÍS, David; SAEIJ, Jeroen P.J. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During Toxoplasma Infection.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, [s. l.], v. 10, 2020. Disponível em: /pmc/articles/PMC7593385/. Acesso em: 11 maio 2023.

NADIPURAM, Santhosh Mukund *et al.* Proximity biotinylation reveals novel secreted dense granule proteins of Toxoplasma gondii bradyzoites. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 5, 2020.

Disponível em: /pmc/articles/PMC7202600/. Acesso em: 30 maio 2023.

NISHIKAWA, Yoshifumi *et al.* Neospora caninum Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 84, n. 18, 2018. Disponível em:

/pmc/articles/PMC6121998/. Acesso em: 14 out. 2023.

OBED, Cudjoe *et al.* Toxoplasma gondii dense granule protein 3 promotes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by activating the PERK pathway. **Parasites & vectors**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35918751/>. Acesso em: 23 maio 2023.

OKAT, Zehra. The molecular functions of protein kinase C (PKC) isoforms. **International Physical Medicine & Rehabilitation Journal**, [s. l.], v. Volume 3, n. Issue 6, 2018.

Disponível em: <https://medcraveonline.com/IPMRJ/IPMRJ-03-00161.php>. Acesso em: 26 out. 2023.

PAN, Ming *et al.* The determinants regulating Toxoplasma gondii bradyzoite development.

Frontiers in Microbiology, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: /pmc/articles/PMC9691885/. Acesso em: 13 maio 2023.

PETERSON, Mark E. *et al.* Evolutionary constraints on structural similarity in orthologs and paralogs. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1306, 2009. Disponível em: /pmc/articles/PMC2774440/. Acesso em: 26 out. 2023.

PUGH, David J.R. *et al.* DWNN, a novel ubiquitin-like domain, implicates RBBP6 in mRNA processing and ubiquitin-like pathways. **BMC Structural Biology**, [s. l.], v. 6, p. 1, 2006.

Disponível em: /pmc/articles/PMC1360078/. Acesso em: 26 out. 2023.

QI, Tongsheng *et al.* Application of Toxoplasma gondii-specific SAG1, GRA7 and BAG1 proteins in serodiagnosis of animal toxoplasmosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 1029768, 2022. Disponível em: /pmc/articles/PMC9798413/.

Acesso em: 10 abr. 2023.

RAVINDRAN, Sandeep; BOOTHROYD, John C. Secretion of Proteins into Host Cells by Apicomplexan Parasites. **Traffic**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 647–656, 2008. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0854.2008.00723.x>. Acesso em: 26 out. 2023.

REID, Adam James *et al.* Comparative genomics of the apicomplexan parasites Toxoplasma gondii and Neospora caninum: Coccidia differing in host range and transmission strategy.

PLoS pathogens, [s. l.], v. 8, n. 3, 2012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22457617/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

RISCO-CASTILLO, Veronica *et al.* Effects of Dense Granular Protein 6 (GRA6) Disruption on *Neospora caninum* Virulence. **Frontiers in Veterinary Science** | www.frontiersin.org, [s. l.], v. 7, p. 562730, 2020. Disponível em: www.frontiersin.org.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Roberto *et al.* Dynamics of *Neospora caninum*-Associated Abortions in a Dairy Sheep Flock and Results of a Test-and-Cull Control Programme. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10111518>.

SELIVERSTOV, Alexandr V. *et al.* Comparative Analysis of Apicoplast-Targeted Protein Extension Lengths in Apicomplexan Parasites. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4465681/](https://pmc/articles/PMC4465681/). Acesso em: 26 out. 2023.

SHARPE, Hayley J.; STEVENS, Tim J.; MUNRO, Sean. A Comprehensive Comparison of Transmembrane Domains Reveals Organelle-Specific Properties. **Cell**, [s. l.], v. 142, n. 1, p. 158, 2010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2928124/](https://pmc/articles/PMC2928124/). Acesso em: 26 out. 2023.

SZABO, Edina K.; FINNEY, Constance A.M. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 113–127, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27988095/>. Acesso em: 26 out. 2023.

THEISEN, Terence C.; BOOTHROYD, John C. Transcriptional signatures of clonally derived *Toxoplasma* tachyzoites reveal novel insights into the expression of a family of surface proteins. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 2, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8880437/](https://pmc/articles/PMC8880437/). Acesso em: 26 out. 2023.

TU, Vincent *et al.* The *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Interactome. **mBio**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7002340/](https://pmc/articles/PMC7002340/). Acesso em: 26 out. 2023.

VILLA, Luca *et al.* Spatial distance between sites of sampling associated with genetic variation among *Neospora caninum* in aborted bovine foetuses from northern Italy. **Parasites Vectors**, [s. l.], v. 14, p. 47, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04557-6>.

WAAP, Helga *et al.* Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Cattle in Portugal. **Animals** **2022**, Vol. 12, Page 2080, [s. l.], v. 12, n. 16, p. 2080, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/16/2080/htm>. Acesso em: 11 abr. 2023.

WANG, Fei *et al.* Function of *Neospora caninum* dense granule protein 7 in innate immunity in mice. **Parasitology research**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 197–207, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33164154/>. Acesso em: 23 maio 2023.

WANG, Jin Lei *et al.* Novel roles of dense granule protein 12 (GRA12) in *Toxoplasma gondii* infection. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 3165–3178, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31908049/>. Acesso em: 26 out. 2023.

XU, Xingli; CHE, Yanchun; LI, Qihan. HSV-1 tegument protein and the development of its

genome editing technology Chunfu Zheng. **Virology Journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–7, 2016. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-016-0563-x>. Acesso em: 7 nov. 2023.

YANG, Congshan *et al.* Biotinylation of the *Neospora caninum* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-05023-7>. Acesso em: 6 fev. 2022.

YU, Guili *et al.* Immune Protective Evaluation Elicited by DNA Vaccination With *Neospora caninum* Dense Granules Proteins in Mice. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 8, p. 638067, 2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7953147/](https://pmc/articles/PMC7953147/). Acesso em: 10 abr. 2023.

YUE, Min *et al.* Disruption of Dense Granular Protein 2 (GRA2) Decreases the Virulence of *Neospora caninum*. **Frontiers in Veterinary Science** | www.frontiersin.org, [s. l.], v. 8, p. 634612, 2021. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 6 fev. 2022.

ZHAO, Panpan *et al.* A Newly Discovered Dense Granule Protein 3 in *Neospora caninum*. **Acta parasitologica**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 1581–1585, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34019280/>. Acesso em: 23 maio 2023.

ZHENG, Xiao-Nan *et al.* Functional Characterization of 15 Novel Dense Granule Proteins in *Toxoplasma gondii* Using the CRISPR-Cas9 System. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2023. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9927372/](https://pmc/articles/PMC9927372/). Acesso em: 30 maio 2023.

ZWECKSTETTER, Markus. NMR hawk-eyed view of AlphaFold2 structures. **Protein science : a publication of the Protein Society**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 2333–2337, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34469019/>. Acesso em: 30 mar. 2023.