VERA LETTICIE DE AZEVEDO RUIZ

**Expressão, purificação e avaliação da proteína
recombinante Nc56 de *Neospora caninum* para o
sorodiagnóstico da neosporose bovina pelas
técnicas de ELISA e Western-blotting**

São Paulo
2007

VERA LETTICIE DE AZEVEDO RUIZ

**Expressão, purificação e avaliação da proteína
recombinante Nc56 de *Neospora caninum* para o
sorodiagnóstico da neosporose bovina pelas
técnicas de ELISA e Western-blotting**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1834
FMVZ

Ruiz, Vera Letticie de Azevedo

Expressão, purificação e avaliação da proteína recombinante Nc56 de *Neospora caninum* para o sorodiagnóstico da neosporose bovina pelas técnicas de ELISA e Western-blot / Vera Letticie de Azevedo Ruiz. – São Paulo: V. L. A. Ruiz, 2007.
89 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Proteínas recombinantes. 2. Sorodiagnóstico. 3. ELISA. 4. Western-blotting. 5. *Neospora caninum*. 6. Bovinos I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão, purificação e avaliação da antigenicidade da proteína Nc56 de *Neospora caninum* em *Escherichia coli* para a pesquisa por ELISA indireto de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de cães e bovinos infectados naturalmente", Protocolo nº492/2004, utilizando soro de cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Expression, purification and antigenicity evaluation of *Neospora caninum* Nc56 protein in *Escherichia coli* for anti-*Neospora caninum* antibodies research by indirect ELISA in naturally infected dog and bovine sera" protocol number 492/2004, utilizing sample of dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 30 de julho de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RUIZ, Vera Letticie de Azevedo

Título: Expressão, purificação e avaliação da proteína recombinante Nc56 de *Neospora caninum* para o sorodiagnóstico da neosporose bovina pelas técnicas de ELISA e Western-blotting

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

*Dedico este trabalho a minha
família, por todo apoio e
oportunidades que me foram
oferecidos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de uma maneira geral, a todos que tenham contribuído para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, que por descuido ou esquecimento não foram aqui mencionados.

À Deus, pela possibilidade de tudo isso acontecer.

A toda minha família, aos meus avós Zeca (*in memoriam*) e Lourdes, aos meus tios Cleide, Sérgio, Mauro e Vânia, à minha prima Thaís, à minha irmã Regina e principalmente aos meus pais, Edgard e Vera Lúcia pela vida, amizade, paciência, incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelo estímulo, crédito, confiança, carinho e amizade constantes desde o programa de residência, por ter acreditado em mim e me oferecido a chance de mostrar meu potencial, pelos ensinamentos e paciência, e finalmente por me orientar na carreira profissional que se inicia.

A todos os professores do VPS – FMVZ – USP por me incentivarem e acrescentarem conhecimento desde meu primeiro estágio em 2000.

Ao colega Prof. Dr. Fábio Gregori, pelo apoio, amizade, incentivos e sugestões, sem o qual as soluções para os obstáculos demorariam mais a surgir.

Aos Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão e Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela amizade, disponibilidade, incentivos e sugestões sempre pertinentes, que em muito ajudaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A todo o pessoal da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por toda sua paciência e dedicação.

A toda equipe de biblioteca da FMVZ, por terem sido tão atenciosas e gentis durante a correção final da tese.

À equipe do Laboratório de Ornitopatologia (VPT – FMVZ – USP) pela disponibilização do espaço para desenvolvimento do experimento, e em especial ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira e a Profa. Dra. Claudete Serrano Astolfi Ferreira pelos ensinamentos.

A toda equipe do Instituto Biológico, em especial à Dra. Josete Garcia Bersano pelo incentivo e apoio.

A todos meus fiéis amigos da Universidade Paulista (UNIP) que sempre estiveram ao meu lado me incentivando.

Aos meus amigos de longa data Cassandra, Leila, Eli, Andrezza, Mateus, Douglas e Chung, por sempre torcerem pela minha vitória e por estarem sempre disponíveis e pacientes quando eu precisava.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação Guacyara, Renata, Ivan, César Alejandro, Cristiene, Patrícia, Lara, Henrique, Silvio, Adriano, Simone, Vanessa, Maurício, Daniel, Alessandra, Cristina, Leandro, Tatiana, Aline, Fernanda, Alexandre, Laura, Luiza, Nicole, Janaína, Ricardo, _____ (Desculpem se esqueci de alguém, é muita gente! Use o espaço para colocar seu nome!!!!).

Às famílias Mozzi e Russo pelo apoio durante todos estes anos de amizade.

Às minhas ex-estagiárias e novas amigas, Bebel e Carol, que acompanharam grande parte desta jornada.

A todos os docentes, funcionários, pós-graduandos, residentes e estagiários da FMVZ – USP, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na forma de apoio à pesquisa.

*“Sou um animal sentimental
Me apego facilmente ao que desperta meu desejo
Tente me obrigar a fazer o que não quero
E você vai logo ver o que acontece
Acho que entendo o que você quis me dizer
Mas existem outras coisas
Consegui meu equilíbrio cortejando a insanidade
Tudo está perdido mas existem possibilidades
Tínhamos a idéia, mas você mudou os planos
Tínhamos um plano, você mudou de idéia
Já passou, já passou, quem sabe outro dia
Antes eu sonhava, agora já não durmo
Quando foi que competimos pela primeira vez?
O que ninguém percebe é o que todo mundo sabe
Não entendo terrorismo, falávamos de amizade
Não estou mais interessado no que sinto
Não acredito em nada além do que duvido
Você espera respostas que eu não tenho, mas
Não vou brigar por causa disso
Até penso duas vezes se você quiser ficar
Minha laranjeira verde, por que está tão prateada?
Foi da lua dessa noite, do sereno da madrugada?
Tenho um sorriso bobo, parecido com solução
Enquanto o caos segue em frente
Com toda calma do mundo”*

(Renato Russo)

RESUMO

RUIZ, V. L. A. **Expressão, purificação e avaliação da proteína recombinante Nc56 de *Neospora caninum* para o sorodiagnóstico da neosporose bovina pelas técnicas de ELISA e Western-blotting.** [Expression, purification and evaluation of *Neospora caninum* recombinant protein Nc56 for neosporosis serodiagnosis by ELISA and Western-blotting]. 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O *Neospora caninum* é um protozoário filogeneticamente relacionado a vários coccídeos de importância em medicina veterinária e humana, além de ser um parasita intracelular obrigatório capaz de causar abortamentos em bovinos e paralisia neuromuscular em cães. O estudo de antígenos e proteínas recombinantes de *N. caninum* gerou uma série de informações para um melhor diagnóstico e diferenciação deste protozoário e demais agentes a ele relacionados. No presente trabalho, propomos a expressão do clone do gene da proteína interna Nc56 de *N. caninum* em sistema procarioto (*Escherichia coli*), para avaliar sua antigenicidade frente a soros de bovinos imunoreativos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. Para tanto, estabelecemos as condições ideais de expressão da proteína (indução por 4 horas e concentração de L-arabinose de 0,2%) e posteriormente avaliamos duas formas de purificação do produto recombinante (cromatografia de afinidade por metal imobilizado e eluição direta do gel de SDS-PAGE), constatando que a eluição de proteínas recombinantes diretamente do gel de SDS-PAGE mostrou-se o procedimento mais adequado para evitar a presença de proteínas contaminantes advindas do sistema procarioto de expressão. Foi selecionado um painel de soros bovinos (animais de campo), previamente testados pela reação de

imunofluorescência indireta (RIFI) para avaliar sua reatividade para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. Utilizamos o soro de um bezerro macho da raça Holandesa recém-nascido, colhido antes da administração de colostro materno (mãe soronegativa pela RIFI-Nc e RIFI-Tg) como controle negativo. O controle positivo foi obtido do mesmo bezerro após inoculação experimental de taquizoítos viáveis de *N. caninum*, quando este animal já apresentava seis meses de idade. O ELISA indireto foi realizado com microplacas de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato sensibilizadas com 10 µg/mL de proteína recombinante purificada Nc56 e apresentou altas densidades ópticas tanto para soros bovinos positivos na RIFI para *N. caninum* quanto para *T. gondii*, quando comparadas com a densidade óptica do soro controle negativo. A proteína recombinante purificada e o extrato bruto de proteínas solúveis em tampão desnaturante foram submetidos ao teste de Western-blotting, para avaliação de antigenicidade frente a soros de animais positivos e negativos para *N. caninum* e *T. gondii*, previamente testados por RIFI. Os resultados apresentados nas duas técnicas (ELISA e Western-blotting) demonstram que a proteína recombinante purificada Nc56 de *N. caninum* possui reatividade cruzada entre os dois coccídeos, não se prestando, portanto, para uso em sorodiagnóstico da neosporose.

Palavras-chave: Proteínas recombinantes. Sorodiagnóstico. ELISA. Western-blotting. *Neospora caninum*. Bovinos.

ABSTRACT

RUIZ, V. L. A. **Expression, purification and evaluation of *Neospora caninum* recombinant protein Nc56 for neosporosis serodiagnosis by ELISA and Western-blotting.** [Expressão, purificação e avaliação da proteína recombinante Nc56 de *Neospora caninum* para o sorodiagnóstico da neosporose bovina pelas técnicas de ELISA e Western-blotting]. 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Neospora caninum, a protozoa phylogenetically related to other coccidia, is an obligatory intracellular parasite, able to cause abortions in bovine and neuromuscular paralysis in dogs. Researches with *Neospora caninum* antigens and recombinant proteins leads to numerous information to a better diagnosis and differentiation of several coccidia. The purposes of this study were expressing the *Neospora caninum* inner protein Nc56 in a prokaryotic system (*Escherichia coli*) and evaluate its antigenicity with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* positive bovine sera. It was established the ideal conditions to express the protein (4 hour induction and 0,2% L-arabinose concentration) and, after that, two protein purification systems were assayed (immobilized metal affinity chromatography and elution from polyacrylamide gel) resulting in a better protein recuperation the elution method. A panel of previous RIFI-tested bovine sera was selected to evaluate the immune reactivity of Nc56 protein with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* positive sera. The negative control was obtained from a *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* negative newborn male bovine and the positive control was obtained from the same animal (6 month old), after the inoculation of live *Neospora caninum* tachyzoits. The indirect ELISA assay was performed in 96-wells microtiters plates, coated with

purified Nc56 recombinant protein (10 µg/mL), resulting in higher optical densities for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* positive sera, when compared with negative control. The purified recombinant protein and the crude extract of soluble proteins in denaturing binding buffer were submitted to Western-blotting to evaluate its antigenicity with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* positive sera. The results obtained in both techniques shown that Nc56 purified recombinant protein has cross reactivity between both coccidia, therefore, it is not indicated to be used as antigen in neosporosis serodiagnosis.

Key words: Recombinant proteins. Serodiagnosis. ELISA. Western-blotting. *Neospora caninum*. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotodocumentação de gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) com perfil eletroforético de plasmídeos com e sem inserto do gene codificador da proteína Nc56. 55
- Figura 2-** Fotodocumentação de gel de SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue com as frações solúveis em tampão DBB obtidas após indução da expressão de culturas de *E. coli* recombinantes e não recombinantes com diferentes concentrações de L-Arabinose. Indução durante 4 horas. 56
- Figura 3-** Fotodocumentação de gel de SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue com as frações solúveis em tampão DBB obtidas após indução da expressão de culturas de *E. coli* recombinantes e não recombinantes com diferentes concentrações de L-Arabinose. Indução durante 18 horas. 57
- Figura 4-** Fotodocumentação de gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata com extratos brutos protéicos de frações solúveis em tampão NBB e tampão DBB. 58
- Figura 5-** Fotodocumentação de gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata dos eluatos obtidos após purificação de extrato protéico de cultura de *E. coli* recombinante por cromatografia de afinidade por metal imobilizado. 60
- Figura 6-** Fotodocumentação de gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata com extratos brutos protéicos de fração solúvel em tampão DBB e do eluato obtido após purificação de banda de interesse por eluição direta do gel. 61
- Figura 7-** Fotodocumentação de géis de SDS-PAGE corado com nitrato de prata com extratos protéicos de fração solúvel em tampão DBB e eluatos obtidos após purificação de banda de interesse por eluição direta do gel, após terem sido submetidos a transferência por eletroblotting. 65
- Figura 8-** Fotodocumentação de membrana de Western-blotting de extratos protéicos de fração solúvel em tampão DBB e eluatos obtidos após purificação de banda de interesse por eluição direta do gel. 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	comprimento de onda em nanômetros (lambda)
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	micrograma por centímetro cúbico
$\mu\text{g}/\text{mL}$	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	micrômetro
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	micrograma por microlitro
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
CoCl_2	cloreto de cobalto
D.O.	densidade óptica
DAB	diaminobenzina
DBB	tampão desnaturante
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF-like	fator de crescimento epidermal
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GRA	proteína relacionada a grânulos densos
GTE	solução de glicose – Tris – EDTA
HD	hospedeiro definitivo
HI	hospedeiro intermediário

HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPLC	cromatografia de alta performance em fase líquida
IgG	imunoglobulina G
iscom	complexos imunoestimulantes
Kb	quilobases
kDa	quilo Dalton
L	litro
LB-amp	meio de cultura bacteriana Lennox Broth com ampicilina
Low salt LB	meio de cultura bacteriana Low salt Lennox Broth
mA	miliampere
mg/mL	miligrama por mililitros
MIC	proteína relacionada a micronemas
mL	mililitro
mM	milimolar
mV	milivolt
NaOH	hidróxido de sódio
NBB	tampão não desnaturante
Nc56	proteína de 56 kDa de <i>Neospora caninum</i>
Ni ²⁺	níquel
nm	nanômetro
NR	não recombinante
NTP	nucleosídeo trifosfato
NTPase	nucleosídeo trifosfato hidrolase
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases

PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto fenil-metil-sulfonil
poli-6-His	cauda de histidina
poli-A	cauda de adenina
R	recombinante
r.p.m.	rotação por minuto
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RIFI-Nc	reação de imunofluorescência indireta para <i>N. caninum</i>
RIFI-Tg	reação de imunofluorescência indireta para <i>T. gondii</i>
SAG	proteína de superfície
SDS	dodecil sulfato de sódio
SRS	proteína de superfície
TE	solução de Tris – EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol
USDA	United States Department of Agriculture
VERO	linhagem de células de epitélio renal de macaco verde africano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Ciclo biológico	21
1.2	Potencial zoonótico	24
1.3	Patogenia e epidemiologia	25
1.4	Sorodiagnóstico da infecção por <i>Neospora caninum</i>	28
1.5	Estudo de antígenos e proteínas	30
1.5.1	NcSAG1	31
1.5.2	NcSAG4	32
1.5.3	NcSRS2	33
1.5.4	NcGRA6	34
1.5.5	NcGRA7	35
1.5.6	NcMIC1	36
1.5.7	NcMIC2	36
1.5.8	NcMIC3	37
1.5.9	NcMIC4	38
1.5.10	Outra proteínas	38
2	OBJETIVOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Cepa de <i>Escherichia coli</i> recombinante	41
3.2	Estabelecimento das condições ótimas de expressão gênica	42
3.3	Expansão da colônia e indução da expressão gênica	44
3.4	Extração das proteínas totais	45

3.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
3.5.1	Coloração por Coomassie Brilliant Blue	46
3.5.2	Coloração por nitrato de prata	47
3.6	Purificação do produto de expressão	47
3.6.1	Purificação de proteínas recombinantes com resíduos de histidina por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (Ni^{2+})	48
3.6.2	Purificação de proteínas recombinantes pela eluição direta do gel de SDS-PAGE	48
3.7	Quantificação do produto purificado	49
3.8	Painel de soros testados por RIFI	49
3.9	ELISA indireto	51
3.10	Western-blotting	53
4	RESULTADOS	55
4.1	Cepa de <i>Escherichia coli</i> recombinante	55
4.2	Estabelecimento das condições ótimas de expressão gênica	56
4.3	Expansão da colônia e indução da expressão gênica	57
4.4	Extração das proteínas totais	59
4.5	Purificação do produto de expressão	59
4.5.1	Purificação de proteínas recombinantes com resíduos de histidina por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (Ni^{2+})	59
4.5.2	Purificação de proteínas recombinantes pela eluição direta do gel de SDS-PAGE	61
4.6	Quantificação do produto purificado	62
4.7	ELISA indireto	62
4.8	Western-blotting	63
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	71

REFERÊNCIAS	72
ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* é um protozoário pertencente ao Filo *Apicomplexa*, família *Sarcocystidae* e subfamília *Toxoplasmatinae*. Este coccídeo é um parasita intracelular obrigatório e seus oocistos são, à microscopia óptica, indistinguíveis dos de *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi* encontrados nas fezes de gatos e de *Hammondia heydorni* encontrados em fezes de cães (DUBEY et al., 1988a; ELLIS et al., 1994; HOLMDAHL et al., 1994; GUO; JOHNSON, 1995; DUBEY; LINDSAY, 1996; McALLISTER et al., 1998).

O primeiro relato acerca do *N. caninum* foi uma comunicação feita por Bjerkas, Mohn e Presthus (1984), na qual eles descreviam um protozoário causando encefalomielite e miosite em cães, sem entretanto identificá-lo. Em 1988, um grupo de pesquisadores (DUBEY et al., 1988a) sugeriu um novo protozoário, semelhante ao *T. gondii*, definindo o novo gênero e espécie. Ainda em 1988, o protozoário foi isolado em cultivo celular e camundongos, e padronizada uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (DUBEY et al., 1988b).

1.1 Ciclo biológico

O *N. caninum* pode apresentar-se de três formas: (1) taquizoítos, forma de rápida multiplicação nos tecidos; (2) bradizoítos, forma de lenta multiplicação nos tecidos, interiorizados em cistos teciduais e (3) esporozoítos, encerrados no interior

dos oocistos, estes eliminados única e exclusivamente nas fezes dos hospedeiros definitivos (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 1999; LINDSAY; DUBEY, 2000).

O ciclo biológico do *N. caninum* foi recentemente descrito quando oocistos foram encontrados nas fezes de cães após estes terem ingerido tecidos de camundongos infectados experimentalmente, caracterizando esta espécie de carnívoro como hospedeiro definitivo (HD) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). A eliminação de oocistos de *N. caninum* por filhotes de coiotes alimentados com tecidos de bovinos experimentalmente infectados também foi demonstrada a partir da avaliação morfológica e biomolecular dos oocistos eliminados (GONDIM et al., 2004). O papel do cão como HD foi comprovado quando observada a eliminação de oocistos por cães naturalmente infectados por *N. caninum* (BASSO et al., 2001).

O ciclo biológico do *N. caninum* pode ser descrito da seguinte forma: o HD elimina oocistos não esporulados nas fezes, contaminando o ambiente (McALLISTER et al., 1998; BASSO et al., 2001). Após 42 a 72 horas, os oocistos esporulam no ambiente, tornando-se infectantes para os indivíduos que os ingerir (McALLISTER et al., 1998). Uma vez que um hospedeiro intermediário (HI) ingira os oocistos esporulados, ocorre a liberação dos esporozoítos, que penetram pelo trato gastrointestinal, transformando-se em taquizoítos, que por sua vez penetram ativamente em diferentes células (neurônios, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares, células dos túbulos renais e hepatócitos), dividindo-se por endodiogenia (reprodução assexuada) rapidamente, provocando a lise celular, ocasionando áreas de necrose e disseminando a infecção a outros órgãos. Esta é a fase aguda da infecção (LINDSAY; DUBEY, 1989; DUBEY; LINDSAY, 1996; INNES et al., 2000).

Com a pressão exercida pela resposta imune do HI, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos que se dividem lentamente também por reprodução assexuada dentro das células hospedeiras, gerando cistos teciduais, caracterizando a fase crônica (INNES et al., 2000). Estes cistos geralmente são encontrados em sistema nervoso, mas já foram descritos em coração e fígado de fetos abortados em bovinos (WOUDA et al., 1997).

Uma vez que o HD ingira tecidos de HI contendo cistos com bradizoítos, ocorre a reprodução sexuada no epitélio intestinal, gerando os oocistos, que são liberados nas fezes, contaminando o ambiente (McALLISTER et al., 1998, DUBEY, 1999).

Os cães, e possivelmente vários outros canídeos, são hospedeiros definitivos ou intermediários, dependendo da forma de infecção. Antígenos de *N. caninum* foram encontrados em bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, cervídeos e eqüinos, evidenciando infecções naturais, enquanto que gatos, camundongos, ratos, gerbils, coelhos, porcos e primatas não humanos tem apenas a infecção experimental documentada (DUBEY et al., 1988b; BARR et al., 1994; DUBEY; LINDSAY, 1996, RODRIGUES et al., 2004).

Além disso, foi demonstrada a presença de anticorpos em soro de animais expostos naturalmente, como camelos, canídeos e felídeos selvagens, sugerindo que estes animais também possam ser hospedeiros intermediários (BUXTON et al., 1997; SIMPSON et al., 1997; HILALI et al., 1998; HUONG et al., 1998; DUBEY, 2003).

1.2 Potencial zoonótico

O potencial zoonótico do *N. caninum* não foi esclarecido, mas alguns trabalhos foram desenvolvidos na tentativa de elucidar este aspecto. Em 1994, Barr e colaboradores realizaram infecções experimentais em fêmeas prenhes de macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*). Dois exemplares foram inoculados intra-uterinamente, dois receberam as doses infectantes via intra-muscular e intra-venosa e outros dois exemplares foram mantidos como controles negativos, recebendo doses do veículo sem taquizoítos. A infecção por *N. caninum* foi confirmada em todos os quatro fetos cujas mães receberam taquizoítos, sendo verificado entre outros sinais, redução do volume de líquido amniótico, inflamação do saco amniótico, encefalite e meningoencefalite. Anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados no soro dos fetos e taquizoítos de *N. caninum* foram encontrados nas lesões por imunohistoquímica e isolados em cultivo celular. Os animais mantidos como controles negativos não apresentaram nenhuma alteração. No geral, a doença em primatas não humanos apresentou semelhanças marcantes com a toxoplasmose em humanos (BARR et al., 1994). Outro grupo pesquisou a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em soros de humanos positivos (172 indivíduos) e negativos (110 indivíduos) para anticorpos anti-*T. gondii* por ELISA, RIFI e Western-blotting. Foram encontrados 12 indivíduos dentre os *T. gondii* positivos e 1 dentre os *T. gondii* negativos com anticorpos reagentes contra proteínas específicas (Nc-p43 [NcSRS2] e outras proteínas não identificadas com pesos moleculares de 29, 30, 37, 51 e 52 kDa) de *N. caninum* no Western-blotting, indicando um possível contato com o agente (NAM; KANG; CHOI, 1998). Um levantamento sorológico realizado na

Califórnia, EUA, com 1.029 amostras de soros de humanos imunocompetentes revelou positividade para anticorpos anti-*N. caninum* em 69 amostras (6,7%) pela RIFI e 16 (1,55%) foram confirmadas por Western-blotting (TRANAS et al., 1999). Mais recentemente, um grupo de pesquisadores brasileiros trabalhou com amostras de soro de quatro grupos distintos: (I) 61 amostras de pacientes HIV-positivos, (II) 50 amostras de pacientes com distúrbios neurológicos, (III) 91 amostras de neonatos e (IV) 54 amostras de sujeitos considerados saudáveis. A pesquisa de IgG anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foi conduzida por ELISA, RIFI e Western-blotting, resultando ao final de todos os testes em 37,7% de positividade no grupo I, 18% no grupo II, 5,5% nos grupos III e IV. Estes resultados indicam que a exposição ou infecção por *N. caninum* em pacientes com imunodeficiências ou distúrbios neurológicos deve ser melhor avaliada e se possível, tentar a detecção de antígenos em materiais de biópsia ou autópsia por reação em cadeia pela polimerase (PCR) ou imunohistoquímica, para uma melhor caracterização da infecção por *N. caninum* em humanos (LOBATO et al., 2006).

1.3 Patogenia e epidemiologia

Devido à rápida multiplicação de taquizoítos na fase aguda, o agente pode causar a morte celular, com conseqüentes lesões necróticas em poucos dias, acarretando problemas neuro-musculares, como encefalomielite em filhotes de cães e deformidades congênitas em membros de bovinos, e provavelmente em outros hospedeiros intermediários. A causa da hiperextensão dos membros ainda não é

conhecida, mas talvez ocorra devido à associação da paralisia do neurônio motor superior e das miosites, que geram uma rápida e progressiva contratura das fibras musculares. A infecção dos tecidos fetais através da placenta leva a lesões inflamatórias degenerativas, principalmente em sistema nervoso central, coração, musculatura esquelética e fígado, podendo levar à morte fetal (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Cães de todas as idades são afetados, mas a doença parece ser mais grave em filhotes infectados congenitamente e animais jovens. Os indivíduos jovens podem desenvolver ataxia nos membros anteriores e paresia, seguida de paralisia e hiperextensão dos membros posteriores. A doença pode ser localizada ou generalizada, pois vários órgãos podem ser envolvidos, sendo também observadas alterações cardíacas, pulmonares e dérmicas (DUBEY; LINDSAY, 1996). A doença pode levar a morte dos cães (DUBEY; LINDSAY, 1990), mas parece não estar associada a abortamentos em infecções naturais (TREES et al., 1999), apenas em infecções experimentais (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Em bovinos adultos infectados, a principal evidência clínica associada à infecção é a ocorrência de abortamentos, podendo acontecer do terceiro mês até o final da gestação. Os embriões e fetos que morrem no útero podem ser reabsorvidos, mumificados ou autolisados. Existe também a ocorrência de natimortalidade. Os bezerros que vêm a termo podem nascer infectados mas clinicamente normais, apresentar sinais clínicos ou estar livres da infecção. Bezerros que sobrevivem à infecção congênita podem apresentar sinais clínicos como peso abaixo do normal, baixo desenvolvimento, sinais neurológicos como ataxia, alteração da propriocepção, flexão ou hiperextensão dos membros, diminuição do reflexo patelar, exoftalmia ou assimetria ocular (DUBEY, 1999).

Os cães e bovinos que possuem infecções subclínicas podem transmitir o parasito aos fetos em gestações sucessivas. Atualmente sabe-se que a principal via de transmissão do *N. caninum* é a congênita ou vertical. Estudos demonstraram que 72 a 95% das infecções ocorrem por esta via, às vezes por várias gestações subseqüentes (SCHARES et al., 1998).

Outra via de transmissão que parece ter maior importância do que se acreditava, é a transmissão fecal-oral de oocistos em propriedades com a presença de cães soropositivos. No trabalho de Dijkstra et al. (2002) isso foi demonstrado pela correlação de fatores de risco, como consumo de placenta, material de fetos abortados ou descargas uterinas pelos cães em combinação com sua defecação nos recintos de alimentação ou nos estoques de forragem e silagem de milho, e a ocorrência de bovinos com infecção pós-natal.

Os cães são considerados disseminadores de oocistos no meio ambiente, contaminando os alimentos e água consumidos pelos HI (McALLISTER et al., 1998). Ainda não se conhece a real importância de canídeos selvagens como disseminadores de *N. caninum*, mas já existem relatos de soropositividade em algumas espécies no exterior e no Brasil, além de comprovada eliminação de oocisto de *N. caninum* por coiotes alimentados com tecidos de bovinos experimentalmente infectados (INNES et al., 2000; GONDIM et al., 2004).

Atualmente, considera-se a neosporose uma das mais importantes causas de abortamento bovino no mundo. Existem relatos de abortamentos esporádicos, endêmicos ou epidêmicos em todos os continentes, afetando o gado de leite e corte, gerando um forte impacto econômico (DUBEY, 1999; WOUDA et al., 1999; DUBEY, 2003).

No Brasil, os relatos surgiram em 1996, com a utilização de sorodiagnóstico em bovinos de leite e corte com histórico de abortamento (BRAUTINGAN; HIETALA; GLASS, 1996; PITUCO et al., 1998), porém, somente em 1999 o agente foi identificado em nosso meio (GONDIM et al., 1999). A partir dessa data, uma série de estudos epidemiológicos foi realizada, como intuito de avaliar a ocorrência e a prevalência de anticorpos séricos nos rebanhos brasileiros (GENNARI; SOUZA, 2002).

1.4 Sorodiagnóstico da infecção por *Neospora caninum*

Embora o *N. caninum* seja um parasito filogeneticamente relacionado ao *T. gondii* e a outros coccídeos, estes agentes possuem diferenças antigênicas significativas que podem ser reveladas por ensaios sorológicos (NISHIKAWA et al., 2001; HOWE et al., 2002; NISHIKAWA et al., 2002a). Apesar de o *N. caninum* e *T. gondii* serem estruturalmente, geneticamente e antigenicamente relacionados deve ser tomada cautela em se fazer generalizações entre a biologia de ambos parasitos, pois estes induzem doenças distintas, por exemplo, o *T. gondii* não causa doença clínica em bovinos e a toxoplasmose congênita repetida é rara (McALLISTER et al., 1996; HOWE et al., 1997; TENTER; JOHNSON, 1997; CARRENO et al., 1998; HOWE et al., 1998; LINDSAY et al., 1998; HOWE; SIBLEY, 1999).

A RIFI foi o primeiro ensaio sorológico empregado para a identificação de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY et al., 1988b). Apesar de possuir deficiências como necessidade de treinamento intensivo do operador, interpretação de

resultados com certa subjetividade e baixo nível de automação, a RIFI tem sido empregada com sucesso como teste de referência para o diagnóstico da neosporose (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

O teste de aglutinação modificado tem como vantagem sua utilização para análise de soros de diversas espécies, desde que padronizado adequadamente, além de apresentar sensibilidade e especificidade diagnósticas comparáveis as da RIFI (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

A possibilidade de automação faz dos ensaios sorológicos em formato de ELISA métodos atraentes para serem empregados no diagnóstico de um número elevado de amostras, especialmente em casos de levantamentos sorológicos ou estudos de soroprevalência em populações de animais de produção. O primeiro teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foi desenvolvido em 1994 (BJÖRKMAN et al., 1994) e desde então uma rápida expansão ocorreu no desenvolvimento e aplicações de diferentes ELISAs (indireto competitivo; com antígeno bruto; com antígeno lisado e parcialmente fracionado; com taquizoítos íntegros e fixados; com antígenos associados a complexos imunoestimulantes (iscom); com proteínas recombinantes; entre outros) no diagnóstico de neosporose (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). Dentre os inconveniente apontados em ELISAs para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, destaca-se o uso de antígenos inadequados. Exemplificando, metodologias tradicionais fazem uso de lisados totais de parasitos que podem apresentar o inconveniente de gerar resultados falsos positivos em virtude do compartilhamento de antígenos entre o *N. caninum* e outros agentes filogeneticamente relacionados (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). Para incrementar a especificidade de um ELISA, muitos autores vêm desenvolvendo recursos que visam reduzir o número de antígenos a serem empregados na prova

sorológica, com o intuito de selecionar antígenos definidos do agente pesquisado. Entre estes recursos destacam-se o emprego de ELISA de captura com anticorpos monoclonais e o ELISA com antígenos recombinantes (LALLY; JENKINS; DUBEY, 1996; DUBEY; JENKINS; ADAMS, 1997; JENKINS; WOUDA; DUBEY, 1997; LOUIE et al., 1997; NISHIKAWA et al., 2001; HOWE et al., 2002; CHAHAN et al., 2003).

1.5 Estudo de antígenos e proteínas

O estudo de antígenos e proteínas recombinantes de *N. caninum* gerou uma série de informações para um melhor diagnóstico e diferenciação deste protozoário e os agentes a ele relacionados.

Recentemente, duas cepas de *N. caninum*, KBA-2 (isolado coreano) e JAP-1 (isolado japonês), e uma de *T. gondii* (RH) foram submetidas a extração de proteínas e seus extratos foram analisados em gel de eletroforese bi-dimensional, western-blotting e espectrometria de massa. Este estudo demonstrou 516 proteínas para a cepa KBA-2, 573 para a JAP-1 e 419 para a RH, sendo 403 proteínas comuns a ambas as cepas de *N. caninum* e 30 proteínas comuns entre as cepas KBA-2 e RH (antígenos de *T. gondii* reconhecidos por soro anti-KBA-2). Este trabalho deixou claro as diferenças antigênicas entre os parasitos, além de demonstrar a relação antigênica entre algumas proteínas (LEE et al., 2005). O mesmo grupo de pesquisadores comparou duas cepas de *N. caninum*, uma de origem coreana (KBA-2) e outra isolada nos Estados Unidos (VMDL-1) e neste estudo encontrou 540 e 520 pontos no gel corado com nitrato de prata,

respectivamente, representando o perfil do proteoma das cepas, e apesar das cepas terem sido isoladas em locais geograficamente distintos, estas apresentaram um perfil antigênico semelhante (SHIN et al., 2005).

Bjerkas, Jenkins e Dubey (1994) analisaram as frações solúvel e insolúvel de proteínas extraídas a partir de taquizoítos de *Neospora caninum* (Nc-1) e encontraram quatro proteínas imunodominantes: uma presente em roptrias (17 kDa), duas presentes em grânulos densos (29 e 30 kDa) e outra em estruturas amorfas de membrana (37 kDa), sendo que nenhuma delas demonstrou reatividade com soros positivos para *T. gondii*.

Com o objetivo de identificar antígenos solúveis em água de *N. caninum* utilizando células T CD4+ de bovinos previamente inoculados com taquizoítos lisados ou viáveis e soro de coelho anti-*N. caninum*, Tuo e colaboradores encontraram proteínas reagentes nas frações com altas concentrações de sal, o que pode significar proteínas com maior teor ácido, apresentando massa molecular de 16, 22, 34, 46, 56 e 75 kDa (TUO et al., 2005).

1.5.1 NcSAG1

A análise de extratos de duas cepas de taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1 e Liverpool) revelou a presença de várias proteínas reativas ao soro policlonal anti-*N. caninum*, sendo uma delas uma glicoproteína de aproximadamente 36 kDa, nomeada Nc-p36. A imunoeletromicroscopia com partículas de ouro e a RIFI realizadas com anticorpos anti-Nc-p36 evidenciaram a presença desta proteína tanto na membrana quanto em grânulos densos de taquizoítos de *N. caninum*, estando ausente em *T. gondii* (HEMPHILL et al., 1997).

A sequência codificadora completa da Nc-p36 foi determinada e a análise da sequência de aminoácidos demonstrou a relação desta proteína com a SAG1 de *T. gondii*. Anticorpos policlonais específicos contra a proteína recombinante foram utilizados para determinar a localização sub-celular do antígeno nos parasitas através de imunoeletromicroscopia com partículas de ouro e foi observado que esta proteína estava localizada exclusivamente na superfície dos taquizoítos de *N. caninum*, em contraste aos resultados do trabalho anterior (SONDA et al., 1998).

Outra pesquisa de antígenos imunodominantes em extrato de *N. caninum* revelou duas proteínas de superfície com âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo que uma delas com 29 kDa, nomeada inicialmente de Nc-p29, também apresentava homologia com sequências de TgSAG1 (HOWE et al., 1998). O mesmo grupo propôs a expressão da proteína em sistema procarioto para a elaboração de um ELISA, chegando a resultados mais sensíveis do que aqueles encontrados na RIFI (HOWE et al., 2002). Em 2003, outro trabalho desenvolveu um ELISA com a mesma proteína, porém utilizando apenas parte de sua estrutura e nomeando-a de NcSAG1. Este estudo demonstrou que mesmo a estrutura parcial da proteína pode ser utilizada para a elaboração de um teste confiável (CHAHAN et al., 2003).

1.5.2 NcSAG4

A análise de uma sequência de 793 pares de bases (pb) demonstrou uma sequência aberta de leitura de 522 pb para a proteína NcSAG4 ($\cong$ 18,4 kDa), homóloga a TgSAG4 de *T. gondii*. A proteína recombinante foi obtida em sistema procarioto, apresentando 19,5 kDa, e para a confirmação da expressão estágio-específica em bradizoítos foi realizada RIFI com soro policlonal específico de

camundongos contra a proteína recombinante, demonstrando que esta só é expressa em superfície de bradizoítos de *N. caninum*. A análise da seqüência de aminoácidos revelou a presença de uma âncora de GPI na região carboxi-terminal, além de uma região fortemente hidrofóbica na amino-terminal (FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2006).

1.5.3 NcSRS2

Em 1996, a proteína Nc-p43 ($\cong 43$ kDa) foi identificada como sendo uma proteína imunodominante de membrana de taquizoítos de *N. caninum*. Após a purificação de anticorpos específicos contra Nc-p43, foi possível confirmar a ausência de reação com antígenos de *T. gondii* e determinar a localização subcelular da proteína através de imunofluorescência indireta e imunoeletromicroscopia com partículas de ouro (HEMPHILL, 1996; HEMPILL; GOTTSTEIN, 1996).

Outro grupo, pesquisando antígenos imunodominantes, encontrou duas proteínas de superfície com âncora GPI, sendo uma delas denominada inicialmente de Nc-p35 ($\cong 35$ kDa), a qual apresentava homologia com seqüências de TgSRS2 (*T. gondii*). Comparando a seqüência de aminoácidos da Nc-p43 e Nc-p35, percebeu-se que se tratava da mesma proteína, justificando a diferença de migração eletroforética pelas condições de solubilidade utilizadas (desnaturante ou nativa, respectivamente). Diante destes resultados, os autores sugeriram que a proteína fosse denominada de NcSRS2 (HOWE et al., 1998).

Em outro estudo, a proteína nomeada p38 ($\cong 38$ kDa) foi purificada com auxílio de anticorpos monoclonais a partir de extrato bruto de taquizoítos de *N. caninum* e mediante sua análise, conclui-se que se tratava da mesma proteína dos trabalhos

anteriores. As frações isentas de contaminantes foram utilizadas para a padronização de um ELISA indireto e apesar de possuir homologia com a proteína de *T. gondii* TgSRS2, não houve a presença de reações cruzadas para este agente, bem como demonstrou-se específica para *N. caninum* frente a soros positivos para *Sarcocystis* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria bovis*, *Babesia divergens* (SCHARES et al., 2000). Outra pesquisa propôs a elaboração de um ELISA utilizando a mesma proteína, porém obtida a partir de um sistema de expressão em células de insetos, com baculovírus sendo o vetor. Esta proteína demonstrou ser útil para ser empregada em um teste de ELISA, já que os seus resultados apresentaram alta correlação com os da RIFI e não houve reações cruzadas com *T. gondii* e *H. heydorni* (NISHIKAWA et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2002a). Em 2001, foi determinado um domínio antigênico que deve estar localizado na região C-terminal, envolvendo aminoácidos do segundo e terceiro terços do polipeptídio (SON et al., 2001). Mais recentemente, a mesma proteína sendo denominada NcSRS2, foi expressa em sistema de baculovírus e células de inseto para a demonstração da presença de uma âncora GPI e concluiu-se que o domínio hidrofóbico C-terminal é um componente essencial para ligação membrana-GPI (NISHIKAWA et al., 2002b).

1.5.4 NcGRA6

Em 1996, foi identificado um clone imunoreativo (605 nucleotídeos) em uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) que expressava uma proteína de 30 kDa, denominada Nc 14.1. Essa proteína foi utilizada em um ELISA, que demonstrou concordância satisfatória com a RIFI e a não ocorrência de reações cruzadas com *T. gondii* e *Sarcocystis* spp (LALLY; JENKINS; DUBEY, 1996). Uma porção do cDNA

anterior foi utilizada para examinar novamente a biblioteca de cDNA, e foi encontrada uma seqüência maior, com 1.620 pb que incluía uma seqüência poli-A (65 nucleotídeos), e a análise desta seqüência demonstrou similaridade com o cDNA que codifica a proteína NcDG2 (LIDDELL et al., 1998). Uma revisão de literatura realizada recomenda que a proteína NcDG2 seja renomeada para NcGRA6, para seguir o padrão de nomenclatura das proteínas de *T. gondii* (HOWE; SIBLEY, 1999). Para melhorar a especificidade e sensibilidade do ELISA com NcGRA6 recombinante, foi realizada uma purificação por HPLC (cromatografia de alta performance em fase líquida), para remover as proteínas nativas de *E. coli*, que poderiam resultar em reação de fundo para animais soronegativos para *N. caninum*, o que resultou em aumento da sensibilidade de 78,3% para 83,6%, da especificidade de 74,8% para 81,5% e da concordância de testes (kappa) de 0,50 para 0,60, quando comparando os testes com a RIFI (JENKINS et al., 2005).

1.5.5 NcGRA7

Lally, Jenkins e Dubey (1996) identificaram dois clones capazes de expressar proteínas, sendo um deles com 825 pb, denominado Nc 4.1. Este cDNA expressou em sistema procarioto (plasmídeo pTrcHisB em *E. coli*) uma proteína de aproximadamente 35 kDa, que foi utilizada em um ELISA, demonstrando concordância satisfatória com a RIFI e a não ocorrência de reações cruzadas com *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. Em 1997, foi identificada uma versão maior do clone anterior (1.200 pb), que expressou pelo mesmo sistema uma proteína de 37 kDa. Anticorpos de coelho contra este produto recombinante identificaram uma proteína nativa de grânulos densos com aproximadamente 33 kDa, sendo denominada

NcDG1 (LALLY et al., 1997). Outro grupo de pesquisadores identificou uma proteína específica para soros anti-*N. caninum*, encontrada em grânulos densos e associada a membrana e rede de vacúolos parasitóforos pelas técnicas de imunofluorescência indireta e imunoeletromicroscopia com partículas de ouro, sendo denominada Nc-p33 ($\cong$ 33 kDa), e análises revelaram sua homologia com a TgDG1 de *T. gondii*, demonstrando ser a mesma proteína dos estudos anteriores (HEMPHILL et al., 1998). Howe e Sibley (1999) sugeriram, numa revisão de literatura, que o nome da proteína seguisse o padrão adotado de nomenclaturas de antígenos de *T. gondii*, indicando a nova terminologia NcGRA7.

1.5.6 NcMIC1

O gene codificador da proteína NcMIC1 foi identificado em biblioteca de cDNA, apresentando 1.380 pb. Com auxílio desta seqüência, o DNA genômico foi detectado com 2.279 pb, sendo esta diferença explicada pela presença de três introns. Parte do cDNA foi expresso em *E. coli* e o peptídeo resultante foi utilizado para imunizar coelhos. Os anticorpos obtidos reconheceram uma proteína nativa de 60 kDa e uma recombinante de 45 kDa no Western-blotting, além de apontar sua localização em micronemas de taquizoítos de *N. caninum* pela imunofluorescência e imunoeletromicroscopia com partículas de ouro (KELLER et al., 2002).

1.5.7 NcMIC2

A análise do gene codificador da proteína NcMIC2 demonstrou uma seqüência aberta de leitura com 2.298 pb, que foi inserida em um plasmídeo,

utilizado para transformar uma cepa de *E. coli*, que expressou um produto empregado para imunizar um coelho. O soro hiperimune obtido apontou a localização sub-celular da proteína em micronemas (115 kDa), além de demonstrar uma forma menor (95 kDa) encontrada no sobrenadante, que foi secretada pelos taquizoítos (LOVETT et al., 2000).

1.5.8 NcMIC3

Uma proteína, de aproximadamente 40 kDa, obtida a partir de extratos de taquizoítos de *N. caninum*, foi utilizada para produzir anticorpos específicos que demonstraram na RIFI a predominância deste antígeno na região apical do parasita. Após a pesquisa em uma biblioteca de cDNA, a seqüência completa foi determinada, com 2.400 pb expressando em sistema procarioto uma proteína de aproximadamente 38 kDa. A proteína recombinante inoculada em coelhos produziu um soro que foi utilizado para a verificação da localização sub-celular da proteína em taquizoítos de *N. caninum* e *T. gondii*. Os resultados da RIFI e da imunoeletromicroscopia com partículas de ouro evidenciaram a presença da proteína na região apical de taquizoítos de ambos os gêneros, sendo em *N. caninum* predominantemente em micronemas e em *T. gondii* em grânulos densos (SONDA et al., 2000). Naguleswaran e colaboradores observaram que a NcMIC3 era transportada para a membrana do parasito durante a invasão celular, além de apresentar quatro domínios EGF-like (fator de crescimento epidermal) consecutivos, que coincidiram com o aumento da capacidade de adesão a células VERO cultivadas em monocamada, demonstrando sua importância durante a invasão celular (NAGULESWARAN et al., 2001).

1.5.9 NcMIC4

A proteína NcMIC4 foi identificada a partir da purificação de extrato de taquizoítos de *N. caninum* por meio de cromatografia com α -lactose-agarose. Após a separação eletroforética em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida), esta proteína apresentou 55 e 70 kDa em condições nativa e desnaturante, respectivamente. A RIFI e a imunoeletromicroscopia com partículas de ouro demonstraram que a proteína está associada a micronemas e a eletroforese bi-dimensional apresentou sete isoformas distintas (KELLER et al., 2004).

1.5.10 Outra proteínas

Outro grupo trabalhou com duas proteínas diferentes, a N54 (29 kDa) e a N57 (20 kDa) em dois ELISAs separados, expressas em *E. coli*, e a avaliação da sensibilidade e especificidade analíticas demonstrou resultados superiores (95% e 96% para o N54 e 82% e 93% para o N57, respectivamente) quando comparadas a um ELISA de lisado de taquizoítos (74% de sensibilidade e 93% de especificidade) (LOUIE et al., 1997).

A NcNTPase/NTP (nucleosídeo trifosfato hidrolase, NTPase refere-se a enzima e NTP ao antígeno) de *N. caninum* é uma proteína de grânulos densos que foi identificada a partir de sua atividade enzimática similar e reatividade antigênica cruzada com NTPases de *T. gondii*. Comparações de suas seqüências de nucleotídeos indicaram que a NcNTPase é mais semelhante a TgNTPase I, que fora associada a cepas virulentas de *T. gondii* tipo I (ASAI et al., 1998).

Em 2004, Jenkins e colaboradores caracterizaram a distribuição intracelular da proteína nativa Nc56 de *N. caninum* (56 kDa). O cDNA codificador desta proteína foi expresso em *E. coli* como uma proteína com cauda de histidina (poli-6-His), gerando um produto de 45 kDa (41 kDa da proteína e 4 kDa da cauda de histidina), o qual foi inoculado em coelhos para a produção de anticorpos específicos. Este soro foi utilizado em RIFI e imunoeletromicroscopia, determinando que a proteína está presente na região apical tanto de taquizoítos quanto de bradizoítos. O mesmo soro foi empregado em um Western-blotting e reagiu com três proteínas nativas de *N. caninum*, com pesos moleculares de 39, 43 e 56 kDa (JENKINS et al., 2004).

2 OBJETIVOS

Considerando que o diagnóstico da neosporose é uma das ações empregadas no controle da sanidade de rebanhos bovinos, os objetivos deste trabalho foram:

- Expressar a proteína interna Nc56 de *Neospora caninum* com resíduos de histidina em sistema procarioto (*Escherichia coli*);
- Purificar a proteína interna Nc56 de *Neospora caninum*;
- Avaliar a proteína recombinante Nc56 purificada para o sorodiagnóstico de neosporose bovina pelas técnicas de ELISA indireto e Western-blotting.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais e as metodologias utilizadas para a realização deste experimento.

3.1 Cepa de *Escherichia coli* recombinante

O gene codificador da proteína Nc56 (2.607 pb) foi originalmente obtido de biblioteca de cDNA de *N. caninum* criada utilizando o kit Uni-ZAP XR (Stratagen®) nos laboratórios do USDA (United States Departamento of Agriculture) (GenBank accession number AY340638). Foram desenvolvidas duas cepas: uma recombinante (R), transformada com o plasmídeo pBAD/His (~4,1 kb) e o inserto do gene e outra não recombinante (NR), transformada apenas com o plasmídeo pBAD/His sem o inserto, utilizada como controle negativo. Essas duas cepas foram gentilmente cedidas para a realização deste trabalho (JENKINS et al., 2004).

O inserto de interesse contido no plasmídeo pBAD/His (Invitrogen®) foi expresso por células bacterianas da espécie *Escherichia coli*, linhagem TOP10, fornecidas pelo fabricante. A região promotora pBAD está localizada no plasmídeo imediatamente antes do sítio de clonagem e na presença de L-arabinose, o promotor pBAD permite a expressão do gene inserido no plasmídeo, gerando um produto contendo uma seqüência de seis aminoácidos histidina (poli-6-His).

As cepas foram mantidas em meio de cultura “*Low salt Lennox Broth*” com 100 mg/mL de ampicilina (LB-amp) (Anexo A.4), por repiques alternados em meios sólido e líquido. Sempre que uma colônia isolada do meio sólido era passada para o meio líquido, após 24 horas a 37°C, era realizada a extração de plasmídeos por lise alcalina de uma alíquota, para avaliação de seu perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

A lise alcalina foi realizada pela precipitação das bactérias por centrifugação (1,5 mL de cultura bacteriana a 10.000 *g* por 1 minuto), adição de 100 µL de solução de GTE (Anexo A.19), seguida da adição de 200 µL de solução NaOH/SDS (Anexo A.20) com agitação em vórtex. Após manter a suspensão em gelo por 5 minutos, foram adicionados 150 µL de solução de acetato de potássio (Anexo A.6) e novamente levada ao vórtex. Após 3 minutos de centrifugação a 10.000 *g*, 400 µL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 800 µL de etanol 95%. O microtubo foi mantido em temperatura ambiente por 2 minutos e logo centrifugado a 10.000 *g* por 3 minutos. O pellet obtido foi hidratado com etanol 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em bloco aquecido para ser finalmente ressuspendido em 30 µL de solução TE (Anexo A.22).

3.2 Estabelecimento das condições ótimas de expressão gênica

Visto que cada proteína recombinante pode possuir características que afetam sua própria expressão, é importante que, uma vez obtida a bactéria

transformada, seja conduzido um experimento piloto para se determinar a concentração ótima de L-Arabinose, bem como o melhor tempo de duração da indução. Desta forma, preparou-se no momento do uso uma solução de L-Arabinose a 20% em água ultrapura (Anexo A.3), que foi filtrada em filtros Millipore® 0,2 µm.

Foi realizado crescimento de cepas recombinantes e não recombinantes a 37°C por 18 horas em meio líquido LB-amp (Anexo A.4).

As cepas foram repicadas em 20 frascos tipo Erlenmeyer com 25 mL de meio LB-amp (Anexo A.4) cada, sendo 10 cepas recombinantes (frascos R) e 10 não recombinantes (frascos NR). Os frascos foram mantidos sob incubação com agitação (200 r.p.m.) a 37°C em estufa tipo “shaker” e foram realizadas leituras periódicas de alíquotas das culturas em espectrofotometria sob luz visível ($\lambda=600\text{nm}$). Quando a densidade óptica (D.O.) atingisse o valor de 0,5, acrescentava-se L-Arabinose nos frascos, como determinado no quadro 1.

Frasco	Concentração de L-Arabinose	Tempo de incubação
R1	0,2 %	4 horas
R2	0,2 %	18 horas
R3	0,02 %	4 horas
R4	0,02 %	18 horas
R5	0,002 %	4 horas
R6	0,002 %	18 horas
R7	0,0002 %	4 horas
R8	0,0002 %	18 horas
R9	0,00002 %	4 horas
R10	0,00002 %	18 horas
NR1	0,2 %	4 horas
NR2	0,2 %	18 horas
NR3	0,02 %	4 horas
NR4	0,02 %	18 horas
NR5	0,002 %	4 horas
NR6	0,002 %	18 horas
NR7	0,0002 %	4 horas
NR8	0,0002 %	18 horas
NR9	0,00002 %	4 horas
NR10	0,00002 %	18 horas

Quadro 1- Concentração de L-Arabinose e tempos de indução de expressão gênica para estabelecimento das condições ótimas de produção da proteína Nc56 - São Paulo, 2006

Decorridas as condições anteriormente descritas, as culturas foram recolhidas e centrifugadas a 10.000 *g*. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi submetido ao procedimento de extração protéica como descrito no item 3.4.

3.3 Expansão da colônia e indução da expressão gênica

O meio líquido LB-amp (Anexo A.4) foi pré-aquecido em frasco tipo Erlenmeyer de 500 mL a 37°C. Em seguida, 1 mL de cultura foi inoculado para cada 250 mL de meio pré-aquecido e incubado a 37°C em uma estufa tipo “shaker”, com rotação de 200 r.p.m. Deve-se sempre ter um frasco contendo a cepa recombinante e outro com a não recombinante para efeito de comparação final da expressão da proteína esperada.

Foi feita um monitoramento do crescimento bacteriano, por meio de leituras em espectrofotômetro a 600 nm até que a colônia chegasse a uma densidade óptica ideal (0,5) para a indução de expressão gênica.

Quando a cultura atingiu esta D.O., foi adicionado o indutor de expressão, que no caso do plasmídeo pBAD/His é uma solução de L-Arabinose com concentração final de 0,2%. Após a adição de L-Arabinose, a cultura foi incubada por mais quatro horas na estufa tipo “shaker” a 37°C.

Terminada essa fase, a cultura pode ser centrifugada para armazenar apenas o “pellets” de bactérias em congelador (-20°C).

3.4 Extração das proteínas totais

A extração de proteínas foi conduzida segundo uma adaptação do protocolo sugerido pela bula do kit de purificação ProBond Nickel-Chelating Resin (Invitrogen® Número de catálogo R801-01).

O “pellet” foi ressuspendido em 5 mL (1:10 do volume inicial de cultura) de tampão não desnaturante (NBB) (Anexo A.21) com lisozima (0,1 mg/mL) e inibidor de protease fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF) (10 mM). O tubo foi agitado levemente em agitador tipo “rocker” a temperatura ambiente até o sedimento ser completamente dissolvido e incubado em gelo por 30 minutos. Após este período, foram realizados três ciclos de 15 segundos em sonicador, com intervalos de 15 segundos e realizados três ciclos de congelamento e descongelamento. A ruptura das células torna a solução viscosa devido a liberação de material genético, porém isso pode ser minimizado pela adição de DNase e RNase (1 µg/µL de cada), mantendo em agitação por 30 minutos. A solução foi centrifugada em alta rotação (10.000 *g* por 30 minutos) para obter-se as proteínas solúveis em água (formas nativas).

O sedimento obtido foi ressuspendido em tampão desnaturante (DBB) (Anexo A.16) e mantido em agitação por 30 minutos. Foi realizada centrifugação a 10.000 *g* por 30 minutos para obtermos as proteínas solúveis em altas molaridades de uréia (formas desnaturadas). O sedimento restante corresponde à fração de proteínas insolúveis, que foi ressuspendido em tampão NBB (Anexo A.21).

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A verificação da expressão protéica foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). O gel de resolução foi feito com solução de 12,5% de acrilamida e bis-acrilamida (30:0,8) e o gel de empilhamento com solução 5% (Anexos A.1 e A.2). O gel de poliacrilamida foi montado em cuba vertical de eletroforese com tampão de migração eletroforética para passagem de corrente elétrica (Anexo A.31).

As amostras foram preparadas previamente, fervendo-as com tampão de amostra 2x (volume a volume) (Anexo A.23) por 4 minutos. Depois de carregadas nos poços do gel, foi aplicada uma voltagem de 100 mV durante a passagem das proteínas pelo gel de empilhamento e, posteriormente, 200 mV para a migração no gel de resolução.

3.5.1 Coloração por Coomassie Brilliant Blue

O corante Coomassie Brilliant Blue realiza uma interação eletrostática com os grupamentos amino das proteínas e peptídeos, permitindo a observação de até, pelo menos, $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de produto no gel (SYROVY; HODNY, 1991).

O gel foi retirado do aparato para eletroforese vertical e submerso por 1 hora na solução fixadora (Anexo A.18). Após esse período, o gel foi submerso por duas horas em solução corante de 0,5% Coomassie Brilliant Blue (Anexo A.9). Para a revelação, foi utilizada a solução fixadora (Anexo A.18), que vai descorando o gel

lentamente, até a visualização das bandas correspondentes às proteínas por transiluminação com luz visível.

3.5.2 Coloração por nitrato de prata

Foi utilizado um protocolo adaptado da coloração por nitrato de prata, pois é obtida uma melhor resolução das proteínas, devido a maior sensibilidade quando comparada à coloração por Coomassie Brilliant Blue (BLUM et al., 1987).

Primeiramente, o gel foi submerso em solução fixadora (Anexo A.17) por 1 hora, sendo posteriormente lavado por 20 minutos 3 vezes em solução de etanol 50%. Foi realizado um pré-tratamento do gel com solução de tiosulfato de sódio (Anexo A.14) por 1 minuto e feitos 3 enxágües com água destilada por apenas 20 segundos cada um. A impregnação com nitrato de prata (Anexo A.11) foi realizada por 20 minutos, seguida de 2 lavagens com água destilada por 20 segundos. A revelação (Anexo A.15) foi acompanhada visualmente para evitar que o gel ficasse muito escuro (aproximadamente 10 minutos), sendo feitas duas lavagens com água destilada e posterior submersão do gel em solução de parada (Anexo A.12). O gel foi mantido em solução de etanol 50% durante a transiluminação com luz visível.

3.6 Purificação do produto de expressão

Para a recuperação da proteína recombinante resultante da expressão gênica foram testados dois diferentes protocolos, descritos a seguir.

3.6.1 Purificação de proteínas recombinantes com resíduos de histidina por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (Ni^{2+})

Colunas plásticas de polipropileno (Invitrogen® número de catálogo R640-50) com capacidade para 10 mL foram carregadas com 2 mL de resina de afinidade carregada com níquel – Ni^{2+} (ProBond Nickel-Chelating Resin – Invitrogen®) para realização da cromatografia para purificação da proteína recombinante Nc56.

A resina foi lavada duas vezes com tampão DBB pH 7,8 (Anexo A.16) e a seguir adicionado 5 mL do extrato protéico de *E. coli* recombinante solubilizado em tampão DBB (Anexo A.16), de acordo com as instruções do fabricante.

A coluna foi agitada levemente por 30 minutos em agitador tipo “rocker” e centrifugada por um minuto a 800 g, para recolhimento do sobrenadante e lavagem da resina com tampão DBB pH 7,8 (Anexo A.16) para retirada de proteínas sem afinidade ao níquel. Esta etapa foi repetida com tampões DBB com diferentes pHs (6,0; 4,0; 3,0 e 2,0) para eluição das proteínas retidas na resina.

3.6.2 Purificação de proteínas recombinantes pela eluição direta do gel de SDS-PAGE

Este procedimento foi recuperado de revista técnica eletrônica da Pierce®, disponível em <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=File&ID=09A91BAB-5D96-478C-88BE-62D3A6B430F3>.

A fração desnaturada com a proteína de interesse foi separada eletroforéticamente por SDS-PAGE em gel preparativo para Western-blotting (gel de 20cm x 20cm). O gel foi recolhido e duas tiras laterais do gel foram cortadas para corá-las com nitrato de prata. O restante do gel foi mantido sobre a placa de vidro, embalado em plástico e umedecido para evitar ressecamento.

Após coloração das tiras de gel, estas foram encaixadas novamente, pareando-as com o gel não corado. Visualmente foram identificadas as bandas de interesse nas duas tiras laterais coradas. As bandas de interesse coradas foram alinhadas para auxiliar a localização no gel não corado.

Uma tira transversal do gel não corado foi cortada na altura esperada da banda de interesse. A tira obtida foi triturada com auxílio de lâmina de bisturi e os fragmentos dispostos em tubos de vidro. Foi adicionado 1 mL de tampão de eluição (Anexo A.27), submergindo os fragmentos de gel e incubando a temperatura ambiente por 18 horas. Após esse período, o tubo foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos para recuperar o sobrenadante e uma alíquota foi analisada em SDS-PAGE para verificação da presença da proteína de interesse.

3.7 Quantificação do produto purificado

A quantificação de proteína recombinante obtida foi realizada com auxílio do teste colorimétrico Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce®), de acordo com as indicações do protocolo sugerido pelo fabricante.

3.8 Pannel de soros testados por RIFI

Utilizamos como controle negativo o soro de um bezerro macho da raça Holandesa recém-nascido, colhido antes que o mesmo tenha mamado o colostro

materno. Ressalta-se que este animal nasceu soronegativo (tanto para *N. caninum* quanto para *T. gondii*) e que a mãe também era negativa pela RIFI-Nc e RIFI-Tg. Como controle positivo foi utilizado o soro do mesmo animal, porém após uma inoculação experimental de taquizoítos viáveis de *N. caninum*, quando este animal já apresentava seis meses de idade.

Além dos controles, foram selecionados soros de animais de campo, previamente testados para avaliar a reatividade para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, demonstrada pela RIFI (quadro 2). Foram considerados soros com reatividade para *N. caninum* aqueles com título igual ou superior a 200. Os soros sem reatividade foram aqueles com título inferior a 25. Vale ressaltar que, para a realização da RIFI-Nc, os soros são diluídos seriadamente na base 2, a partir da diluição 1:25. Para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foram considerados soros negativos os que apresentaram título inferior a 64.

Amostra	RIFI-Nc	RIFI-Tg
Controle Negativo	Negativo	Negativo
Controle Positivo	Positivo	Negativo
03 bov 06	Positivo	Negativo
Bov Nc 1	Positivo	Negativo
Vaca aborto 9695	Positivo	Negativo
Bov Nc 2	Positivo	Negativo
04 bov 10	Positivo	Positivo
54 bov 26	Positivo	Positivo
15 bov 06	Negativo	Positivo
15 bov 01	Negativo	Positivo
12 bov 10	Negativo	Negativo
11 bov 13	Negativo	Negativo
Faz II 298	Negativo	Negativo
56 bov 23	Negativo	Negativo
11 bov 15	Negativo	Negativo
20 bov 19	Negativo	Negativo
20 bov 23	Negativo	Negativo

Quadro 2- Painel de soros testados previamente pela reação de imunofluorescência indireta - São Paulo, 2006

Todos os soros foram gentilmente cedidos e os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.9 ELISA indireto

Para a reação de ELISA indireto foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato (Nunc Maxisorp®).

As diluições ótimas de antígeno e soro foram determinadas por titulação em bloco desses imunorreagentes. O conjugado foi empregado na diluição 1:1000 conforme indicação do fabricante (Sigma® A7414).

A sensibilização (Anexo A.32) foi realizada por 18 horas a 4°C com 100 µL de solução de antígeno Nc56 (10 µg/mL) por poço, diluído em tampão de sensibilização. Após este período, foram realizadas três aplicações de tampão de lavagem (Anexo A.30) para a remoção de antígenos que eventualmente não tenham sido adsorvidos a placa.

O bloqueio da superfície não adsorvida da placa foi feito com tampão de bloqueio (Anexo A.24), por 1 hora a 4°C. Novamente foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (Anexo A.30) para a remoção de proteínas que eventualmente não tenham sido adsorvidas a placa.

Foram adicionados 50 µL de soros testes diluídos em 1:5 em tampão de diluição de amostra (Anexo A.26), incubado-se por 1 hora a 37°C. Todas as reações

foram feitas em duplicata. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens, (Anexo A.30) para remoção dos anticorpos que não reagiram.

Foi feita a adição de 50 μ L de anti-IgG bovina conjugada com peroxidase diluída 1:1000 em tampão de diluição de amostra (Anexo A.26) e realizada a incubação por 1 hora a 37°C. Realizaram-se mais três lavagens (Anexo A.30) para remoção dos anticorpos que não reagiram com IgGs bovinas.

A revelação foi feita com a adição de tampão revelador (Anexo A.35) acrescida de peróxido de hidrogênio 0,012%. Após 10 minutos de reação, foram adicionados 50 μ L de solução de parada (Anexo A.13) por poço e as leituras de D.O. foram realizadas em aparelho leitor de microplacas com filtro 492nm.

Para evitar possíveis ruídos e reações inespecíficas, foram realizados controles da reação da seguinte forma:

- a) Verificação da reatividade da anti-IgG bovina com a proteína recombinante Nc56: poços sensibilizados com antígeno Nc56 + sensibilização com solução bloqueadora + adição de conjugado + revelação.
- b) Verificação da reatividade da anti-IgG bovina com solução bloqueadora: poços sensibilizados apenas com solução bloqueadora + adição de conjugado + revelação.
- c) Verificação se há reatividade da anti-IgG bovina com soro hiperimune bovino: poços sensibilizados apenas com soros bovinos + sensibilização com solução bloqueadora + adição de conjugado + revelação.
- d) Verificação de quanto do valor de D.O. para cada amostra é devido à reatividade com outros fatores exceto o antígeno Nc56: poços sensibilizados com solução bloqueadora + soro teste + adição de conjugado + revelação.

3.10 Western-blotting

De acordo com o protocolo adaptado de Burnette (1981), foi feito um gel preparativo (20 x 20 cm) em SDS-PAGE para realizar a separação eletroforética das proteínas da amostra. Após a eletroforese, colocou-se o gel em tampão de transferência (Anexo A.33) por 20 a 30 minutos sob agitação. A membrana de PVDF foi cortada em dimensões ligeiramente superiores às do gel a ser transferido e ativada, mergulhando-a em metanol por 1 minuto. Após esse período, a membrana também foi mantida em tampão de transferência (Anexo A.33) por 20 a 30 minutos sob agitação. O papel filtro (3 mm) foi cortado nas mesmas dimensões da membrana de PVDF. As folhas foram montadas seguindo a ordem: 2 folhas de papel filtro, membrana de PVDF, gel preparativo e 3 folhas de papel filtro, em sistema de blotting semi-seco Bio-Rad 1.3®. Ligou-se a fonte em voltagem 12 V (corrente entre 80-120 mA).

O tempo de transferência foi avaliado, e para tanto foram testados os seguintes tempos: 30, 45, 60 e 80 minutos. Após cada tempo de transferência, as membranas foram submersas em solução bloqueadora (Anexo A.8) por duas horas, sob agitação branda. As membranas foram posteriormente lavadas 3 vezes com PBS-Tween20 (Anexo A.5), por 5 minutos a cada etapa.

Os soros a serem testados foram diluídos (1:50) em tampão de diluição (Anexo A.25) e as membranas foram incubadas por 18 horas a temperatura ambiente.

Antes de adicionar o anticorpo revelador, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween20 (Anexo A.5) por 5 minutos cada lavagem. A anti-IgG

bovina conjugada com peroxidase (Sigma M4038) diluída 1:200 em tampão de diluição (Anexo A.25) foi adicionada, mantendo-se a incubação por 2 horas a temperatura ambiente.

As membranas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-Tween20 (Anexo A.5). Após esta etapa, as membranas foram submersas em 10 mL de solução de diaminobenzina e cloreto de cobalto (Anexo A.10) e em seguida foi adicionado 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi interrompida com água e a membrana foi seca em papel filtro.

4 RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho.

4.1 Cepa de *Escherichia coli* recombinante

A figura 1 demonstra os perfis eletroforéticos de plasmídeos de duas cepas não-recombinantes (1 e 2) e quatro cepas recombinantes (3, 4, 5 e 6). Note que os dois primeiros plasmídeos são menores que os restantes, pois eles não possuem o inserto do gene Nc56.

Figura 1- Fotodocumentação de gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) com perfil eletroforético de plasmídeos com e sem inserto do gene codificador da proteína Nc56

4.2 Estabelecimento das condições ótimas de expressão gênica

Os resultados destes procedimentos encontram-se documentados nas figuras 2 e 3. Como a proteína de interesse foi obtida apenas na fração solúvel em uréia, não mostramos os resultados obtidos com a fração solúvel em tampão não desnaturante.

Com este procedimento foi possível verificar que as melhores condições para se obter a proteína de interesse foram com indução por 4 horas com 0,2% e 0,02% de L-Arabinose.

Figura 2- Fotodocumentação de gel de SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue com as frações solúveis em tampão DBB obtidas após indução da expressão de culturas de *E. coli* recombinantes e não recombinantes com diferentes concentrações de L-Arabinose. Indução durante 4 horas

Figura 3- Fotodocumentação de gel de SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue com as frações solúveis em tampão DBB obtidas após indução da expressão de culturas de *E. coli* recombinantes e não recombinantes com diferentes concentrações de L-Arabinose. Indução durante 18 horas

Legenda das figuras 2 e 3:

1. padrão de peso molecular Pharmacia (Número de catálogo LWM)
2. cultura recombinante induzida com 0,2% de L-Arabinose
3. cultura recombinante induzida com 0,02% de L-Arabinose
4. cultura recombinante induzida com 0,002% de L-Arabinose
5. cultura recombinante induzida com 0,0002% de L-Arabinose
6. cultura recombinante induzida com 0,00002% de L-Arabinose
7. cultura não recombinante induzida com 0,2% de L-Arabinose
8. cultura não recombinante induzida com 0,02% de L-Arabinose
9. cultura não recombinante induzida com 0,002% de L-Arabinose
10. cultura não recombinante induzida com 0,0002% de L-Arabinose
11. cultura não recombinante induzida com 0,00002% de L-Arabinose

4.3 Expansão da colônia e indução da expressão gênica

Após o experimento piloto, a expressão foi conduzida em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 1 L, com 200 mL de cultura bacteriana, para a

obtenção de proteína em maior escala. Para este volume de produção, foi notado que a indução com 0,2% de L-Arabinose foi ligeiramente mais eficiente que a indução com 0,02%.

Estes resultados mostram que o experimento piloto é necessário para o conhecimento das condições ótimas de indução. Porém, aferições para ajustes mais minuciosos devem ser feitas nas condições de produção em escala.

Figura 4- Fotodocumentação de gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata com extratos brutos protéicos de frações solúveis em tampão NBB e tampão DBB

Legenda da figura 4:

- 1 Padrão de peso molecular Pharmacia (Número de catálogo LWM)
- 2 Extrato protéico de fração solúvel em tampão NBB de cultura de *E. coli* NÃO recombinante.
- 3 e 4 Extrato protéico de fração solúvel em tampão NBB de cultura de *E. coli* recombinante.
- 5 Extrato protéico de fração solúvel em tampão DBB de cultura de *E. coli* NÃO recombinante.
- 6 Extrato protéico de fração solúvel em tampão DBB de cultura de *E. coli* recombinante.

4.4 Extração das proteínas totais

A extração protéica por meio das soluções NBB e DBB se mostrou adequada quanto a solubilização de proteínas contidas no sistema de expressão procarioto, permitindo uma boa visualização da fração desnaturada em uréia, na qual pode se observar a proteína recombinante.

4.5 Purificação do produto de expressão

Seguem os resultados dos dois procedimentos para recuperação da proteína recombinante resultante da expressão gênica.

4.5.1 Purificação de proteínas recombinantes com resíduos de histidina por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (Ni^{2+})

Seguindo as recomendações do fabricante da resina, não foi possível conseguir a purificação da proteína recombinante.

O fabricante recomenda que a resina seja lavada com tampões alcalinos diversas vezes para remoção de proteínas que não possuem poli-6-His. Por fim, as proteínas retidas na resina são eluídas com a lavagem em tampões com pH ácido (4,0). Em tentativas anteriores quando seguimos as recomendações do fabricante notamos que pouca quantidade da proteína recombinante era recuperada neste pH.

Em contrapartida, notamos que havia apreciável quantidade de proteínas de outros pesos moleculares. Desta forma, continuamos eluindo com tampões com pH ainda mais ácidos (soluções com pH 3,0 e 2,0) do que o recomendado pelo fabricante, para que fosse possível recuperar apenas a proteína de interesse.

Mesmo com essa adaptação do protocolo, não obtivemos sucesso, como demonstrado na figura 5, que apresenta alíquotas dos sobrenadantes recolhidos (coluna 1 corresponde ao extrato bruto com a proteína Nc56 e colunas 2, 3 e 4 correspondem aos eluatos das soluções com pH 4,0; 3,0 e 2,0, respectivamente) analisadas por SDS-PAGE.

Figura 5- Fotodocumentação de gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata dos eluatos obtidos após purificação de extrato protéico de cultura de *E. coli* recombinante por cromatografia de afinidade por metal imobilizado

4.5.2 Purificação de proteínas recombinantes pela eluição direta do gel de SDS-PAGE

O protocolo de eluição direta se mostrou eficiente na recuperação da proteína Nc56 a partir do gel de SDS-PAGE, como pode ser observado na coluna 12 da figura 6.

Figura 6- Fotodocumentação de gel SDS-PAGE (corado com nitrato de prata) com extratos brutos protéicos de fração solúvel em tampão DBB e do eluato obtido após purificação de banda de interesse por eluição direta do gel

Legenda da figura 6:

- 1 Extrato protéico de fração solúvel em tampão DBB de cultura de *E. coli* NÃO recombinante.
- 2, 3, 4 e 5 Extrato protéico de fração solúvel em tampão DBB de cultura de *E. coli* recombinante.
- 6 Extrato obtido após eluição da banda de interesse do gel

4.6 Quantificação do produto purificado

A figura 6 mostra o produto eluído disposto no gel juntamente com os extratos protéicos não purificados. O produto eluído mostrado na figura 5 foi quantificado com auxílio do teste colorimétrico Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce®), quando pode ser determinada uma concentração protéica de 100 µg/mL.

4.7 ELISA indireto

Após a seleção do painel de soros, procedeu-se o teste ELISA indireto. Os resultados obtidos demonstram D.O.s elevadas para todos os soros, exceto para três soros de bovinos negativos para *T. gondii* e *N. caninum* e o soro do bezerro recém nascido colhido antes da primeira mamada.

As leituras de D.O. obtidas para cada amostra no ELISA, assim como seu perfil de reatividade pela RIFI-Nc e RIFI-Tg, podem ser verificadas na tabela 1.

Tabela 1- Resultados do ELISA indireto com o painel de soros, testados em placas sensibilizadas com proteína Nc56 purificada, a 10 µg/mL - São Paulo, 2006

	ELISA Nc56	RIFI-Nc	RIFI-Tg	DO (antígeno + bloqueio)	DO (só bloqueio)	DOs corrigidas
1	Controle Negativo	negativo	negativo	0,190	0,159	0,031
2	Controle Positivo	positivo	negativo	0,701	0,181	0,520
3	Bov Nc 1	positivo	negativo	0,517	0,197	0,320
4	Bov Nc 2	positivo	negativo	0,973	0,158	0,816
5	Vaca aborto 9695	positivo	negativo	0,945	0,143	0,803
6	03 bov 06	positivo	negativo	1,303	0,339	0,964
7	04 bov 10	positivo	positivo	1,015	0,269	0,746
8	54 bov 26	positivo	positivo	0,515	0,275	0,240
9	15 bov 01	negativo	positivo	0,833	0,290	0,543
10	15 bov 06	negativo	positivo	0,894	0,225	0,670
11	11 bov 13	negativo	negativo	1,041	0,170	0,871
12	11 bov 15	negativo	negativo	0,294	0,156	0,139
13	12 bov 10	negativo	negativo	1,119	0,196	0,923
14	20 bov 19	negativo	negativo	0,198	0,171	0,027
15	20 bov 23	negativo	negativo	0,176	0,156	0,020
16	56 bov 23	negativo	negativo	0,875	0,169	0,706
17	Faz II 298	negativo	negativo	1,143	0,385	0,758
18	antígeno X conjugado			0,047		
19	bloqueio X conjugado			0,057		
20	Soro hiperimune bovino X conjugado			0,557		
21	Soro hiperimune bovino X conjugado			0,578		

4.8 Western-blot

Para o ajuste do tempo necessário de transferência foi realizado um experimento piloto com a transferência por 30, 45, 60 e 80 minutos. Após a transferência os géis foram corados com prata para verificar a quantidade de

proteína que permanecia retida. Paralelamente, o tempo de transferência foi otimizado pela observação a olho nu de marcas de bandas deixadas sobre a membrana após a transferência. Determinou-se que o tempo ótimo de transferência foi de 60 minutos. Os resultados deste experimento encontram-se ilustrados na figura 7.

Os resultados do Western-blot mostram que tanto os soros RIFI-Nc positivos/RIFI-Tg negativos, quanto os soros RIFI-Nc negativos/RIFI-Tg positivos reagem com a proteína purificada. Ressalta-se que a reatividade em ambos os casos foi muito baixa, como pode ser observado pela intensidade da banda obtida. A figura 8 mostra a imagem digitalizada da membrana após aplicação de recurso de otimização de brilho e contraste, pois a digitalização sem tais recursos não permitia a visualização da reatividade da banda purificada.

Figura 7- Fotodocumentação de géis de SDS-PAGE com extratos protéicos de fração solúvel em tampão DBB e eluatos obtidos após purificação de banda de interesse por eluição direta do gel, após terem sido submetidos a transferência por eletroblotting

Legenda da figura 7:

- 1 amostras antes da transferência:
- 1a Nc56 purificada
- 1b extratos protéicos de fração solúvel em tampão não desnaturante
- 1c padrão de peso molecular
- 2 amostras após transferência por 30 minutos:
- 2a Nc56 purificada
- 2b extratos protéicos de fração solúvel em tampão não desnaturante
- 3 amostras após transferência por 45 minutos:
- 3a Nc56 purificada
- 3b extratos protéicos de fração solúvel em tampão não desnaturante
- 4 amostras após transferência por 60 minutos:
- 4a Nc56 purificada
- 4b extratos protéicos de fração solúvel em tampão não desnaturante
- 5 amostras após transferência por 80 minutos:
- 5a extratos protéicos de fração solúvel em tampão não desnaturante
- 5b Nc56 purificada

Figura 8- Fotodocumentação de membrana de Western-blot de extratos protéicos de fração solúvel em tampão DBB e eluatos obtidos após purificação de banda de interesse por eluição direta do gel

Legenda da figura 8:

- 1a extratos protéicos de fração solúvel em tampão desnaturante submetido a incubação com soro bovino RIFI-Nc positivo/ RIFI-Tg negativo
 - 1b Nc56 purificada submetida a incubação com soro bovino RIFI-Nc positivo/ RIFI-Tg negativo
 - 2a extratos protéicos de fração solúvel em tampão desnaturante submetido a incubação com soro bovino RIFI-Nc positivo/ RIFI-Tg negativo
 - 2b Nc56 purificada submetida a incubação com soro bovino RIFI-Nc positivo/ RIFI-Tg negativo
 - 3a extratos protéicos de fração solúvel em tampão desnaturante submetido a incubação com soro bovino RIFI-Nc negativo/ RIFI-Tg positivo
 - 3b Nc56 purificada submetida a incubação com soro bovino RIFI-Nc negativo/ RIFI-Tg positivo
- As setas marcam a localização da Nc56 purificada

5 DISCUSSÃO

Sendo o *Neospora caninum* um protozoário filogeneticamente relacionado ao *T. gondii* e a outros coccídeos, é esperado que existam similaridades antigênicas entre eles. A avaliação da NcNTPase/NTP de *N. caninum* demonstrou atividade enzimática similar e reatividade antigênica cruzada com NTPases de *T. gondii*, e o estudo realizado por Lee e colaboradores revelou 30 proteínas comuns entre as cepas KBA-2 (isolado coreano de *N. caninum*) e RH (cepa de *T. gondii*) na interpretação de géis de eletroforese bi-dimensional (LEE et al., 2005).

No presente estudo, avaliamos a proteína Nc56, para verificarmos seu potencial uso em sorodiagnóstico de neosporose bovina, como sugerido por Jenkins et al. (2004). Em sua pesquisa, foi realizada a busca de seqüências homólogas de nucleotídeos pelo BLAST-N, relevando 61,4% de similaridade em relação a piruvato carboxilase de ratos. Entretanto este resultado não é definitivo pois também é verificada uma discrepância entre os tamanhos relatados de piruvatos carboxilases de seres eucariotos e a proteína Nc56.

A clonagem do gene codificador da proteína Nc 56 em plasmídeo pBAD/His ocorreu de forma adequada, visto que obtivemos produto de expressão através de bactérias *E. coli* linhagem TOP 10 transformadas e a proteína recombinante foi detectada na fração de proteínas solúveis em altas molaridades de uréia, apresentando-se na forma desnaturada.

Após o estabelecimento das melhores condições de expressão pudemos constatar que a proteína recombinante Nc56 é produzida de forma bem definida em induções de 4 horas, porém, aparentemente, a proteína sofre degradação se o

processo for realizado por 18 horas. Isso pode se dever ao fato que a bactéria precise de aminoácidos para realização de metabolismo essencial e degrade proteínas que estejam de alguma forma armazenadas e sem função imediata.

O plasmídeo pBAD/HIS permite a expressão de proteínas modificadas pela adição de seis resíduos do aminoácido histidina na porção carboxi-terminal. Isto é possível porque o sítio de clonagem do plasmídeo está localizado entre a região promotora e uma série de 6 códons CAT, codificadores de uma sequência de seis aminoácidos histidina. Após serem expressas, as proteínas recombinantes podem ser separadas das outras proteínas oriundas do sistema biológico que as produziu pela passagem em colunas de resina com níquel (Ni^{2+}). Neste procedimento, o extrato protéico obtido atravessa a coluna, enquanto as proteínas que contém resíduos de histidina ficam retidas na resina. Esta associação ocorre graças à afinidade do hexâmero de histidina pelas partículas de níquel que estão presentes na resina.

Após a passagem do extrato protéico, a resina é lavada com tampões alcalinos diversas vezes. Por fim, as proteínas retidas na resina são eluídas com a lavagem em tampões com pH ácido. A afinidade de resíduos de histidina por partículas de níquel decresce com a diminuição do pH.

Entretanto, pode-se notar, pela observação da figura 4, que muitas proteínas de massa diferente da esperada são recuperadas com este procedimento, indicando que o sistema biológico utilizado contém proteínas com elevada afinidade pela coluna e que continuam associadas à resina, mesmo após eluição com pH 4,0 (somente são eluídas com pH 3,0 e 2,0). Notamos também, que a proteína de interesse não aparecia nos eluatos de pH 4,0, 3,0 e 2,0 e provavelmente continuava aderida na resina.

Se proteínas de *E. coli* ficam aderidas à resina de níquel mesmo após lavagens com alta estringência, entendemos que seria muito improvável que outras melhorias ou otimizações do protocolo de purificação com resina de níquel pudessem ser bem sucedidas. Como nosso intuito era de utilizar a proteína com fins diagnósticos, desejávamos um elevado grau de purificação e pela observação da figura 4, nota-se que tal condição não foi alcançada.

Após a constatação de que a resina de níquel foi pouco eficiente (foram realizadas seis tentativas), foi conduzido um protocolo de purificação baseado na eluição da proteína de interesse diretamente de gel de poliacrilamida.

Trata-se de um protocolo simples e eficiente que permitiu recuperar uma quantidade apreciável de proteína recombinante, como demonstrado pela quantificação pelo teste colorimétrico Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce®), que determinou uma concentração protéica de 100 µg/mL.

Uma vez que obtivemos o produto recombinante com alto grau de pureza, livre de proteínas de *E. coli* que pudessem interferir na avaliação de sua antigenicidade, foi realizado o teste de ELISA indireto.

A interpretação dos resultados leva a inferir que a proteína Nc56 deve reagir cruzadamente com soros reativos para o *T. gondii*. Possivelmente há reações cruzadas também com outros parasitos visto que alguns soros RIFI-Nc negativos/RIFI-Tg negativos também reagiram com D.O. elevadas no ELISA indireto, quando comparadas com a densidade óptica do soro controle negativo.

Para a certificação da ocorrência de reatividade cruzada, testamos dois soros RIFI-Nc positivos/RIFI-Tg negativos, bem como um soro RIFI-Nc negativos/RIFI-Tg positivos por Western-blotting usando como antígeno tanto a proteína Nc56

purificada quanto o extrato protéico total de cultura recombinante (fração solúvel em uréia).

Os resultados obtidos revelaram o mesmo perfil de reatividade que o observado no ELISA indireto. Isto nos leva a concluir que a proteína Nc56 realmente reage cruzadamente com soros provenientes de animais positivos para o *T. gondii*.

Resultados semelhantes a este foram encontrados no estudo com a proteína de micronemas NcMIC3. Neste estudo, a proteína recombinante foi inoculada em coelhos para produção de soro hiperimune, utilizado em RIFI e imunoeletromicroscopia com partículas de ouro para verificação da localização sub-celular da proteína em taquizoítos de *N. caninum* e *T. gondii*. Os resultados demonstraram que a proteína poderia ser encontrada em ambos os parasitas, porém em *N. caninum* era localizada predominantemente em micronemas enquanto que em *T. gondii* era encontrada em grânulos densos (NAGULESWARAN et al., 2001).

A reatividade antigênica cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* foi demonstrada também através de ELISAs indiretos com extrato bruto de taquizoítos de *N. caninum*, utilizando sempre como padrão ouro a reação de imunofluorescência indireta (HIGA et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2002a).

Um estudo do proteoma realizado com auxílio de eletroforese bi-dimensional de *N. caninum* (cepa KBA-2) e *T. gondii* (RH) evidenciou o compartilhamento de antígenos entre os dois coccídeos, demonstrando trinta proteínas comuns pelo uso de soro anti-*N. caninum* KBA-2 em Western-blotting com extrato bruto das proteínas de *T. gondii* (LEE et al., 2005).

6 CONCLUSÕES

- As melhores condições para a expressão da proteína recombinante Nc56 foram indução por 4 horas e concentração de L-arabinose de 0,2%.
- As colunas para cromatografia de afinidade por metal imobilizado (níquel) utilizadas neste experimento não permitiram purificação protéica satisfatória. A purificação protéica a partir da eluição do gel mostrou-se um procedimento simples e eficaz para o fim proposto.
- A proteína recombinante Nc56 apresenta reatividade com soros bovinos reagentes tanto ao *Neospora caninum* quanto ao *Toxoplasma gondii*, não se prestando, portanto, para uso em ensaios para sorodiagnóstico da neosporose. Essa reatividade cruzada foi evidenciada tanto pela técnica de ELISA quanto de Western-blotting.

REFERÊNCIAS

ASAI, T.; HOWE, D. K.; NAKAJIMA, K.; NOZAKI, T.; TAKEUCHI, T.; SIBLEY, L. D. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent Type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 277-285, 1998.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory investigation**, v. 71, p. 236-242, 1994.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P. First Isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001.

BJERKAS, I.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 1, p. 214-221, 1994.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeithschriff Fuer Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBER, J.; TREES, A. J.; UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunology**, v. 16, p. 643-648, 1994.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plants proteins, RNA ana DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRAUTINGAM, F. E.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: PANVET, 1996. p. 284.

BURNETTE, W. H. Western-blotting: Eletrophoretic transfer of protein from SDS-Poliacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiografic detection with antibody and radioiodinated protein. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

BUXTON, D.; MALEY, S. W.; PASTORET, P. P.; BROCHIER, B.; INNES, E. A. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 308-309, 1997.

CHAHAN, B.; GATURAGA, I.; HUANGA, X.; LIAO, M.; FUKUMOTO, S.; HIRATA, H.; NISHIKAWA, Y.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; XUAN, X. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 177-185, 2003.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 99-104, 2002.

DUBEY, J. P. Neosporosis - the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1485-1488, 1999.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. S42-S56, 2003. Suplemento.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme linked immunosorbent assays. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 1063-1069, 1997.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 36, p. 147-151, 1990.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A.; JOHNSON, A. M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 64, p. 303-311, 1994.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ZABALLOS, A.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. **Molecular; Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 89-97, 2006.

GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L. P. Neosporose. **Vet News**, v. 59, p. 11-13, 2002.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWAB, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999.

GUO, K. G.; JOHNSON, A. M. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Sarocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v. 81, p. 365-370, 1995.

HEMPHILL, A. Subcellular Localization and Functional Characterization of Nc-p43, a Major *Neospora caninum* Tachyzoite Surface Protein. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p. 4279-4287, 1996.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH B. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology**, v. 115, p. 371-380, 1997.

HEMPHILL, A.; GAJENDRAN, N.; SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; JENKINS, M. Identification and characterisation of a dense granule associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 429-438, 1998.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology research**, v. 82, p. 497-504, 1996.

HIGA, A. C.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 9, n. 2, p. 91-95, 2000.

HILALI, M.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p. 269-271, 1998.

HOLMDAHL, O. J. M.; MATTSON, J. G.; UGGLA, A.; JOHANSSON, K. E. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, p. 187-192, 1994.

HOWE, D. K.; CRAWFORD, A. C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L. D. The p29 and p53 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5322-5328, 1998.

HOWE, D. K.; MERCIER, C.; MESSINA, M.; SIBLEY, L. D. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, p. 29-36, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, D. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1489-1496, 1999.

HOWE, D. K.; TANG, K.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 611-615, 2002.

HUONG, L. T. T.; LJUNGSTRÖM, B. L.; UGGLA, A.; BJÖRKMAN, C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p. 53-57, 1998.

INNES, E. A.; BUXTON, D.; MALEY, S.; WRIGHT, S.; MARKS, J.; ESTEBAN, I.; RAE, A.; SCHOCK, A.; WASTLING, J. Neosporosis: aspects of epidemiology and

host immune response. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 916, p. 93-101, 2000.

JENKINS, M. C.; FETTERER, R.; SCHARES, G.; BJÖRKMAN, C.; WAPENAAR, W.; MCALLISTER, M.; DUBEY, J. P. HPLC purification of recombinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 227-234, 2005.

JENKINS, M. C.; SOARES, R. M.; MURPHY, C.; HEMPHILL, A.; O'HANDLEY, R.; DUBEY, J. P. Localization of a 56 kDa antigen that is present in multiple developmental stages of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 660-663, 2004.

JENKINS, M. C.; WOUDA, W.; DUBEY, J. P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 270-274, 1997.

KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ, M.; BJÖRKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPHILL, A. 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, 2002.

KELLER, N.; RIESEN, M.; NAGULESWARAN, A.; VONLAUFEN, N.; STETTLER, R.; LEEPIN, A.; WASTLING, J. M.; HEMPHILL, A. 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, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, p. 275-279, 1996.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; LIDDELL, S.; DUBEY, J. P. A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 87, p. 239-243, 1997.

LEE, E. G.; KIM, J. H.; SHIN, Y. S.; SHIN, G. W.; KIM, Y. R.; PALAKSHA, K. J.; KIM, D. Y.; YAMANE, I.; KIM, Y. H.; KIM, G. S.; SUH, M. D.; JUNG, T. S. Application of

proteomics for comparison of proteome of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Journal of Chromatography B**, v. 815, p. 305-314, 2005.

LIDDELL, S.; LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 153-15, 1998.

LINDSAY, D. A.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2000.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; LENZ, S. D.; DYKSTRA, C. C.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Vaccination of mice with *Neospora caninum*: response to oral challenge with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 311-315, 1998.

LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SILVA SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LOUIE, K.; SWERLOW, K. W.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; CONRAD, P. C. Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 692-699, 1997.

LOVETT, J. L.; HOWE, D. K.; SIBLEY, D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 107, p. 33-43, 2000.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, M. M.; PARMLEY, S. F.; WEISS, L. M.; WELCH, V. J.; MCGUIRE, A. M. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 354-35, 1996.

NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; BJÖRKMAN, C.; HEMPHILL, A. *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, 2001.

NAM, H. W.; KANG, S. W.; CHOI, W. Y. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. The **Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

NISHIKAWA, Y.; CLAVERIA, F. G.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H. Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. **Journal of Veterinary Medical Sciences**, v. 64, n. 2, p. 161-164, 2002a.

NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; XUAN, X.; MAKALA, L.; FUJISAKI, K.; MIKAMIT, N. H. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on *baculovirus* expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3987-3991, 2001.

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; MAKALA, L.; XUAN, X.; NAGASAWA, H. *Neospora caninum* NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 191-201, 2002b.

PIERCE - Thermo Fisher Scientific. **Purify proteins from polyacrylamide gels**. Rockford: Illinois, USA, 2004. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=File&ID=09A91BAB-5D96-478C-88BE-62D3A6B430F3>>. Acesso em: 11 Aug. 2004.

PITUCO, E. M.; SOARES, J. G.; OKUDA, L. H.; STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, p. 70, 1998. Apresentado a 11ª Reunião Anual do Instituto Biológico, 1998, São Paulo.

RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C. B.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora*

caninum oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 139-150, 2004.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-98, 1998.

SCHARES, G.; RAUSER, M.; SÖNDGEN, P.; REHBERG, P.; BÄRWALD, A.; DUBEY, J. P.; EDELHOFER, R.; CONRATHS, F. J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1123-1130, 2000.

SHIN, Y. S.; SHIN, G. W.; KIM, Y. R.; LEE, E. Y.; YANG, H. H.; PALAKSHA, K. J.; YOUN, H. J.; KIM, J. H.; KIM, D. Y.; MARSH, A. E.; LAKRITZ, J.; JUNG, T. S. Comparison of proteome and antigenic proteome between two *Neospora caninum* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 41-52, 2005.

SIMPSON, V. R.; MONIES, R. J.; RILEY, P.; CROMEY, D. S. Foxes and neosporosis. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 503, 1997.

SON, E. S.; AHN, H. J.; KIM, J. H.; KIM, D. Y.; NAM, H. W. Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n. 3, p. 241-246, 2001.

SONDA, S.; FUCHS, N.; CONNOLLY, B.; FERNANDEZ, P.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 97, p. 97-108, 1998.

SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 108, p. 39-51, 2000.

SYROVY, L.; HODNY, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 569, p. 175-196, 1991.

TENTER, A. M., JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming *coccidia*. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 69-139, 1997.

TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; MCALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200, 1999.

TUO, W.; FETTERER, R. H.; DAVIS, W. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* antigens defined by antigen-dependent bovine CD4+ T cells. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 564-568, 2005.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; VISSER, L. J. R.; VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different ages classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organism in brain, heart and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 180-185, 1997.

ANEXO

SOLUÇÕES EMPREGADAS NOS EXPERIMENTOS

A.1 Gel de empilhamento 5% – SDS-PAGE

Reagente	Volume
Solução acrilamida (Anexo A.7)	1 mL
Tampão de gel de empilhamento (Anexo A.28)	3 mL
Água ultrapura	2 mL
Persulfato de amônio 10%	30 µL
TEMED	20 µL

A.2 Gel de resolução 12,5% – SDS-PAGE

Reagente	Volume
Solução acrilamida (Anexo A.7)	7,1 mL
Tampão de gel de resolução (Anexo A.28)	6,3 mL
Água ultrapura	3,4 mL
Persulfato de amônio 10%	120 µL
TEMED	20 µL

A.3 L-arabinose 20%

Reagente	Quantidade
L - arabinose	20 g
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A.4 Low salt *Lennox Broth* com ampicilina (LB-amp)

Reagente	Concentração / Quantidade
Triptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Extrato de levedura	5 g
Ampicilina	100 mg/mL
Água ultrapura	q.s.p. 1L

Obs.: para o meio sólido, adicionar 15 g de ágar para 1 L de volume final.

A.5 PBS-TWEEN 20 – Western-blotting

Reagente	Quantidade / Volume
PBS pH 7,4 0,1M (Anexo A34)	q.s.p. 1000 mL
Tween 20	0,2 g

A.6 Solução acetato de potássio

Reagente	Quantidade / Volume
Ácido acético glacial	29,5 mL
Hidróxido de potássio	Adicionar pellets até pH 4,8
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A.7 Solução acrilamida – SDS-PAGE

Reagente	Quantidade / Volume
Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Água ultrapura	100 mL

A.8 Solução bloqueadora – Western-blotting

Reagente	Quantidade / Volume
PBS pH 7,4 0,1 M (Anexo A34)	q.s.p. 100 mL
Leite desnatado em pó	5g

A.9 Solução corante – Coomassie Brilliant Blue

Reagente	Concentração
Metanol	50%
Ácido acético	10%
Coomassie Brilliant Blue	0,5%

A.10 Solução de diaminobenzina-cloreto de cobalto – Western-blotting

Reagente	Quantidade / Volume
Diaminobenzina	6 mg
Tris-HCl 0,01M pH 7,6	9 mL
Cloreto de cobalto 0,1%.	1 mL

A.11 Solução de impregnação – Coloração por nitrato de prata

Reagente	Quantidade / Volume
Nitrato de prata	2 g
Formaldeído 37%	0,75 mL
Água ultrapura	1000 mL

A.12 Solução de parada – Coloração por nitrato de prata

Reagente	Concentração
Metanol	50%
Ácido acético	12%

A.13 Solução de parada – ELISA

Reagente	Volume
Ácido clorídrico fumegante	83 mL
Água ultrapura	q.s.p. 1 L

A.14 Solução de pré-tratamento – Coloração por nitrato de prata

Reagente	Quantidade / Volume
Tiosulfato de sódio	0,4 g
Água ultrapura	1000 mL

A.15 Solução de revelação – Coloração por nitrato de prata

Reagente	Quantidade / Volume
Carbonato de sódio	60 g
Formaldeído 37%	0,5 mL
Tiosulfato de sódio	4 mg
Água ultrapura	1000 mL

A.16 Solução desnaturante (DBB) pH 7,8

Reagente	Concentração
Fosfato de sódio	20 mM
Cloreto de sódio	500 mM
Uréia	8 M

A.17 Solução fixadora – Coloração por nitrato de prata

Reagente	Concentração / Volume
Metanol	50%
Ácido acético	12%
Formaldeído 37%	0,5 mL

A.18 Solução fixadora/descolorante – Coomassie Brilliant Blue

Reagente	Concentração
Metanol	50%
Ácido acético	10%

A.19 Solução glicose – TRIS – EDTA (GTE)

Reagente	Concentração
Glicose	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
Ácido etilenodiamino tetra-acético	10 mM

A.20 Solução hidróxido de sódio – dodecil sulfato de sódio (NaOH/SDS)

Reagente	Quantidade / Volume
Dodecil sulfato de sódio	1 g
Hidróxido de sódio (0,2 M)	q.s.p 100 mL

A.21 Solução não desnaturante (NBB) pH 8,0

Reagente	Concentração
Fosfato de sódio	50 mM
Cloreto de sódio	500 mM

Obs: para a lise celular, adicionar 0,1 mg/ml de lisozima e 10 mM de PMSF (inibidor de protease fluoreto fenil-metil-sulfonil).

A.22 Solução TRIS – EDTA (TE)

Reagente	Concentração
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
Ácido etilenodiamino tetra-acético	1 mM

A.23 Tampão de amostra (2X) – SDS-PAGE

Reagente	Volume
2-mercaptoetanol	0,32 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	0,1 mL
Dodecil sulfato de sódio 10%	1 mL
Glicerol	1 mL
Azul de bromofenol 0,5%	0,5 mL
Água ultrapura	4 mL

Obs.: o azul de bromofenol (0,1 g) deve ser dissolvido em 7 mL de etanol 100% e depois ser acrescida a água ultrapura (13 mL).

A.24 Tampão de bloqueio pH 9,6 – ELISA

Reagente	Quantidade / Volume
Carbonato de sódio	0,85 g
Bicarbonato de sódio	1,43 g
Leite desnatado em pó	50 g
Água ultrapura	q.s.p. 500 mL

A.25 Tampão de diluição – Western-blotting

Reagente	Quantidade / Volume
PBS 0,1 M pH 7,4 (Anexo A34)	q.s.p. 100 mL
Leite desnatado em pó	1 g

A.26 Tampão de diluição de amostra – ELISA

Reagente	Quantidade / Volume
PBS 0,01 M pH 7,2	q.s.p. 100 mL
Leite desnatado em pó	0,5 g

A.27 Tampão de eluição de proteínas – SDS-PAGE

Reagente	Concentração
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Cloreto de sódio	150 mM
Ácido etilenodiamino tetra-acético	0,1 mM

A.28 Tampão de gel de empilhamento pH 6,8 – SDS-PAGE

Reagente	Quantidade / Volume
Tris	3,03 g
Dodecil sulfato de sódio	0,2 g
Água ultrapura	100 mL

A.29 Tampão de gel de resolução pH 8,8 – SDS-PAGE

Reagente	Quantidade / Volume
Tris	12,11 g
Dodecil sulfato de sódio	0,27 g
Água ultrapura	100 mL

A.30 Tampão de lavagem – ELISA

Reagente	Volume
PBS 0,01 M pH 7,2	q.s.p. 200 mL
Tween 80	10 mL

A.31 Tampão de migração eletrofórica – SDS-PAGE

Reagente	Quantidade / Volume
Tris	3,0 g
Glicina	14,4 g
Dodecil sulfato de sódio	1,0 g
Água ultrapura	1000 mL

A.32 Tampão de sensibilização pH 9,6 – ELISA

Reagente	Quantidade / Volume
Carbonato de sódio	0,85 g
Bicarbonato de sódio	1,43 g
Água ultrapura	q.s.p. 500 mL

A.33 Tampão de transferência – Western-blotting

Reagente	Concentração / Volume
Tris	50 mM
Glicina	40 mM
Dodecil sulfato de sódio	0,04%
Metanol	20%
Água ultrapura	q.s.p. 1 L

A.34 Tampão fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,4 – Western-blotting

Reagente	Quantidade / Volume
Fosfato de sódio monobásico 0,2M	140 mL
Fosfato de sódio dibásico 0,2M	360 mL
Cloreto de sódio	8,5 g
Água ultrapura	q.s.p. 500 mL

A.35 Tampão revelador pH 5,0 – ELISA

Reagente	Concentração / Volume
Ácido cítrico 0,033 M	13 mL
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	12 mL
Ortofenilenodiamidina (OPD)	10 mg
Perhidrol 0,012%	20 µL