UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Identificação e caracterização de proteínas que se ligam a actina (ABPs) no apicomplexa *Neospora caninum*

Luciana Baroni

Ribeirão Preto 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Identificação e caracterização de proteínas que se ligam a actina (ABPs) no apicomplexa *Neospora caninum*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Luciana Baroni **Orientadora:** Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Aplicadas à Farmácia no dia 26/04/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 2017 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PEQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Baroni, Luciana

Identificação e caracterização de proteínas que se ligam a actina (ABPs) no apicomplexa *Neospora caninum*. Ribeirão Preto, 2017.

205 p. : il, 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Yatsuda, Ana Patrícia.

1. *Neospora caninum.* 2. Fator de despolimerização de actina (ADF/cofilina) 3. Proteína associada a ciclase (CAP).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Baroni

Identificação e caracterização de proteínas que se ligam a actina (ABPs) no apicomplexa *Neospora caninum*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui.

| Aprovado em: | | |
|--------------|-------------------|--|
| | Banca Examinadora | |
| | | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |
| | | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |
| | | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |
| | | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |
| | | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Assinatura: | |



 Aos meus pais, Arnaldo e Neide, e ao meu irmão, Leandro, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Esta tese representa a materialização de anos de trabalho e dedicação a um projeto. A sua realização foi motivada por incontáveis oportunidades de aprendizado, resultando, como esperada consequência, em um desenvolvimento de habilidades científicas e intelectuais. O desenvolvimento científico fica óbvio ao deparar-se com o conteúdo deste trabalho que, apesar de serem inevitáveis os erros, pôde ser construído sobre sólida base científica muito bem fornecida pelo Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP. O que não fica óbvio no conteúdo aqui apresentado é o desenvolvimento pessoal e é sob esse ponto de vista que os agradecimentos são embasados. O período compreendido pela construção desta tese trouxe, acima de tudo, um amadurecimento sem precedentes e um acúmulo de experiências que me fizeram enxergar o mundo sob uma ótica transformada. Cada uma das pessoas que tiveram seus caminhos cruzados com os meus durante esse período teve seu papel de contribuição para a construção deste trabalho. Algumas mais diretamente e outras mesmo que de maneira indireta deixaram um pouquinho de si em mim, tornando meu mundo mais completo. É a cada uma delas que volto um imenso sentimento de gratidão.

Meus mais calorosos agradecimentos não poderiam deixar de voltarem-se, primeiramente, à **Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui** pela carinhosa, competente e motivadora orientação deste trabalho. Sob sua orientação pude tecer importantes aprendizados e conquistas não somente durante o doutorado, como também durante todo o tempo em que tive o privilégio de fazer parte do Grupo de Pesquisas do Laboratório de Parasitologia Molecular da FCFRP.

Ao **Dr. Sutherland K. Maciver** eu agradeço pela recepção, excelente supervisão e entusiasmo, assim como por todo o incentivo e aprendizado durante a Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE-FAPESP) realizado na Universidade de Edimburgo, Escócia.

À Maraísa Palhão Verri (**Mara**), meus agradecimentos por todo o valoroso auxílio técnico, pela amizade e dedicação. Sua presença além de tornar o ambiente muito mais agradável e deixar o dia mais leve, foi de extrema importância para a realização prática deste trabalho.

Sou extremamente feliz por ter tido a rica oportunidade de conviver com os **integrantes e ex-integrantes do Grupo de Pesquisas do Laboratório de Parasitologia Molecular**: Luiz Miguel Pereira (Buda), Marcos Alexandre Bezerra, Isabel Cristina Vigatto Ferreira (Bel), Bruno Bonamichi Bueno, Letícia Pollo de Oliveira (Lê) e Júlia Audrey de Paula e as alunas de iniciação científica Gabriela, Marília, Marina e Natália. A todos o meu muito obrigada pela colaboração, companhia, amizade e pelas produtivas conversas e trocas que enriqueceram muito esta tese.

Meu agradecimento também se volta aos integrantes do Grupo de Pesquisa do Dr. Sutherland Maciver que me receberam de braços abertos e me auxiliaram na Universidade de Edimburgo: Álvaro, Zisis e Robin. Agradeço também à Kirsten que, apesar de não fazer parte do grupo de pesquisas em questão, engrandeceu este trabalho com valiosas sugestões, cruciais para o andamento do projeto. Agradeço aos **professores** que ministraram as disciplinas de pós-graduação de que participei – da FCFRP e da FMRP – durante o doutorado pela dedicação e conhecimento compartilhado.

Agradeço também aos **integrantes da banca de qualificação do doutorado** pela presença, pelas críticas altamente construtivas e pelos conselhos.

Ao Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares – LIAREC – da FCFRP, agradeço pela possibilidade de uso do microscópio confocal e ao Eduardo Tozatto, agradeço por todo o auxílio técnico prestado.

A todos os integrantes do **Laboratório de Parasitologia** da FCFRP, agradeço pelo acesso às dependências e equipamentos, assim como por toda a atenção e auxílio.

À Profa. Dra. Nádia Monesi, agradeço pela oportunidade de estágio na disciplina de Biologia Celular pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Agradeço também pela confiança e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos integrantes e ex-integrantes e do Laboratório de Análise da Expressão Gênica da FCFRP eu agradeço pelo auxílio com empréstimo de materiais, acesso a equipamentos, pelas conversas e pela companhia.

Um agradecimento especial eu faço ao **Henrique Theodoro**, secretário do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia, por toda assistência, profissionalismo e paciência.

À **Ms. Lee Dolan**, Recursos Humanos do *Centre for Integrative Physiology* da Universidade de Edimburgo, agradeço pelo atencioso auxílio que viabilizou minha estadia naquela Universidade.

À minha família, em especial aos meus pais, **Arnaldo** e **Neide**, faço um caloroso agradecimento por toda a dedicação e apoio. Reconheço os sacrifícios que fizeram e que culminaram, até aqui, na concretização deste trabalho. Agradeço também ao meu irmão **Leandro** pelo apoio e pelo grande exemplo que representa para mim.

Um agradecimento carinhoso aos amigos, especialmente à minha irmã de alma Ana Beatriz B. dos Santos (**Bia**) por toda a paciência, compreensão, apoio e companhia em todos os momentos.

A todos os antigos amigos que estão tão próximos e ao mesmo tempo tão distantes, a quem não me referirei aqui por nomes, mas para onde direciono os meus mais puros e sinceros agradecimentos pelo apoio técnico, emocional e intelectual.

Obrigada!

Luciana Baroni

APOIO FINANCEIRO

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (**CAPES**): bolsas de estudo nos primeiros quatro meses de doutorado.



- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**): bolsas de estudo de doutorado no Brasil (processo 2012/22772-2) e de doutorado sanduíche na Escócia (processo 2015/04258-8).





" O conhecimento torna a alma jovem e diminui

a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria.

?? Armazena suavidade para o amanhã.

Leonardo da Vinci *****

RESUMO

BARONI, L. Identificação e caracterização de proteínas que se ligam a actina (ABPs) no apicomplexa *Neospora caninum*. 2017. 238f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, conhecido por ser uma das principais causas de aborto parasitário em bovinos e por apresentar transmissão transplacentária. Para locomoverem-se e acessarem o conteúdo intracelular de células hospedeiras, organismos apicomplexas fazem uso de um mecanismo não convencional que se utiliza de uma maguinaria celular cujo papel central é exercido pelo motor actina-miosina, auxiliado por proteínas intermediárias e de acoragem, que realiza a propulsão do parasita na direção do movimento. Para o funcionamento dessa maquinaria, é essencial que actina esteja em sua forma filamentosa (actina-F). Porém, actinas de apicomplexas são conhecidas por serem funcional e estruturalmente não convencionais, formando filamentos pequenos e instáveis in vitro, assim como pelo predomínio de grande maioria de actina monomérica (actin-G) nas células in vivo. Desse modo, para formar e manter actina-F a dinâmica de actina desses organismos requer uma regulação precisa, que, em apicomplexas, é conduzida por um arsenal conhecidamente pequeno de proteínas que se ligam a actina (ABPs). Nosso objetivo neste estudo foi identificar e caracterizar ABPs de N. caninum. Para isso, duas ABPs de N. caninum foram estudadas: fator de despolimerização de actina (NcADF) e proteína associada a ciclase (NcCAP); também, foi gerado e caracterizado soro contra região de actina de N. caninum entre aminoácidos 201 e 310 (anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀). NcADF (correspondente ao acesso NCLIV_012510 em ToxoDB) foi submetida a caracterização molecular e bioquímica. A sua estrutura terciária foi gerada por modelagem molecular baseada em homologia, apresentando folding conservado, porém com F-loop de menor tamanho, quando comparada a ADF/cofilinas canônicas. A forma recombinante de NcADF foi expressa E. coli BL21 por plasmídeos pET32a(+) e pET28a(+) e solubilizada em tampão desnaturante e nativo, respectivamente. NcADF_pET32 foi purificada e utilizada para geração de soro anti-NcADF, que detectou ambas NcADF recombinantes, assim como proteínas endógenas em western blot 1-D e 2-D com peso molecular e pl próximos aos preditos. O soro anti-NcADF também localizou NcADF difusa no citoplasma, com menos intensidade nos polos de taquizoítas de N. caninum extracelulares. NcADF pET28 foi purificado na forma nativa e utilizado para caracterização funcional para avaliação de seu papel na dinâmica de actina liofilizada de cossedimentação, cinética polimerização de coelho. Ensaios de е despolimerização, viscosimentria de baixo cisalhamento (queda de bola), estado estacionário e ligação entre actina-G e NcADF, em conjunto, mostraram que NcADF causa despolimerização de actina-F, realiza sequestro de monômeros de actina e quebra de filamentos. NcCAP foi submetida a caracterização molecular e foi identificada como produto de expressão do gene de acesso NCLIV_054140. NcCAP recombinante foi expressa em pET32a(+) e pET28a(+) predominantemente em corpos de inclusão e foi solubilizada em tampão desnaturante. A forma purificada de pET32_NcCAP, identificada por espectrometria de massas, foi utilizada para imunização e o soro resultante detectou NcCAP recombinante e endógena por western blot 1-D e 2-D, apresentando bandas e spots de peso molecular e pl próximos ao esperado. O soro anti-NcCAP também localizou NcCAP em taquizoítas

extracelulares de *N. caninum* difusa no citoplasma e/ou com predomínio na região periplasmática da célula. Por fim, o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi gerado, sendo capaz de detectar proteínas em sua forma nativa e realizar marcação na região periférica e, possivelmente, nuclear de taquizoítas de *N. caninum* extracelulares. A caracterização de ABPs de *N. caninum* feita neste trabalho amplia o conhecimento sobre a conservação dessas proteínas ao longo do filo Apicomplexa. Ademais, representa uma contribuição para o entendimento da dinâmica de actina e, por consequência, futuramente, pode colaborar para a elucidação de mecanismos-chave para a sobrevivência e disseminação dos parasitas pelo seu hospedeiro.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; proteínas que se ligam a actina (ABP); fator de despolimerização de actina (ADF/cofilina); proteína associada a ciclase (CAP); actina.

ABSTRACT

BARONI, L. Identification and characterization of actin binding proteíns (ABPs) from the apicomplexan *Neospora caninum*. 2017. 238f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Neospora caninum is an obligate intracellular parasite that belongs to the phylum Apicomplexa. It is known as one of the main causes of infectious abortion in cows and for its efficient transplacentary transmission. Apicomplexan organisms use a phylumspecific mechanism of invasion and gliding motility, which use an unusual cellular machinery based on an actin myosin motor assisted by intermediary and anchoring proteins that creates the traction force to impulse the parasite forward. Filamentous actin (F-actin) is essential to the appropriate functioning of this machinery, although apicomplexan unconventional actin forms small and unstable filaments in vitro and is found preponderantly as monomer (G-actin) in cells. Thus, the parasites need actinbinding proteins (ABPs) to strictly regulate actin dynamics and to form and maintain Factin when it is necessary to the cell. Here, we aimed at identifying and characterising ABPs from *N. caninum*. Two ABPs were characterised: actin-depolymerising factor (NcADF) and cyclase-associated protein (NcCAP) from N. caninum. In addition, a serum against the actin region between amino acids 201 and 310 (anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀) was raised. NcADF, which corresponds to identification NCLIV_012510 on ToxoDB, was molecular and biochemically characterised. Firstly, the tertiary structure of NcADF was generated by molecular modelling based on homology. Comparing to canonical ADF/cofilins, NcADF presented a conserved folding, albeit its smaller F-loop. The recombinant form of NcADF was expressed in E. coli BL21 using pET32a(+) and pET28a(+) plasmids and solubilized in denaturing and native buffers, respectively. Polyclonal antibodies were raised in mice against purified NcADF pET32, which was able to detect both forms of recombinant NcADF as well as proteins in 1-D and 2-D western blot with expected molecular weight and isoelectric point (pl). Additionally, NcADF was localised in extracellular *N. caninum* tachyzoites as a diffuse pattern on cytoplasm with less intensity in both poles. NcADF pET28 was successfully purified in native form and used for functional characterisation to evaluate the role of recombinant NcADF on lyophilised rabbit actin dynamics. Together, co-sedimentation, polymerisation and depolymerisation kinetic, low shearing viscometry (falling ball), steady state, and G-actin and NcADF binding assays showed that NcADF was able to depolymerise actin-F, sequester actin monomers, and sever filaments. Moreover, NcCAP (identification NCLIV_054140) was also characterised. Recombinant NcCAP was expressed in pET32a(+) and pET28a(+) plasmids predominantly in inclusion bodies and was solubilised in denaturing buffer. NcCAP_pET32 was purified and identified by mass spectrometry. Then, the polyclonal antibodies against this recombinant protein was generated in mice. It was able to detect recombinant and endogenous NcCAP, presenting bands and spots in 1-D and 2-D western blot with molecular weight and pl quite near to the predicted ones. NcCAP was localised as a diffuse pattern on cytoplasm and/or predominantly on periplasmic regions of extracellular taclyzoites of N. caninum. Finally, the serum containing anti-NcAct201-310 polyclonal antibodies was raised in mice. It detected endogenous proteins mainly in native form and localised them on periplasmic and possibly nuclear region in extracellular N. caninum tachyzoites. The characterisation of N. caninum ABPs

extends our understanding of these proteins conservation and their function throughout the Apicomplexa phylum. Furthrmore, it represents a contribution to the field towards the comprehention of actin dynamics and in the future might provide information for important mechanisms of dissemination and survival of the parasite at its host.

Keywords: *Neospora caninum;* actin-binding proteins (ABP); actin-depolimerising factor (ADF/cofilin); cyclase-associated protein (CAP); actin.



RESUMEN

BARONI, L. Identificación e caracterización de proteínas de unión a actina (PUAs) en el apicomplexa *Neospora caninum.* 2017. 238f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Neospora caninum es un parásito intracelular obligatorio que pertenece al filo Apicomplexa; es conocido por ser una de las principales causas de aborto infeccioso en bovinos y por su eficiente transmisión transplacentaria. Los organismos apicomplexa presentan un mecanismo específico de invasión y locomoción que utilizan para tener acceso al contenido intracelular dela célula huésped, mediante el uso de una maquinaria celular basada en un motor de actina-miosina asistido por proteínas intermediarias y de anclaje que producen la fuerza de tracción necesaria para impulsar al parásito en la dirección correcta. La actina en su forma filamentosa (F-actina), es esencial para el funcionamiento adecuado de esta maquinaria, sin embargo la actina presente en los apicomplexa es conocida por ser estructural y funcionalmente no-convencional, encontrarse predominantemente como monómero (G-actina) en células in vivo y además por formar pequeños e inestables filamentos in vitro. Por tal motivo, los parásitos necesitan de un grupo proteínas de unión a actina (PUAs) que cumplen la función de regular estrictamente la dinámica de la actina además de formar y mantener su forma filamentosa (F-actina) cuando es necesaria para la célula. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar las PUAs de *N. caninum*. Para la realización del presente trabajo, fueron caracterizadas dos PUAs: el factor de despolimerización de actina (NcADF) y la proteína asociada a ciclasa (NcCAP) de N. caninum. Además, fue producido un suero contra la región de actina entre los aminoácidos 201 y 310 (anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀). En primer lugar, NcADF (con identificación NCLIV 012510 en ToxoDB) fue caracterizado bioquímica y molecularmente. Para eso, fue obtenida la estructura terciaria de NcADF mediante modelado molecular. NcADF presentó un plegamiento conservado, pero con un Floop menor en comparación con ADF/cofilinas canónicas. La forma recombinante de NcADF fue expresada en bacterias E. coli BL21 utilizando los plásmidos pET32a(+) y pET28a(+) y fue solubilizada en tampon desnaturalizante y nativo, respectivamente. Los anticuerpos policionales anti NcADF_pET32 purificados fueron producidos en ratones, los mismos que fueron suficientes para detectar las dos formas de NcADF recombinante, así como proteínas en western blot 1-D y 2-D con peso molecular y punto isoeléctrico (pl) esperados. Adicionalmente, fue detectado NcADF difuso en el citoplasma, con menor intensidad en las extremidades de taquizoitos extracelulares de N. caninum. NcADF_pET28 fue purificada en su forma nativa y utilizada para caracterización funcional con la finalidad de evaluar el papel de NcADF recombinante en la dinámica de actina liofilizada de conejo. Los ensayos de co-sedimentación, cinética de polimerización y despolimerización, viscosimetría de baja cizalladura (bola descendiente), estado estacionario y unión entre actina-G y NcADF mostraron en conjunto que NcADF fue capaz de despolimerizar actina-F, secuestrar monómeros de

actina y cortar filamentos. Además, NcCAP (con identificación NCLIV_054140) fue caracterizada molecularmente. NcCAP recombinante fue expresa en plásmidos pET32a(+) y pET28a(+) con predominancia en cuerpos de inclusión, y fue solubilizada en tampón desnaturalizante. NcCAP_pET32 fue purificada e identificada mediante espectrometría de masas. Los anticuerpos policionales contra esta proteína recombinante fueron generados en ratones. Los anticuerpos detectaron tanto la forma recombinante como la endógena de NcCAP, presentando bandas y spots en western blot 1-D y 2-D con peso molecular y pl bastante cercano a los predichos. NcCAP presento un patrón difuso en el citoplasma y/o con presencia predominante en las regiones periplásmicas de taquizoitos extracelulares de N. caninum. Finalmente, el suero que contenía los anticuerpos policionales anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ fue generado en ratones y fue capaz de detectar proteínas endógenas principalmente en forma nativa y las localizó en región periplásmica y posiblemente nuclear en taquizoitos extracelulares de N. caninum. La caracterización de las PUAs de N. caninum realizada en el presente trabajo, extiende nuestra comprensión sobre la conservación y función de estas proteínas en el filo Apicomplexa, además de representar una contribución al entendimiento de la dinámica de actina, lo que podría proporcionar información para importantes mecanismos de diseminación y supervivencia del parásito en su huésped.

Palabras clave: *Neospora caninum*; proteínas de unión a actina (PUA); factor de despolimerización de actina (ADF/cofilin); proteína asociada a ciclasa (CAP); actina.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1. | Ciclo de vida de Neospora caninum |
|------------|--|
| Figura 2. | Morfologia da forma taquizoíta e invasão da célula hospedeira8 |
| Figura 3. | Estrutura de actina e polimerização do filamento de actina10 |
| Figura 4. | Modelo proposto para polimerização de actina de Toxoplasma gondii 13 |
| Figura 5. | Fluxograma mostrando delineamento experimental do tabalho27 |
| Figura 6. | Sequência proteica de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) submetida a modelagem molecular baseada em homologia |
| Figura 7. | Esquema das etapas para modelagem molecular baseada em homologia |
| Figura 8. | Mapa do plasmídeo pGEM-Teasy, da Promega |
| Figura 9. | Mapas dos plasmídeos de expressão |
| Figura 10. | Esquema mostrando o ensaio de queda de bola (viscosimentria) 58 |
| Figura 11. | Detecção de domínios conservados em NCLIV_01251063 |
| Figura 12. | Alinhamento de sequências proteicas de ADF/cofilinas de organismos representativos e estrutura secundária de fator de despolimerização de actina de <i>Toxoplasma gondii</i> |
| Figura 13. | Alinhamento de sequências proteicas de ADF/cofilina correspondentes aos modelos estruturais selecionados |
| Figura 14. | Alinhamento estrutural de ADF/cofilinas selecionadas para modelagem molecular de fator de despolimerização de actina de <i>N. caninum</i> (NcADF) |

| Figura 25. | Expressão de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) em pET28a(+)84 |
|------------|--|
| Figura 26. | Expressão de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) em pET32a(+)85 |
| Figura 27. | Purificação em resina de níquel de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) recombinante |
| Figura 28. | Teste de solubilização de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) recombinante |
| Figura 29. | Purificação da proteína recombinante fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF)89 |
| Figura 30. | Expressão e purificação da proteína recombinante fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) solúvel90 |
| Figura 31. | Detecção de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF)91 |
| Figura 32. | Detecção de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) endógeno por padrão bidimensional. SDS-PAGE 12,5% e <i>strip</i> 3-11 não linear (NL)93 |
| Figura 33. | Análise de detecção de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora</i> <i>caninum</i> (NcADF) recombinante solúvel expressa em pET28a(+) pelo soro anti-NcADF |
| Figura 34. | Imunolocalização do fator de despolimerização de actina de <i>Neospora</i> <i>caninum</i> (NcADF) em taquizoítas de <i>N. caninum</i> |
| Figura 35. | Despolimerização de actina-F de coelho por fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF)98 |
| | |

- Figura 38. Fluorescência de polimerização de PI-actina em função do tempo em presença ou ausência de 10 μM de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) e 25 mM de tampão fosfato pH 8,0 .102
- Figura 40. Fluorescência de despolimerização de PI-actina em presença ou ausência de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) em condições favoráveis à despolimerização de filamentos

- Figura 43. Avaliação da interação de actina de coelho com fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF)......111

- Figura 46. Detecção de domínios conservados em NCLIV_054140115

| Figura 57. | Avaliação de soroconversão de animais imunizados com a proteína recombinante NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ 132 |
|------------|--|
| Figura 58. | Avaliação de afinidade por actina endógena de <i>Neospora caninum</i> nativa ou desnaturada por soro anti-NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ 134 |
| Figura 59. | Detecção de actina endógena de Neospora caninum (NcAct) em condições nativas135 |
| Figura 60. | Detecção de actina endógena em extrato total de Neospora caninum |
| Figura 61. | Imunolocalização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcAct) em taquizoítas de <i>N. caninum</i> |
| Figura 62. | Alinhamento estrutural entre estruturas-molde de ADF/cofilinas e estrutura terciária predita de fator de despolimerização de actina de <i>Neospora caninum</i> (NcADF) |
| Figura 63. | Sítios de ligação de actina-F 2 em fator de despolimerização de actina 1 de <i>Plasmodium falciparum</i> (PfADF1)154 |
| Figura 64. | Representação do efeito de ultrapassagem ou overshoot |
| Figura 65. | Domínios de Srv2/CAP160 |
| Figura 66. | Estrutura terciária de actina I de <i>Plasmodium falciparum</i> (PfAct I) com destaque para região compreendendo aminoácidos 201-310 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1. | Primers util | lizados | para a am | plificação | o dos genes | s de Al | BPs AD | F e CA | ٩P |
|------------|--|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | 2510 e | | 4140) | | | | | 54 |
| Tabela 2. | Reações | de | digestão | com | <i>Bam</i> H | I | e H | lind | III 37 |
| Tabela 3. | Condições u 11 NL em e | utilizad quipan | as para a f nento <i>Ettan</i> | ocalizaçã IPGPhor | o isoelétric 3 | a das | tiras de | e 7 cm : 2 | 3- 48 |
| Tabela 4. | Detalhes da e antígenos | a imuni -contro | zação de c ble | amundon | gos por pr | oteínas | s recom | ibinante | es 50 |
| Tabela 5. | Identidade/s | similari | dade (%) | ADF/co | ofilinas de | e dive | ersas | espécie | es 65 |
| Tabela 6. | ADF/cofilina estrutural de (NcADF) | as sele e fator | ecionadas de despolir | como po nerização | tenciais m o de actina | odelos de <i>Ne</i> | s para cospora | prediçã <i>caninu</i> | ão <i>IM</i> 66 |
| Tabela 7. | Identidade/s BLAST | similari | dade (%) e | ntre os m | iodelos de | ADF s | elecion | ados p | or 68 |
| Tabela 8. | Valores do entre estrute | Desvie uras te | o Médio Q rciárias sele | uadrático ecionada | (RMSD) s de ADF/c | de car ofilinas | bonos- s | alfa (C | α) 70 |
| Tabela 9. | Avaliação d actina de <i>N.</i> | los mo . <i>canin</i> | odelos cons um | struídos (| de fator de | e desp | olimeriz | zação d | de 73 |
| Tabela 10. | Estatísticas de fator de (NcADF) | dos gr e des | áficos de Ra polimerizaç | amachan :ão d e | dran para c actina d | os mod e <i>Nec</i> | elos co ospora | nstruído <i>caninu</i> | os 1m 74 |
| Tabela 11. | Validação c actina de <i>N.</i> | los mo . <i>canin</i> | odelos cons <i>um</i> (NcADF | struídos (| de fator de finamento | e desp | olimeriz | zação c | de 76 |

| Tabela 12. | Estatísticas dos gráficos de Ramachandran para os modelos construídos |
|------------|---|
| | de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) |
| | após refinamento77 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| (NH4)2SO4 | Sulfato de amônio |
|-------------------|---|
| °C | Graus Célcius |
| μg | Micrograma |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| 1-D | Uma dimensão |
| 2-D | Duas dimensões |
| Å | Ângstron |
| A ₂₆₀ | Absorbância em 260 nm |
| A ₂₈₀ | Absorbância em 280 nm |
| ABP | Proteína que se liga a actina (actin-binding protein) |
| ACN | Acetonitrila |
| Actina-F | Actina filamentosa |
| Actina-G | Actina monomérica |
| ADF | Fator de Despolimerização de actina (actin-depolymerisation factor) |
| ADF-H | Domínio de homologia de ADF |
| ADP | Adenosina 5'-difosfato |
| ADP-actina | Actina associada a ADP |
| ALA | Aminoácido alanina |
| AMA | Antígeno apical de membrana (apical-membrane antigen) |
| AMBER | Assisted Model Building with Energy Refinement |
| APBS | Adaptative Poisson-Boltzmann Solver |
| ASN | Aminoácido asparagina |
| ASP | Aminoácido aspartato |
| ATP | Adenosina 5'-trifosfato |
| ATP-actina | Actina associada a ATP |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BLASTp | BLAST de proteína |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| cAMP | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico |
| CAP | Proteína associada a ciclase (cyclase-associated protein) |

| Сс | Concentração crítica |
|---------------------------------|--|
| cDNA | DNA complementar |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CH₃COOK | Acetato de potássio |
| CHAPS | 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato |
| cm ² | Centrímetro quadrado |
| CO ₂ | Gás carbônico |
| Сα | Carbono alfa |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAg | DNA genômico |
| DOPE | Energia discreta otimizada da proteína (Discrete optimised protein |
| | energy) |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetrácetico |
| EGTA | Ácido etileto-glicol-bis (β-aminoetil-éter)-N,N,N',N',-tetracético |
| ELC | Cadeia leve essencial (essential light chain) |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FCFRP-USP | Faculdade de Ciências Farmcêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| g | Gravidade |
| GAC | Conector associado ao glideossomo (glideosome-associated |
| | conector) |
| GAP | Proteína associada ao glideossomo (glideosome-associated protein) |
| GLY | Aminoácido glicina |
| GPI | Glicosil fosfatidil inositol |
| H ₃ PO ₄ | Ácido fosfórico |
| HCI | Ácido clorídrico |
| HeNe | Hélio-Neônio |
| HEPES | Ácido N-[2-hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfônico] |
| HFD | Domínio enovelado helicoidal (<i>helical folded domain</i>) |
| IMC | Complexo de membrana interno (inner membrane complex) |
| IPTG | Isopropiltiogalactosídeo |
| K ₂ HPO ₄ | Fosfato de potássio dibásico |

| kb | Quilobase |
|----------------------------------|--|
| KCI | Cloreto de potássio |
| kDa | Quilodálton |
| kg | Quilograma |
| KH ₂ PO ₄ | Fosfato de potássio monobásico |
| Kobs | Constante de velocidade |
| kV | Quilovolts |
| LB | Luria-Bertani |
| LYS | Aminoácido lisina |
| Μ | Molar |
| MET | Aminoácido metionina |
| Mg-ATP-actina | Actina associada a magnésio e ATP |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| MgSO ₄ | Sulfato de Magnésio |
| MIC | Proteína de micronema (microneme protein) |
| MJ | Junção móvel (<i>moving junction</i>) |
| ml | Mililitro |
| MLC | Miosina de cadeia leve (myosin light chain) |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| МуоА | Miosina A |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaH ₂ PO ₄ | Fosfato monossódico |
| NaHCO₃ | Bicarbonato de sódio |
| NaN ₃ | Azida de sódio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NCBI | National Center for Biotecnology Information |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetro |
| OD | Densidade ótica |
| OD ₆₀₀ | OD a 600 nm |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pb | Par de base |

| PBS | Tampão fosfato-salino |
|------------------|---|
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PDB | Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>) |
| pl | Ponto Isoelétrico |
| Pi | fostato inorgânico ou γ-fostato |
| PI-actina | Actina associada ao pireno |
| PIP ₂ | Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonila |
| PV | Vacúolo parasitóforo (parasitophorous vacuole) |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| Ras | Vírus do sarcoma de rato (<i>rat sarcoma virus</i>) |
| RMSD | Desvio médio quadrático (root mean square deviation) |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RON | Proteína de pescoço de roptria (<i>rhoptry neck protein</i>) |
| ROP | Proteína de bulbo de roptria (<i>rhoptry body protein</i>) |
| rpm | Rotação por minuto |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SAG | Antígeno de superfície ancorado a GPI (GPI-anchored surface |
| | antigens) |
| SAVES | The structure analysis verification server |
| SDS | Dodecilsulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS |
| SER | Aminoácido serina |
| Srv2 | Supressor de Ras2(V19) |
| ТВ | Terrific Broth |
| ТМВ | Tetrametilbenzidina |
| TRAP | Proteína anônima relacionada a trombospondina (thrombospondin- |
| | related anonymous protein) |
| Tris | 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol |
| UA | Unidade arbitrária |
| UCLA | Universidade da Califórnia em Los Angeles |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| V | Volts |
| Vero | <i>Verda reno</i> (rim verde - células epiteliais de rim de macaco verde) |

| W | Watt |
|-----|---|
| WH2 | Domínio de homologia a proteína da Síndrome Wiscott Aldrich 2 |
| | (Wiscott Aldroch Syndome protein homology 2 domain) |
| XAC | Xenopus ADF/cofilin (ADF/cofilina de Xenopus) |
| ΥT | Triptona e extrato de levedura |
| μF | Microfaraday |
| | |



SUMÁRIO

| Resu | mo | i |
|------------|--|------|
| Abstr | act | iii |
| Resu | men | v |
| Lista | de Figuras | vii |
| Lista | de Tabelas | xiii |
| Lista | de Siglas e Abreviaturas | XV |
| Liota | | |
| 1 IN | | 2 |
| 1. 11 | | £ |
| 1.1 | Neospora caninum | |
| 1.2 | Invasão e locomoção no filo Apicomplexa | 5 |
| 1.3 | Actina | |
| 1.3.1 | Estrutura de actina | |
| 1.3.2 | Dinâmica de actina | 10 |
| 1.4 | Actina no filo Apicomplexa | |
| 1.5 | Proteínas que se ligam a actina (ABPs) | |
| 1.5.1 | Nucleação | |
| 1.5.2 | Sequestro de monômero | |
| 1.5.3 | Quebra de filamentos | |
| 1.5.4 | Despolimerização | |
| 1.5.5 | Capeamento | |
| 1.5.6 | Formação de retículos | |
| 1.6 | ABPs em apicomplexas | |
| 1.6.1 | Fator de despolimerização de actina ou cofilina (ADF/cofilina) | |
| 1.6.2 | Proteína associada a ciclase (CAP) | |
| 1.7 | Justificativa | |
| 2 0 | BIETIVOS | 25 |
| 2. 0 | | |
| 2.1 | Geral | |
| 2.2 | Específicos | |
| | | - |
| 3. M | ATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| • • | | |
| 3.1 | | |
| 3.2 | Manutenção de taquizoitas de <i>N. caninum</i> | |
| 3.3 | Analises in silico | |
| 3.3.1 | Seleçao de proteinas que se ligam a actina – ABPs | |
| 3.3.2 | Analises computacionais das sequencias de ABPs | 29 |
| 3.3.3 | Modelagem molecular baseada em homología | 30 |
| 3.3.3.1 | 1 Identificação dos moldes e alinhamento | |
| 3.3.3.2 | 2 Construção dos modelos estruturais | |
| 3.3.3.2 | 2.1 Tutorial básico | |
| 3.3.3.2 | 2.2 Tutorial avançado | |
| 3.3.3.3 | 3 Refinamento e validação dos modelos | |
| 3.4 | Clonagem e expressão de proteínas recombinantes | |
| 3.4.1 | Extração de RNA | 33 |
| 3.4.2 | Sintese de cDNA | |
| 3.4.3 | Delineamento de <i>primers</i> | |

| 211 | Rossão em Cadaja da Polimerada (PCP) | 24 |
|-------------------------|--|----------|
| 3.4.4 | Clanagem em placmídes de elenagem – pCEM T Easy | 34 วา |
| 3.4.0 2 4 7 | Clonagem em plasmideos de cionagem – pGEIN-7 Easy | 35 26 |
| 3.4.7 | contagent en plasmueos de expressão | 30 26 |
| 3.4.7.1 | poemiper, perzoa(+) e persoa (+). | סכ דר |
| 3.4.7.1.1 | Freparo dos plasifilideos de expressão e dos inserios | 37 20 |
| 3.4.7.1.2 | Eutropão do Inserio nos plasifideos de expressão | 38 |
| 3.4.8 | Extração de DNA plasmidial - Miniprep | 38 |
| 3.4.8.1 | Extração por <i>kit</i> comercial | 38 20 |
| 3.4.0.Z | | 39 |
| 3.4.8.2.1 | Punnicação em coluna | 39 |
| 3.4.8.2.2 | Eletreference en cel de exerces | 39 |
| 3.4.9 | Eletrororese em gel de agarose | 40 |
| 3.4.10 | Purificação de material genetico a partir de gel de agarose | 40 |
| 3.4.11 | | 41 |
| 3.4.12 | I ransformação em cepas de Escherichia coli | 41 |
| 3.4.12.1 | Preparo de celulas eletrocompetentes | 41 |
| 3.4.12.1. | 1 I ransformação por eletroporação | 42 |
| 3.4.12.2 | Preparo de celulas quimiocompetentes | 42 |
| 3.4.12.2. | 1 I ransformação química | 43 |
| 3.4.13 | Expressão heteróloga | 43 |
| 3.4.13.1 | Expressão heterologa em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | 43 |
| 3.4.13.1. | 1 Extração total | 43 |
| 3.4.13.1. | 2 Testes de expressão e solubilidade de NcADF | 44 |
| 3.4.13.1. | 2.1 Extração total | 44 |
| 3.4.13.1. | 2.2 Teste de expressão em presença de etanol | 44 |
| 3.4.14 | Purificação de proteínas recombinantes em resina de níquel | 45 |
| 3. <mark>4</mark> .14.1 | Purificação em tampão desnaturante | 45 |
| 3.4.14.2 | Purificação em tampão não-desnaturante | 46 |
| 3.4.14.2. | 1 Após verificação de solubilidade das proteínas recombinantes | 46 |
| 3.4.14.2. | 2 Purificação de NcADF solúvel | 46 |
| 3.5 El | letroforese em gel de acrilamida | 46 |
| 3.5.1 | Desnaturante (SDS-PAGE) | 46 |
| 3.5.2 | Não-desnaturante (PAGE) | 47 |
| 3.5.3 | SDS-PAGE 2-D | 47 |
| 3.5.3.1 | Primeira dimensão ou focalização isoelétrica | 47 |
| 3.5.3.2 | Segunda dimensão ou SDS-PAGE | 48 |
| 3.6 Ex | xtratos totais de <i>N. caninum</i> e células Vero | 49 |
| 3.7 In | nunização de camundongos | 49 |
| 3.8 W | /estern blot | 50 |
| 3.9 D | ot blot | 51 |
| 3.10 Ei | nsaios Imunoenzimáticos – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) | 51 |
| 3.10.1 | ELISA sobre células íntegras | 51 |
| 3.10.2 | ELISA sobre proteínas purificadas ou extrato total | 52 |
| 3.10.3 | Análises estatísticas | 53 |
| 3.11 In | nunofluorescência | 53 |
| 3.12 Es | spectrometria de massas (MALDI) | 54 |
| 3.12.1 | Banda contendo NcCAP recombinante e spots de SDS-PAGE 2-D | 54 |
| 3.12.1.1 | Descoloração das bandas | 54 |
| 3.12.1.2 | Digestão com tripsina | 55 |
| 3.12.2 | Análise por MALDI | 55 |
| 3.12.3 | Análise dos dados | 55 |
| 3.12.4 | Caracterização bioquímica | 55 |

| 3.12.4.1 Preparação de actina e NcADF | 55 |
|--|----------|
| 3.12.4.2 Ensaio de cossedimentação | 56 |
| 3.12.4.3 Cinética de actina | 56 |
| 3.12.4.3.1 Polimerização | 56 |
| 3.12.4.3.2 Despolimerização | 57 |
| 3.12.4.4 Ensaio de queda de bola – viscosimetria de baixo cisalhamento | 57 |
| 3.12.4.5 Estado estacionário | 58 |
| 3.12.5 Interação com actina-G | 58 |
| 3.12.5.1 Gel nativo | 58 |
| 3.12.5.2 Gel bidimensional de ensaio de interação | 59 |
| 3.12.5.3 Indução química de formação de ligações cruzadas (cross-linking) | 59 |
| 3.12.5.3.1 Formaldeído | 60 |
| 3.12.5.3.2 EDC (etildimetilaminopropilcarbodiimida) | 60 |
| 4. RESULTADOS | .62 |
| 4.1 Estar de despelimerização de actina de Magapara ca <i>ninum</i> (NeADE) | 62 |
| 4.1 Tator de despointienzação de actina de Neospora carimum (NCADI) | 02 62 |
| 4.1.1 Analises III silled | 02 |
| 4.1.1.1 DLAST, doinninos conservados e alimitamentos | 62 |
| 4.1.1.2 Predição da estrutura terciana de NCADE | 66 |
| 4.1.1.2.1 Seleção e analise dos modelos estruturais | 66 |
| 4.1.1.2.2 Construção e validação inicial do modelos | /1 |
| 4.1.1.2.3 Refinamento e validação final do modelo | 75 |
| 4.1.1.2.4 Descrição da estrutura NCADF_25_avançãoo_REF (NCADF) | // |
| 4.1.2 Clonagem e expressao | 80 |
| 4.1.2.1 Clonagem e purificação de NCADF recombinante soluvel | 86 |
| 4.1.3 Detecçao e localização de NCADF | 90 |
| 4.1.3.1 Detecçao de NCADF recombinante e nativa | 91 |
| 4.1.3.2 SDS-PAGE 2-D | 92 |
| 4.1.3.2.1 Identificação dos <i>spots</i> | 93 |
| 4.1.3.3 Avaliação de reatividade do soro anti-NcADF contra NcADF solúvel | 94 |
| 4.1.3.4 Imunolocalização | 96 |
| 4.1.4 Caracterização bioquímica e funcional de NcADF recombinante | 97 |
| 4.1.4.1 Cossedimentação com actina | 97 |
| 4.1.4.2.1 Cinética de polimerização | 99 |
| 4.1.4.2.1.1 Cinética de polimerização de actina com ou sem fosfato | 101 |
| 4.1.4.3 Queda da bola – viscosidade de baixo cisalhamento | 105 |
| 4.1.4.4 Estado estacionário | 106 |
| 4.1.4.5 Interação de NcADF com actina | 109 |
| 4.2 Proteína associada a ciclase de <i>N. caninum</i> (NcCAP) | 115 |
| 4.2.1 Análises in silico | 115 |
| 4.2.1.1 Blast, domínios conservados e alinhamentos | 115 |
| 4.2.2 Clonagem e expressão | 118 |
| 4.2.3 Detecção e localização de NcCAP | 124 |
| 4.2.3.1 Detecção de NcCAP recombinante e endógena | 124 |
| 4.2.3.2 Eletroforese 2-D | 125 |
| 4.2.3.2.1 Identificação dos <i>spots</i> | 126 |
| 4.2.3.3 Imunolocalização de NcCAP | 127 |
| 4.3 Caracterização do soro anti- NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ | 129 |
| 4.3.1 Reconhecimento de actina desnaturada ou nativa por anti-NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ | 132 |
| 4.3.1.1 Imunolocalização | 137 |

| 5. DISCUSSÃO | 140 |
|--|-----------------|
| 5.1 Fator de despolimerização de actina de Neospora cani | num (NcADF) 140 |
| 5.1.1 Despolimerização | |
| 5.1.2 Sequestro de monômeros | |
| 5.1.3 Quebra de filamentos de actina | |
| 5.2 Proteína associada a ciclase de N. caninum (NcCAP) | |
| 5.3 Caracterização do soro anti-NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ | |
| 5.4 Considerações finais | |
| 5.4.1 NcADF | |
| 5.4.2 NcCAP | |
| 5.4.3 NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ | |
| 6. CONCLUSÕES | 170 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 172 |
| APÊNDICES | 191 |
| ANEXOS | |



1. INTRODUÇÃO

1.1 Neospora caninum

Neospora caninum, agente etiológico da neosporose, é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa. Foi observado pela primeira vez em 1984 como parasita morfologicamente semelhante a *Toxoplasma gondii* em cães que apresentavam sinais neurológicos, porém sem detecção de anticorpos contra este protozoário (BJERKÅS et al., 1984). Em 1988, Dubey et al. descreveram este parasita como *N. caninum*, que até então era diagnosticado por engano como *T. gondii*. Desde então, *N. caninum* tem emergido como um importante causador de aborto e perdas neonatais em bovinos (ALMERÍA; LOPEZ-GATIUS, 2015; DUBEY et al., 2007; DUBEY; LINDSAY, 1996; JENKINS et al., 2002; PESSOA et al., 2016) e por apresentar uma eficiente transmissão transplacentária, também denominada congênita ou vertical (DUBEY, 2003; PARÉ et al., 1996).

O ciclo de vida de *N. caninum* é heteroxênico (figura 1), apresentando como hospedeiros definitivos cães (*Canis familiaris*), coiotes (*Canis latrans*) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2004), dingos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobos cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011), enquanto que bovinos e uma ampla variedade de ruminantes e animais de sangue quente no geral representam os hospedeiros intermediários (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 2006).

São três os estágios infectantes que compõem o ciclo de vida do parasita: taquizoítas, cistos teciduais e oocistos (DUBEY, 2003). Taquizoítas e cistos teciduais são encontrados de forma intracelular em hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2002). Os oocistos não esporulados são eliminados através das fezes dos hospedeiros definitivos (LINDSAY et al., 1999) e esporulam fora do organismo do hospedeiro (DUBEY, 2003). Os hospedeiros definitivos podem infectar-se a partir da ingestão de material placentário ou de tecidos contendo bradizoítas provenientes de animais infectados (GONDIM et al., 2002; DIJIKSTRA et al., 2002, LINDSAY et al., 1999).



Figura 1. **Ciclo de vida de Neospora caninum.** Os hospedeiros intermediários adquirem a doença ao ingerir oocistos esporulados, enquanto que hospedeiros definitivos são infectados ao ingerir tecidos contaminados com cistos teciduais contendo bradizoítas. O parasita também pode ser transmitido por rota vertical para o feto. (Adaptado de: DUBEY, 2003).

A transmissão e manutenção da infeção no bovino pode acontecer por via horizontal ou vertical (McALLISTER et al., 2016), sendo esta subdividida em transmissão endógena e transmissão exógena (TREES; WILLIAMS, 2005). A ingestão de oocistos esporulados disponíveis no ambiente é a única forma descrita de transmissão pós-natal para o gado bovino (McCANN et al., 2007), significando, portanto, que a proximidade entre cães e bovinos representa uma rota de transmissão horizontal do parasita (PIAGENTINI et al., 2012). A transmissão vertical exógena acontece quando a fêmea adquire a infecção (ou seja, ingere o oocisto esporulado) quando está prenhe. A transmissão vertical endógena ocorre através de fêmeas que apresentavam a infecção crônica antes da prenhez (TREES; WILLIAMS, 2005). A transmissão vertical entre a fêmea e o feto representa uma importante rota de transmissão de *N. caninum* no gado bovino, uma vez que se caracteriza pela maior causa de aborto tanto nos rebanhos leiteiro quanto de corte (DUBEY; SCHARES, 2011), além de representar um importante meio de propagação da infecção por sucessivas gerações (DUBEY et al., 2006).

INTRODUÇÃO

Infecções por *N. caninum* estão associadas a perdas econômicas decorrentes de custos atribuídos a fetos perdidos, despesas profissionais e diagnóstica (DUBEY; SCHARES, 2011; DUBEY, 2003; REICHEL et al., 2013), assim como retorno ao ciclo estral, diminuição da produção de leite, aumento do intervalo entre as crias e desvalorização reprodutiva do rebanho (TREES et al., 1999). A diminuição da produção de leite no rebanho leiteiro pode ser atribuída ao aborto em si e não há consenso sobre a associação entre diminuição da produção de leite e infecção por N. caninum em vacas infectadas que não abortam (McALLISTER et al., 2016). Uma revisão da literatura abrangendo 10 países permitiu estimar que a probabilidade de abortos causados em animais infectados com N. caninum é três vezes maior no rebanho de corte do que no leiteiro (REICHEL et al., 2013). Por outro lado, os prejuízos econômicos causados aos produtores de gado bovino foram estimados em mais de um bilhão de dólares anuais, sendo que 64% dessas perdas estão associadas ao gado leiteiro; no Brasil, os prejuízos anuais puderam se estimados em aproximadamente 150 milhões de dólares (REICHEL et al., 2013). Como discutido no estudo, é provável que esse valor esteja subestimado, uma vez que não foram considerados nas estimativas 45 países adicionais onde também foram relatados casos de infecção por N. caninum (REICHEL et al., 2013).

Apesar de toda a abrangência e impacto econômico que a infecção por *N. caninum* parece apresentar, não existem tratamentos terapêuticos ou preventivos disponíveis para o controle desse parasita pelos produtores de gado bovino. A única vacina disponibilizada comercialmente, a Bovilis NeoGuard (Merck), mostrou-se de baixa eficácia (WESTON et al., 2012) e foi retirada do mercado. Desse modo, algumas estratégias podem ser utilizadas pelos produtores para evitar a transmissão de *N. caninum* para e pelo rebanho utilizando-se dois princípios: a redução de fêmeas infectadas ou maior controle da exposição de bovinos a cães (REICHEL et al., 2014). No Brasil, a primeira opção é inviável economicamente para os pequenos produtores leiteiros e a segunda opção é muito difícil de ser concretizada no dia-a-dia de uma fazenda.
1.2 Invasão e locomoção no filo Apicomplexa

O filo Apicomplexa compreende, além de *N. caninum*, alguns dos mais importantes patógenos de interesse médico e veterinário. Há diversos outros representantes, como *Theileria* spp., *Babesia* spp. *e* agentes zoonóticos de grande importância como *T. gondii* e *Cryptosporidium parvum*, assim como o gênero considerado o mais devastador de todos: *Plasmodium*.

Os organismos pertencentes ao filo Apicomplexa são parasitas intracelulares obrigatórios que fazem uso de um mecanismo especializado de invasão e locomoção denominado motilidade por deslizamento (ou *gliding motility*; SOLDATI; MEISSNER, 2004). Os estágios responsáveis pela invasão celular são os "zoítas" (taquizoítas de *N. caninum* ou *T. gondii*), caracterizados pela presença de um complexo apical pronunciado composto por um anel polar, organelas secretórias especializadas denominadas roptrias e micronemas e, em algumas espécies, o conóide (figura 2). A secreção sequencial de proteínas presentes nas organelas secretórias localizadas na região apical é responsável pela interação inicial, penetração e sobrevivência do parasita na célula infectada (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997; PLATTNER; SOLDATI-FAVRE, 2008; SIBLEY, 2004).

Durante o ciclo lítico, os taquizoítas podem assumir os estados intracelular ou extracelular. A forma extracelular é não-divisível, altamente móvel, capaz de realizar extrusão do conóide e secretar conteúdo de micronemas. A forma intracelular dividese, não apresenta motilidade e não faz extrusão de conóide, nem secreção de micronemas (BLADER et al., 2015). Enquanto na forma extracelular, o taquizoíta realiza a motilidade por deslizamento (FRÈNAL et al., 2010), etapa importante para disseminação dos parasitas. A motilidade por deslizamento é um processo ativo e dependente do substrato (KING, 1988), com características não convencionais quando comparada a motilidade de outros organismos eucariotos, uma vez que esse processo não se utiliza de movimentos ameboides ou de cílios e flagelos (SIBLEY, 2004). Esse mecanismo é relativamente conservado no filo e foi observado previamente em taquizoítas de *T. gondii* (HÅKANSSON et al., 1999), esporozoítas de *Cryptosporidium* spp. (WETZEL et al., 2005), esporozoítas de *Plasmodium* spp. (VANDERBERG, 1974), esporozoítas de *Eimeria* (RUSSEL; SIDEN, 1981), merozoítas de *Babesia bovis* (ASADA et al., 2012) e Gregarinas (KING, 1981).

INTRODUÇÃO

A maquinaria celular responsável pela produção da motilidade dos parasitas apicomplexas - denominada glideossomo (OPITZ; SOLDATI, 2002) - encontra-se localizada entre a membrana plasmática e o complexo de membrana interno (IMC) (figura 2, B; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; HEINTZELMAN, 2015; SIBLEY, 2010; SOLDATI; MEISSNER, 2004), complexo formado por inúmeras vesículas achatadas e localizado subjacente à membrana plasmática (MORRISSETTE; SIBLEY, 2002). O glideossomo é o modelo mais aceito para explicar o mecanismo de motilidade por deslizamento desses parasitas (TARDIEUX; BAUM, 2016). Seu funcionamento está intimamente ligado ao motor actina-miosina, ao qual é atribuída a geração da força móvel que permite a propulsão do parasita na direção do movimento (BAUM et al., 2006; DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; WETZEL et al., 2003). Segundo esse modelo, a miosina A (MyoA; MEISSNER et al., 2002), uma miosina de classe XIVa (HEINTZELMAN; SCHWARZMAN, 2001), está associada a miosina de cadeia leve (MLC; HERM-GÖTZ et al., 2002) e a cadeia leve essencial (ELC) 1 (NEBL et al., 2011), formando complexo com proteína associada ao glideossomo (GAP) 45. Este complexo associa-se a GAP50 (GASKINS et al., 2004), que, por sua vez, está ancorada ao IMC (JOHNSON et al., 2007). GAP40 também foi identificada em associação com o glideossomo e pode ter função de ancoragem (FRÈNAL et al., 2010). Do outro lado da maquinaria celular, actina-F (filamentosa) está associada indiretamente à superfície da célula hospedeira por meio de adesinas transmembranas e aldolases, que medeiam esse contato entre actina e adesinas (BOSCH et al., 2007; JEWET; SIBLEY, 2003). Essas adesinas são secretadas pelas micronemas, e foram caracterizadas no gênero Plasmodium, em T. gondii e em N. caninum, sendo denominadas proteína anônima relacionada a trombospondina (TRAP) e proteína de micronema (MIC), respectivamente (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008).

O mecanismo de invasão das células hospedeiras por parasitas do filo Apicomplexa também está associado à atuação do glideossomo (figura 2, B; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007), cuja atividade acontece na junção móvel (MJ), uma região de constrição ao redor do parasita que permite uma maior proximidade entre as membranas do parasita e da célula hospedeira (BESTEIRO et al., 2011). A invasão se inicia após interação inicial de baixa afinidade com a superfície da célula hospedeira, intermediada por proteínas de superfície SAGs (antígeno de superfície ancorado a glicosil fostatidil inositol ou GPI; DZIERSZINSKI et al, 2000). Concluída a

INTRODUÇÃO_

interação inicial, ocorre a secreção de proteínas micronêmicas, que se acumulam na região apical, de maneira a promover a polarização do parasita (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Em seguida, proteínas das roptrias (organelas com forma de bulbo) são liberadas. As proteínas de bulbo de roptria (ROPs) têm sua função atribuída à construção do vacúolo parasitóforo (PV) em desenvolvimento, enquanto que as proteínas de pescoço de roptria (RONs) estão associadas com o MJ (DUBREMETZ, 2007). A formação de complexo estável entre RONs e antígeno apical de membrana (AMA) 1, secretada por micronemas, foi detectada (ALEXANDER et al., 2006; ALEXANDER et al., 2005; BESTEIRO et al., 2009). Esse complexo pode representar a ancoragem que liga o citoesqueleto do parasita com o da célula hospedeira; isso garante a tração de movimentação para dentro do hospedeiro (HARVEY et al., 2014), levando à formação do PV (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007), dentro do qual o parasita pode replicar-se posteriormente (FRÉNAL; SOLDATI-FAVRE, 2009). Para completar o processo invasivo, as proteases romboides clivam as proteínas micronêmicas, desprendendo o parasita do MJ para dentro do PV (BROSSIER et al., 2005; SANTOS et al., 2012).



Figura 2. **Morfologia da forma taquizoíta e invasão da célula hospedeira. A)** Representação das principais estruturas e organelas responsáveis pela funcionalidade e morfologia características dos taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. **B)** Processo de invasão da célula hospedeira por taquizoíta de *T. gondii*: i – afinidade com célula hospedeira e liberação da adesão. ii – Representação da composição molecular do complexo de adesão, junção móvel e glideossomo. AMA1 = antígeno apical de membrana 1; ELC = cadeia leve essencial; GAP = proteína associada ao glideossomo; GAPM = proteínas associadas ao glideossomo com múltiplas extensões de membrana; IMC = complexo de membrana interno; MIC = proteína de micronema; MLC = miosina de cadeia leve; MyoA = miosina A; RON = proteína de pescoço de roptria; ROM = proteína de bulbo de roptria; SAG = antígeno de superfície ancorado a glicosil fostatidil inositol (GPI); PLV = vacúolo similar ao de plantas. (Adaptado de BLADER et al., 2015).

O modelo vigente de motilidade por deslizamento e invasão – denominado modelo linear –, é baseado, principalmente, em estudos de localização de seus componentes e imunoprecipitação (TARDIEUX; BAUM, 2016). Recentemente, alguns autores têm questionado o modelo linear baseados em resultados obtidos com utilização de genética reversa em proteínas componentes da maquinaria celular (ANDENMATTEN et al., 2013; EGARTER et al., 2014; FRÈNAL; SOLDATI-FAVRE,

2015; MEISSNER et al., 2013; WHITELAW et al., 2017). Ademais, eles defendem a necessidade de um ponto de vista menos reducionista e mais integrativo para avaliar a mecânica de invasão e motilidade (TARDIEUX; BAUM, 2016). Por outro lado, cada vez mais a contribuição energética da célula hospedeira no processo de invasão tem sido levada em consideração (BICHET et al., 2014; KOCH; BAUM, 2016).

1.3 Actina

Actina é uma das proteínas mais conservadas e abundantes em células eucarióticas, representando 5 a 10% de todas as proteínas da célula (COOPER, 2000; TILNEY, 1975). Essa proteína é altamente dinâmica e sua capacidade de formar filamentos torna o seu papel essencial em diversos processos envolvendo motilidade celular (BLANCHOIN et al., 2014; POLLARD; BORISY, 2003), manutenção da estrutura e polaridade celulares (MATSUDAIRA, 1991) e transporte de vesículas e organelas (KÜBLER; RIEZMAN, 1993).

1.3.1 Estrutura de actina

Actina é uma proteína globular de aproximadamente 42 kDa. Sua forma monomérica (actina-G), representada na figura 3A, constitui o bloco de construção para os filamentos (actina-F). Actina-G é formada por dois domínios (domínios pequeno e grande) e quatro subdomínios (subdomínios 1 a 4). Entre os domínios pequeno e grande, são formadas duas fendas. Enquanto que a fenda superior, formada entre os subdomínios 2 e 4, liga-se a ATP ou ADP e a cátions divalentes (Ca⁺² ou Mg⁺²), a fenda inferior, entre os subdomínios 1 e 3, é majoritariamente hidrofóbica e representa o principal sítio de ligação a proteínas que se ligam a actina (ABPs; DOMINGUEZ; HOLMES, 2011).

A afinidade de ATP por actina-G é muito maior que a de ADP (NEIDL; ENGEL, 1979). Na presença de ATP e em condições fisiológicas, actina-G polimeriza-se espontaneamente, havendo a formação de filamentos de actina (actina-F), compostos por duas cadeias helicoidais (SEPT et al., 1999). A polimerização ocorre de maneira polarizada, apresentando diferentes velocidades de associação e dissociação de monômeros nas extremidades de actina-F (POLLARD,1986). Actina-F apresenta, desse modo, duas extremidades: a extremidade "mais", por onde o filamento cresce mais rapidamente e a extremidade "menos", por onde os monômeros dissociam-se com maior velocidade (POLLARD; BORISY, 2003).



Figura 3. Estrutura de actina e polimerização do filamento de actina. A) Estrutura de actina mostrando seus subdomínios. Actina de coelho associada a DNase I bovina (acesso PDB 1ATN). Moléculas de ATP e Ca⁺² na fenda superior. N = N-terminal; C = C-terminal. (Fonte: GUPTA et al., 2015). B) Curva esquemática (tempo x quantidade de filamentos) representando as fases de actina-F. Mostradas nucleação e polimerização, duas etapas da formação do filamento seguidas do estado estacionário. C) Formação de filamentos de actina (actina-F) a partir de monômeros disponíveis acontece em duas etapas. Inicialmente ocorre a nucleação, etapa termodinamicamente limitante, onde há formação de dímeros e trímeros. Em seguida, acontece a rápida polimerização ou elongação dos filamentos pela extremidade "mais". A hidrólise de ATP ocorre ao longo do filamento, levando à dissociação de fosfato inorgânico (Pi). Figura adaptada de: BLANCHOIN et al., 2014.

1.3.2 Dinâmica de actina

Os processos celulares dependentes de actina utilizam-se de sua capacidade inerente de polimerizar-se e despolimerizar-se, assumindo, dinamicamente, as formas actina-G e actina-F. A formação de actina-F a partir de actina-G acontece em duas etapas: a nucleação e polimerização ou elongação (WEGNER; ENGEL, 1975). A nucleação consiste na formação inicial de dímeros e trímeros. Esse processo é termodinamicamente limitante, devido à instabilidade dessas estruturas iniciais,

motivada pela sua alta taxa de dissociação (POLLARD; BORISY, 2003; SEPT et al., 2001). Porém, uma vez formados os dímeros e trímeros, o núcleo de tetrâmeros pode ser formado (ODA et al., 2016). A partir daí a polimerização acontece rapidamente pela extremidade mais dinâmica, a extremidade "mais" do filamento, que se polimeriza 10 vezes mais rápido do que a extremidade "menos" e é dependente da concentração de monômeros disponíveis ali (BLANCHOIN et al., 2014; POLLARD, 1986; SEPT et al., 1999). Uma vez formado o filamento, o ATP associado a subunidades de actina do filamento é hidrolisado a ADP, dissociando fosfato inorgânico (Pi ou γ-fostato); ADP-actina dissocia-se da extremidade "menos" mais rapidamente do que ATP-actina (POLLARD, 2007).

Quando a concentração de actina-G disponível passa a ser igual à concentração crítica (Cc), o sistema atinge um estado de equilíbrio dinâmico ou estado estacionário. Cc também é denominada constante de dissociação e é determinada pela razão entre as taxas de dissociação e associação das subunidades na extremidade de um polímero (POLLARD, 2007). No estado estacionário, há um fluxo organizado de trocas de actina-G e actina-F de uma extremidade à outra dos filamentos chamado treadmilling ou efeito esteira (CARLIER et al., 2015). Se actina-G está presente a uma concentração acima da Cc, há polimerização, do contrário, ocorre despolimerização de actina-F (POLLARD; BORISY, 2003). Em 1976, Wegner observou que a hidrólise de ATP nos filamentos de actina permite que as extremidades "mais" e "menos" apresentem diferentes valores de Cc (0,1 µM na extremidade "mais" e 0,7 µM na "menos") em tampão contendo Mg⁺² e ATP, o que confere taxas de associação e dissociação de monômeros muito pequenas no estado estacionário (POLLARD, 2007). Além disso, observações sobre valores de constantes de associação e dissociação de ADP-actina, ADP-Pi-actina e ATP-actina permitiram concluir que, no estado estacionário e em presença de ATP, Pi associa-se e dissocia-se de ADPactina-G em ambas as extremidades do filamento muito mais rapidamente do que na região central do filamento. Ademais, a afinidade de Pi pela extremidade "menos" é menor do que em qualquer outra parte de actina-F (POLLARD, 2007). Na figura 3B está representado esquematicamente o gráfico teórico obtido a partir da quantificação de filamentos de actina, desde a nucleação até o estado estacionário.

Em conjunto, as observações sobre associação e dissociação de Pi de ATPactina ou ADP-actina e de ATP/ADP-actina em ambas as extremidades dos filamentos

INTRODUÇÃO

permitiram o estabelecimento do modelo mostrado na figura 3C. Esse modelo compreende a dinâmica de nucleação, polimerização e estado estacionário de actina.

No ambiente celular, actina encontra-se no estado estacionário e a força iônica fisiológica tende a manter os filamentos. Em contrapartida, a concentração de actina-G em algumas células foi estimada em ≤100 µM, muito acima da Cc em ambas as extremidades (POLLARD et al., 2000). A maior parte dessa actina-G está associada a ATP e Mg⁺², uma vez que a quantidade de Mg⁺² na célula é muito maior que Ca⁺² (POLLARD et al., 2000). Esse equilíbrio entre actina-F e actina-G no ambiente celular em presença de uma concentração tão grande de actina-G só é possível devido a presença de fatores regulatórios, dentre eles as ABPs, que atuam modificando as propriedades de actina, alterando a habilidade de polimerização e despolimerização de filamentos (BLANCHOIN; MICHELOT, 2012; BLANCHOIN et al., 2014; CARLSSON, 2010; POLLARD et al., 2000).

1.4 Actina no filo Apicomplexa

Como mostrado acima, organismos do filo Apicomplexa apresentam um mecanismo de motilidade e invasão baseado no motor actina-miosina. Além da atuação de actina nesses processos, actina foi observada como atuante na replicação (HAASE et al., 2015; PERIZ et al., 2016), motilidade de grânulos densos (HEASLIP et al., 2016) e replicação de apicoplastos (WHITELAW et al., 2017) de *T. gondii*, além de transporte endocítico em *P. falciparum* (SMYTHE et al., 2008).

Assim como alguns outros protozoários como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e parasitas tripanossomatídeos, organismos do filo Apicomplexa apresentam actinas não convencionais, que, apesar de possuírem estruturas de domínios conservadas, demonstram propriedades divergentes de actinas canônicas (GUPTA et al., 2015). Uma análise filogenética organizou as actinas desses protozoários em três clados distintos: clado 1, formado por actinas de amebas, humanos e coelhos; clado 2, por actinas de apicomplexas; clado 3, actina de tripanossomatídeos. Actina de *Giardia*, mais divergente, forma grupo separado (GUPTA et al., 2015).

Enquanto que a razão entre actina-G e actina-F encontradas em células eucarióticas que expressam actinas canônicas aproxima-se de um, a quantificação de ambas as formas de actina em *T. gondii* mostrou que a maioria absoluta (~98%) de actina no citosol de taquizoítas está disponível na forma monomérica

INTRODUÇÃO

(DOBROWOLSKI et al., 1997; WETZEL et al., 2003). Os filamentos de actina de parasitas apicomplexas estudados in vitro mostraram-se diferentes daqueles formados por outras actinas, sendo curtos e bastante instáveis (SCHMITZ et al., 2005; SAHOO et al., 2006). Contudo, recentemente, foram detectados in vivo filamentos formando uma rede que interliga as extremidades posteriores de taquizoítas intracelulares de T. gondii, assim como uma extensa rede interligando vacúolos parasitóforos (PERIZ et al., 2016). Além disso, foi observado, a partir de ensaios in vitro, uma característica única dentre as actinas conhecidas até o momento: actina de T. gondii apresenta polimerização isodésmica (SKILLMAN et al., 2013). Isso indica que TgACT não apresenta nucleação como fator limitante da polimerização, tornando este processo independente da concentração de monômeros disponíveis (figura 4). Em estudos in vivo, porém, foi observada a dependência de Cc de actina-G para a ocorrência de polimerização, uma vez que não foi observada a formação de filamentos quando a concentração de monômeros nas células foi diminuída (PERIZ et al., 2016; WHITELAW et al., 2017). Entretanto, nesses trabalhos não foi considerada a influência de fatores reguladores de polimerização de actina, como ABPs presentes no ambiente celular, e que poderiam atuar de maneira dependente da concentração de actina-G, sequestrando os poucos monômeros disponíveis e, por conseguência, impedindo a formação de filamentos.



Mesmas constantes em todas as etapas

Figura 4. **Modelo proposto para polimerização de actina de** *Toxoplasma gondii***. A)** Mecanismo de polimerização de actinas canônicas, no qual a etapa de nucleação é termodinamicamente desfavorável. Nessa etapa, as taxas de associação (k₁₊ e k₂₊) são menores que as taxas de dissociação (k₁₋ e k₂₋). B) Mecanismo de polimerização isodésmica, atribuído a actina de *T. gondii*. Taxas de associação (k₊) e dissociação (k₋) são iguais. Figura adaptada de: SKILLMAN et al., 2013.

Ao longo do tempo, o papel de actina de organismos apicomplexas na invasão de células hospedeiras vem sendo considerado essencial (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; DOBROWOLSKI et al., 1997; WETZEL et al., 2003). Esse papel fundamental foi determinado a partir de ensaios envolvendo drogas que conhecidamente atuam em actina, como citocalasina D (SCHLIWA, 1982; COOPER, 1987) e jasplakinolida (BUBB et al., 1994; 2000). O uso de ferramentas de genética reversa in vivo vem questionando esse paradigma ao indicar que actina pode não ser essencial para a invasão celular como foi anteriormente estabelecido (ANDENMATTEN et al., 2013; EGARTER et al., 2014; WHITELAW et al., 2017). Em contrapartida, as conclusões provenientes dos resultados obtidos a partir do uso dessas ferramentas têm sido questionadas, pontuando possíveis falhas na interpretação dos resultados de nocaute e reiterando a importância dos ensaios envolvendo drogas (DREWRY; SIBLEY, 2015). Taquizoítas de *T. gondii* nocaute para actina mostraram capacidade de motilidade e de invasão de células in vitro, embora essas capacidades tenham sido reduzidas (EGARTER et al., 2014; WHITELAW et al., 2017). Nesses taquizoítas, actina mostrouse essencial para o egresso dos parasitas (EGARTER et al., 2014; WHITELAW et al., 2017) e replicação do apicoplasto (ANDENMATTEN et al., 2013; WHITELAW et al., 2017), com redução no transporte de grânulos densos (EGARTER et al., 2014; WHITELAW et al., 2017) e desorganização da aparência de roseta dos traquizoítas do PV (PERIZ et al., 2016).

As propriedades não convencionais dos filamentos de actina de organismos apicomplexas foram atribuídas a diferenças, quando comparada a actinas canônicas, em um pequeno número de aminoácidos que afetam a estabilidade desses filamentos (SKILLMAN et al., 2011), assim como a divergências estruturais do D-*loop* – região que se liga a DNase I – e da região C-terminal (VAHOKOSKI et al., 2014).

Apesar de actina de *T. gondii* e *N. caninum* serem idênticas em sua sequência primária, a detecção de actina endógena por anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 diverge entre ambos os parasitas. Enquanto que esse anticorpo reconhece apenas uma banda de actina em *T. gondii* (WHITELAW et al., 2017), em *N. caninum*, o anticorpo reconhece duas bandas e nove isoformas detectadas via *western blot* 2-D, identificadas por espectrometria de massas (BARONI, 2012). Essas diferenças entre actinas de sequências idênticas podem indicar presença de moficações póstraducionais em actina de *N. caninum* que alteram a atividade dessa proteína *in vivo*, com relação a actina de *T. gondii*.

Assim como actinas canônicas, a dinâmica de actina de organismos apicomplexas apresenta características, aparentemente, divergentes *in vivo* e *in vitro*. A polimerização isodésmica de actina de *T. gondii*, caracterizada *in vitro* (SKILLMAN et al., 2013), contrasta com a observação de Cc de actina *in vivo* (EGARTER et al., 2014; PERIZ et al., 2016; WHITELAW et al., 2017). Além disso, longos filamentos de actina foram observados conectando taquizoítas de *T. gondii* intracelulares e PV (PERIZ et al., 2016), apesar da detecção, *in vitro*, apenas de filamentos curtos e instáveis de actina (SAHOO et al., 2006). Por outro lado, a quantificação de actina intracelular desses parasitas mostrou uma grande maioria de actina-G (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1997), apesar da necessidade de filamentos de actina em mecanismos tão importantes para a propagação da infecção como motilidade e invasão de células hospedeiras. Essas aparentes divergências de observações indicam que a dinâmica de actina *in vivo* é realizada por ABPs.

1.5 Proteínas que se ligam a actina (ABPs)

Filamentos de actina são utilizados por muitas células eucarióticas para gerar a estrutura que fornece suporte mecânico dos movimentos celulares e produzir, juntamente com miosina, a força necessária para motilidade celular e contrátil. Para garantir a precisão da polimerização e despolimerização de actina e a correta formação da arquitetura de filamentos, uma vasta quantidade de ABPs atuam regulando a dinâmica de actina.

ABPs são proteínas que apresentam domínios capazes de ligarem-se à molécula de actina. Essas proteínas com função de regulação de actina são conhecidas desde a década de 1970, quando foi identificada a filamina (WANG et al., 1975; HARTWIG; STOSSEL, 1975). Em 2002, um arsenal de 162 ABPs era conhecido (DOS REMEDIOS et al., 2003); até o momento, esse número aumentou e uma pletora de ABPs foi identificada até o momento (LAPPALAINEN, 2016). No geral, a necessidade de um número tão grande dessas proteínas reguladoras de actina é proporcional ao vasto número de processos celulares envolvendo actina, muitos deles envolvendo a necessidade de formação de estruturas específicas complexas com organização tridimensional (LAPPALAINEN, 2016). Além disso, organismos multicelulares apresentam várias isoformas de actina expressas de maneira

tecido/célula-específicas com funções distintas, cada uma podendo ser regulada por isoformas específicas de ABPs (LAPPALAINEN, 2016).

As ABPs podem ser classificadas de acordo com as funções que executam, podendo exercer mais de uma função durante a regulação da dinâmica de actina:

1.5.1 Nucleação

A nucleação de actina é determinante para a formação do filamento, porém é uma etapa termodinamicamente limitante. Na célula, para que a polimerização se inicie, é necessário que a formação de dímeros e trímeros supere a alta taxa de dissociação, associada a uma possível diminuição da disponibilidade de actina-G em decorrência do sequestro de monômeros. Para transpor essa barreira cinética, as células dispõem de algumas ABPs com função de induzir ou estabilizar os pequenos oligômeros de actina (FIRAT-KARALAR; WELCH, 2011; POLLARD, 2007). Dentre os mais estudados estão as forminas (PAUL; POLLARD, 2009) e o complexo ARP2/3 (PIZARRO-CERDÁ et al., 2017; POLLARD, 2007). Essa função também é exercida por espiras (KERKHOFF, 2006) e foi observada em cofilina (ANDRIANANTOANDRO; POLLARD, 2006).

1.5.2 Sequestro de monômero

O sequestro de monômeros de actina ocorre quando ABPs ligam-se a actina-G para impedir a nucleação de filamentos (DOS REMEDIOS et al., 2003). É provável que a atuação dessas proteínas aconteça pela competição por regiões envolvidas na interface entre monômeros de actina para formação dos filamentos (XUE et al., 2013). ABPs sequestradoras de monômeros impedem, portanto, a formação de filamentos, levando ao aumento da concentração de actina-G no ambiente celular. Em células que apresentam motilidade, é importante que haja actina-G disponível para rápida polimerização e sinais celulares específicos ativam outras ABPs, que liberam o monômero, tornando-o pronto para polimerização (WINDER; AYSCOUGH, 2005). Dentre as ABPs com essa função, é possível citar timosina β4 (IROBI et al., 2004), profilina (SKILLMAN et al., 2012), CAP/Srv2 (FREEMAN et al., 1995) e ADF/cofilinas (MEHTA; SIBLEY, 2010).

1.5.3 Quebra de filamentos

Proteínas que realizam a quebra de filamentos de actina (*severing*, em inglês) diminuem o comprimento de actina-F cortando o filamento em duas partes (DOS REMEDIOS et al., 2003). Os mecanismos da quebra de filamentos podem envolver alterações mecânicas e de flexibilidade do filamento pela ligação de ADF/cofilinas (McCULLOUGH et al., 2011) e tensão estérica causada por mecanismo coordenado de associação sequencial de domínios de gelsolina a actina-F (BURTNICK, et al., 2004).

1.5.4 Despolimerização

Algumas proteínas que se ligam a actina têm função de converter actina-F em actina-G através da indução de dissociação de monômeros a partir da extremidade "menos" do filamento. ADF/cofilinas são o exemplo mais conhecido de proteínas com essa característica (CARLIER et al., 1997).

1.5.5 Capeamento

Os filamentos de actina são estabilizados por proteínas que se ligam às suas extremidades "mais" e "menos" (*capping*, do inglês). Proteínas com essa função podem ligar-se à extremidade "mais", prevenindo a adição de monômeros, como CapZ (YAMASHITA et al., 2003) ou à extremidade "menos", impedindo a dissociação, como tropomodulinas (RAO et al., 2014).

1.5.6 Formação de retículos

Algumas proteínas favorecem a reticulação de actina-F ao facilitarem a formação de feixes, ramificações e redes tridimensionais. Essas proteínas apresentam ao menos dois sítios de ligação a actina-F e podem ser exemplificadas por Arp3/2 (DOS REMEDIOS et al., 2003).

1.6 ABPs em apicomplexas

Em apicomplexas, ABPs estão presentes em um reduzido repertório, se comparado a outros eucariotos (BAUM et al., 2006; SCHÜLER; MATUSCHEWSKI,

2006). A busca por essas proteínas em alguns organismos apicomplexas (*Cryptosporidium parvum, Plasmodium yoelii, P. falciparum e Theileria annulata*) através de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) mostrou proteínas das famílias das profilinas, ADF/cofilinas, complexo CAP, coroninas e forminas (BAUM et al., 2006). Além dessas ABPs conservadas, também foram identificadas outras, como a proteína de roptria toxofilina em *T. gondii* (DELORME-WALKER et al., 2012; POUPEL; TARDIEUX, 1999) e conector associado ao glideossomo (GAC; JACOT et al., 2016).

Dentre as ABPs -descritas anteriormente em organismos apicomplexas, duas estão presentes em *N. caninum*, ADF e CAP.

1.6.1 Fator de despolimerização de actina ou cofilina (ADF/cofilina)

Fatores de despolimerização de actina (ADF) e cofilinas são proteínas compostas por um único domínio de homologia a ADF (ADF-H), módulo responsável pela ligação com actina-G e actina-F, encontrado em cinco famílias de proteínas: ADF/cofilinas, twinfilinas, Abp1/debrinas, coactosinas e fatores de maturação da glia (POUKKULA et al., 2011). Esse domínio é estruturalmente similar ao domínio *gelsolin fold*, encontrado em proteínas da família da gelsolina (HATANAKA et al., 1996; MACIVER; HUSSEY, 2002). O domínio ADF-H é considerado o bloco de construção funcional das proteínas que possuem esse domínio (LAPPALAINEN et al., 1998).

ADF/cofilinas são proteínas evolutivamente muito antigas, apresentando mais de 1 bilhão de anos (LAPPALAINEN et al., 1998). ADF foi identificada pela primeira vez em plasma sanguíneo e em cérebro de frangos, como uma pequena proteína capaz de causar despolimerização de actina *in vitro* (BAMBURG et al., 1980). Posteriormente, proteínas homólogas foram sendo identificadas em outros organismos, formando a família ADF/cofilina (POUKKULA et al., 2011). A cofilina é outro membro dessa família, assim nomeado pela sua habilidade em cossedimentar com filamentos de actina (MAEKAWA et al., 1984). Actoforina (de *Acanthamoeba castelanii*; COOPER et al., 1986; MACIVER et al., 1991), depactina de equinodermas (MABUCHI, 1983), coactosina de *Dictyostelium* (DE HOSTOS et al., 1993), twintar de *Drosophila* (EDWARDS et al., 1994) e XAC de *Xenopus* (ABE et al., 1996) também são ADF/cofilinas. Eucariotos inferiores, em geral, expressam uma isoforma de ADF/cofilina, enquanto que vertebrados expressam três (ADF ou destrina, cofilina 1 e

INTRODUÇÃO

cofilina 2) e plantas, como *Arabdopsis thaliana*, produzem 10 isoformas (MACIVER; HUSSEY, 2002; POUKKULA et al., 2011).

Proteínas dessa família são conhecidas por regularem a dinâmica de actina através, principalmente, de favorecimento de sua despolimerização e da quebra de filamentos (KANELLOS; FRAME, 2016). Em altas concentrações, cofilinas ligam-se a actina-G e promovem a nucleação de filamentos (ANDRIANANTOANDRO; POLLARD, 2006). Nem sempre a função individual das proteínas dessa família é clara na literatura. Isso acontece, em parte, porque acredita-se que há uma sobreposição das funções das diferentes isoformas ou não é especificada a isoforma estudada (KANELLOS; FRAME, 2016). Aqui, essas proteínas serão, em conjunto, denominadas ADF/cofilinas.

ADF/cofilinas ligam-se tanto a actina-G, quanto a actina-F. Em geral, há uma maior afinidade por ADP-actina-G em detrimento de ATP-actina-G ou ADP-Pi-actina-G (HILD et al., 2014), assim como uma preferência de ADF/cofilinas por regiões "antigas" dos filamentos, isto é, regiões próximas da extremidade "menos" de actina-F, mais rica em ADP-actina (POUKKULA et al., 2011). A ligação de ADF/cofilinas aos filamentos de actina aparentemente promove o seu desmonte devido a mudanças rotacionais no filamento (McGOUGH et a., 1997) e aceleração de liberação de Pi de ADP-Pi-actina-F (SUAREZ et al., 2011). Não há um consenso sobre como ADF/cofilinas causam o desmonte de filamentos, podendo acontecer por aceleração da liberação de monômeros a partir da extremidade "menos" do filamento (CARLIER et al., 1997) e/ou por indução da quebra de actina-F em fragmentos menores (CHIN et al., 2016). Andrianantoandro et al. (2006) propôs um modelo indicando que a atuação de cofilina em actina-F varia com a proporção de ambas as proteínas. Em presença de concentrações baixas de cofilina, o filamento sofre quebra; com altas concentrações de cofilina, há liberação de Pi dos filamentos e eles são despolimerizados; porém, concentrações muito altas de cofilina levam a nucleação de actina e polimerização. Posteriormente, com a descrição de um novo sítio de ligação entre actina e ADF/cofilinas com função de quebra dos filamentos, o sítio de ligação a actina 2, Wong et al. (2014) propuseram um novo modelo: em baixas concentração de cofilina, há pouca ligação de cofilinas no filamento, tornando os sítios de ligação a actina 2 mais expostos, favorecendo a quebra; com cofilina presente em altas concentrações, ocorre ligação massiva de cofilina no filamento através do sítio de ligação a actina 1 (denominada decoração do filamento por cofilina), bloqueando o sítio 2 e, por consequência, impedindo a quebra dos filamentos.

A atividade de ADF/cofilinas é regulada por fosforilação/defosforilação, ligação a fosfoinositídeos (PIP₂), variação de pH e oxidação (revisão em KANELLOS; FRAME, 2016). Essas proteínas também são reguladas por cooperação com outras ABPs na dinâmica de actina, como proteína associada a ciclase (CAP), coronina e Aip1 (BRIEHER et al., 2006; MORIYAMA; YAHARA, 2002; NOMURA et al., 2016; NOMURA; ONO, 2013).

ADF já foi caracterizada em alguns organismos do filo Apicomplexa, como T. gondii (TgADF – ALLEN et al., 1997; MEHTA; SIBLEY, 2010; MEHTA; SIBLEY, 2011), Plasmodium (PfADF1 e PfADF2/PbADF2 – SCHÜLER et al., 2005a; SINGH et al., 2011; WONG et al., 2014; WONG et al., 2011) e Eimeria (EtADF – XU et al., 2008). Apesar de ADF de T. gondii e Plasmodium serem evolutivamente correlacionados, diferenças celulares potenciais entre ambas foram descritas (HAASE et al., 2015). Em E. tenella, ADF é expressa em uma isoforma em maior quantidade em merozoítas e esporozoítas do que em oocistos (XU et al., 2008). ADF de T. gondii (TgADF; ALLEN et al., 1997) também é expressa como uma única isoforma e apresenta como função primária seguestro de actina-G, com evidência de guebra de filamentos (MEHTA; SIBLEY, 2010), sendo também fundamental para o processo de regulação do desmonte de actina-F dessa espécie in vivo (MEHTA; SIBLEY, 2011). Taquizoítas nocaute para TgADF apresentam capacidade de invasão e egresso de células hospedeiras, assim como motilidade por deslizamento comprometidos (MEHTA; SIBLEY, 2011). A estrutura terciária dessa proteína foi elucidada por espectroscopia por ressonância magnética nuclear, sendo estruturalmente relacionada com ADF/cofilinas canônicas (YADAV et a., 2011). O parasita P. falciparum apresenta duas isoformas de ADF, PfADF1 e PfADF2 (SCHÜLER et al., 2005a). PfADF1 liga-se, preferencialmente, a ADF-actina-G (SCHÜLER et al., 2005a) e o seu efeito na polimerização de actinas heteróloga ou homóloga não foi anteriormente observado (SCHÜLER et al., 2005a). Porém, foi observado desmonte de filamentos de actina homóloga, efeito este causando por quebra dos filamentos (WONG et al., 2011), o que foi posteriormente confirmado (WONG et al., 2014). A segunda isoforma de ADF de Plasmodium, expressa nas formas sexuais de parasitas desse gênero é mais similar a ADF canônicas do que ADF1 (SINGH et al., 2011). ADF2 foi estudada em P. bergei (PbADF2), mostrando-se funcionalmente redundante em estágios sanguíneos, porém

com papel chave na diferenciação de oocinetos para oocistos e esporozoítos para formas exoeritrocíticas (DOI et a., 2010).

1.6.2 Proteína associada a ciclase (CAP)

Proteína associada a ciclase ou proteína associada a adenilato ciclase (CAP) ou, ainda, supressor de Ras2(V19) (Srv2) – em leveduras –, é uma proteína conservada entre organismos eucariotos, que foi estudada inicialmente pela sua associação a adenilato ciclase e ativação de proteína Ras em leveduras (FEDOR-CHAIKEN et al., 1990; WANG et al., 1992). Em leveduras, CAP/Srv2 apresenta uma organização com regiões compreendendo domínios de interesse (ONO, 2013). A região N-terminal de CAP é responsável pela ligação com adenilato ciclase (NISHIDA et al., 1998), que é seguida pelo domínio enovelado helicoidal (HFD; YUSOF et al., 2005). A região central apresenta duas regiões ricas em prolina (P1 e P2; ONO, 2013), flanqueando o domínio de homologia a proteína da Síndrome Wiscott Aldrich (WH2; CHAUDHRY et al., 2010; PAUNOLA et al., 2002). Na região C-terminal de CAP encontra-se o domínio CAP-C, responsável pela ligação de alta afinidade com actina-G (CHAUDHRY et al., 2007; FREEMAN et al., 1995; MATTILA et al., 2004). CAP de protozoários apresentam apenas o domínio CAP-C (ONO, 2013).

Apesar de ter sido inicialmente descrita como participante na via de sinalização Ras-cAMP, CAP também atua na regulação de dinâmica de actina. Essa ABP liga-se a actina-G e inibe a polimerização espontânea de actina (CHAUDHRY et al., 2007; FREEMAN et al, 1995; NOMURA; ONO, 2013), bem como sequestra monômeros (FREEMAN et al., 1995). CAP também se liga a actina-F e promove o desmonte de filamentos (MORIYAMA; YAHARA, 2002). Em cooperação com ADF/cofilina, a região C-terminal de CAP de levedura e mamíferos atua deslocando cofilina de ADP-actina-G e realizando troca de nucleotídeo (MATTILA et al., 2004), enquanto que a região Nterminal promove quebra dos filamentos, mediada por cofilina (CHAUDHRY et al., 2013; JANSEN et al., 2014). Além de ADF/cofilina, CAP também atua em cooperação com profilina e Alp1 (BALCER et al., 2003). É conhecida a capacidade de CAP de formar dímeros ou oligômeros que podem conter seis moléculas de CAP e seis de actina (BALCER et al., 2003; QUINTERO-MANZON et al., 2009), cuja função ainda é incerta. Em organismos apicomplexas, CAP é composta apenas pelo domínio CAP-C e as formas recombinantes de CAP de *P. falciparum* (PfCAP) e *C. parvum* (CpCAP) tendem a formar dímeros em solução (HLISCS et al., 2010; MAKKONEN et al., 2013). Além disso, *in vitro*, CpCAP recombinante liga-se a actina-G, promove desmonte de filamentos e sequestra monômeros (HLISCS et al., 2010). Já o nocaute de CAP de *P. bergei* (PbCAP) mostrou que essa proteína não é essencial para estágios assexuais sanguíneos desse parasita, porém, é essencial para o desenvolvimento de oocistos no intestino de mosquitos (HLISCS et al., 2010).

1.7 Justificativa

O estudo de mecanismos envolvendo processos celulares tem sido realizado, majoritariamente, em T. gondii e Plasmodium e seus resultados utilizados como modelo de funcionamento para o filo como um todo. Isso ocorre, principalmente, pela disponibilidade de ferramentas moleculares para manipulação desses organismos. Porém, divergências entre os hospedeiros definitivos e intermediários de T. gondii e N. caninum representam evidências que motivam a investigação individual de ambas as espécies, uma vez que diferenças nos mecanismos que envolvem o processo de invasão podem ser responsáveis por essa especificidade (REID et al., 2012). A investigação de mecanismos em diferentes organismos do filo Apicomplexa pode revelar peculiaridades entre os processos celulares. Além do mais, pode permitir a avaliação da conservação entre diferentes espécies de sistemas mais complexos do que a avaliação comparativa de genomas e transcriptomas. Isso possibilitaria a observação de especificidades moleculares, ampliando o entendimento do funcionamento de mecanismos estratégicos de organismos patogênicos. ABPs são proteínas envolvidas em processos bastante específicos, atuando diretamente na regulação da dinâmica de actina na célula. Desse modo, estudar as ABPs permite contribuir para a compreensão do papel de uma proteína abundante e protagonista na manutenção de várias atividades celulares, como actina. Ademais, conhecer o funcionamento de processos-chave para a sobrevivência e disseminação da infecção por *N. caninum* pode gerar possíveis alvos terapêuticos para combate da neosporose, uma vez que essa doença ainda não possui abordagens terapêuticas efetivas para o tratamento dos seus hospedeiros (HORCAJO et al., 2016; REICHEL et al., 2014), causando prejuízos financeiros aos produtores de gado leiteiro e de corte (REICHEL et al., 2013). A investigação de ABPs também em *N. caninum* pode, no futuro, revelar especificidades dos mecanismos de invasão presentes nessa espécie que elucidem as diferenças de hospedeiros observadas entre *N. caninum* e *T. gondii*.





2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar e caracterizar proteínas que se ligam a actina (ABPs).

2.2 Específicos

a) Caracterizar *in silico* fator de deslimerização de actina de *N. caninum* (NcADF) e proteína associada a ciclase de *N. caninum* (NcCAP);

b) Expressar e purificar NcADF e NcCAP recombinantes;

c) Produzir e caracterizar anticorpos policionais anti-NcADF, anti-NcCAP e anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀;

d) Identificar NcADF e NcCAP endógenas em extrato de *N. caninum*;

e) Localizar NcADF, NcCAP e actina em taquizoítas de *N. caninum* por microscopia confocal;

f) Avaliar função de NcADF recombinante na dinâmica de actina heteróloga (de coelho);

MATERIAL e MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O fluxograma da figura 5 resume as atividades desenvolvidas durante a execução deste trabalho.



Figura 5. Fluxograma mostrando delineamento experimental do tabalho. Em magenta, etapa de cultura de taquizoítas de *Neospora caninum*; em roxo, etapas de biologia molecular; em laranja, caracterização molecular das proteínas recombinantes envolvendo o soro contendo anticorpo policional; em verde, caracterização bioquímica e funcional de NcADF *in vitro*; em azul, proteômica; em cinza, análises *in silico* e modelagem molecular. Quadros não preenchidos representam etapas realizadas na Universidade de São Paulo; quadros preenchidos de amarelo, as etapas realizadas na Universidade de Edimburgo. Actina-G = actina na forma monomérica; NcADF = fator de despolimerização de actina de *N. caninum*; NcCAP = proteína associada a ciclase de *N. caninum*.

Inicialmente, as sequências proteicas de NcADF e NcCAP foram submetidas à caracterização in silico; NcADF teve o modelo estrutural construído por modelagem molecular. Em seguida, a partir do RNA total extraído de taquizoítas de Neospora caninum, os cDNAs codificadores de NcCAP e NcADF foram clonados e as proteínas recombinantes, expressas e purificadas. As proteínas expressas em pET32a(+) foram utilizadas para imunização de camundongos e obtenção do soro contendo anticorpos policlonais anti-NcADF e anti-NcCAP. Esses soros foram utilizados para a caracterização molecular de NcADF e NcCAP em extratos de N. caninum (western blot e ELISA) ou taquizoítas íntegros (imunofluorescência). Em paralelo, na Universidade de Edimburgo, NcADF foi clonada, expressa em pET28a(+) de forma solúvel e purificada. NcADF recombinante solúvel foi submetida a ensaios bioquímicos e funcionais in vitro para determinação da influência dessa proteína na dinâmica de actina. Outra proteína recombinante, expressa anteriormente (BARONI, 2012), NcAct₂₀₁₋₃₁₀, correspondendo a um fragmento de actina, foi utilizada também para imunização de camundongos e avaliação da detecção de actina através do soro gerado.

3.2 Manutenção de taquizoítas de N. caninum

Células Vero foram mantidas em frascos de $25 \text{cm}^2 \text{ e} 75 \text{cm}^2 \text{ a} 37^\circ \text{C} \text{ com } 5\%$ (v/v) CO₂ em meio RPMI 1640 com 2 mM de glutamina (Sigma) contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco). Taquizoítas de *N. caninum* do isolado Nc1, mantidos em monocamadas de células Vero a 37°C com 5% (v/v) CO₂, em meio RPMI 1640 com 2 mM glutamina, foram isolados, em média, sete dias após a inoculação em células Vero. Para isso, as culturas foram, inicialmente, removidas dos frascos com auxílio de um *scraper* e submetidas, em seguida, a passagens por agulha 26 G1/2 para promover lise de células Vero. Os taquizoítas foram purificados por cromatografia de exclusão (Sephadex G-25 em PD10, GE *Healthcare*) ou por passagem através de filtro de 5 µm. Para a purificação por cromatografia, a cultura previamente submetida a passagens por agulha foi aplicada em coluna de cromatografia e alíquotas de 1 mI em tubos de 1,5 ml (total de 10 ml) foram recolhidas, contendo taquizoítas isolados de células Vero. Após a centrifugação (3.300 x *g*, 3 minutos, 4°C) todos os pellets foram unidos em um só tubo e ressuspenso em 0,5 ml de PBS. Para purificação por filtro, a suspensão contendo as células Vero lisadas foi passada através de filtro de 5 µm com auxílio de uma seringa de 10 ml. O filtrado foi centrifugado a 3.300 x *g* por 6 minutos a 4°C.

A quantificação dos taquizoítas obtidos através da purificação foi feita por contagem em câmara de Neubauer em microscópio ótico. Os taquizoítas obtidos a partir da purificação foram utilizados em seguida ou foram congelados. Para o congelamento, os tubos foram centrifugados (3.300 x g, 4°C, 3 minutos) e o sobrenadante foi retirado, permanecendo o suficiente para encobrir o pellet. Em seguida, os tubos foram armazenados a – 80°C.

3.3 Análises in silico

3.3.1 Seleção de proteínas que se ligam a actina – ABPs

A busca de proteínas correspondentes a ABPs de *N. caninum* foi realizada no banco de dados ToxoDB 7.3¹ (GAJRIA et al., 2008). Para isso, foram feitas buscas com os nomes de ABPs conhecidas em organismos do filo Apicomplexa e selecionados aqueles acessos que apresentassem homologia com proteínas jáanteriormente descritas de *Toxoplasma gondii*.

3.3.2 Análises computacionais das sequencias de ABPs

Com as proteínas de *N. caninum* selecionadas para este trabalho (NcADF: NCLIV_012510 e NcCAP: NCLIV_054140), foram realizados BLASTp² em banco de dados "sequências de proteínas não redundantes (nr), assim como busca por peptídeo sinal em SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011). Todas as sequências proteicas selecionadas foram também analisadas quanto à presença de domínios conservados através da ferramenta Pfam³ (PUNTA et al., 2012).

As sequências proteicas preditas das ABPs selecionadas também foram alinhadas com proteínas homólogas de alguns organismos representativos e/ou apicomplexas, apresentados como resultado do BLAST. O alinhamento foi feito em

¹ Acesso em: http://toxodb.org

² Acesso em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

³ Acesso em: http://pfam.sanger.ac.uk/

software MegAlign (DNASTAR, Lasergene) e visualizado em GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997) ou ESPript 3.0 (ROBERT et al., 2014).

3.3.3 Modelagem molecular baseada em homologia

Para modelagem molecular, foi utilizada a sequência proteica de fator de despolimerização de actina de *N. caninum* (NcADF; figura 6).

| MASGMGVDENCVSLFNELKIRKTVKWIIFKIDSTKIVVEK | 40 |
|--|-----|
| DGKGNADEFKAGLPANDCRFGVYDCGNKIQFVLWCPDNAP | 80 |
| VKPRMTYASSKDALLKKLDGATAVALEAHEMSDLASLA | 118 |

Figura 6. Sequência proteica de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) submetida a modelagem molecular baseada em homologia. Imagem obtida por *printscreen* da tela do *software* EditSeq 7.1.0 (DNASTAR, Lasergene) do acesso NCLIV_012510 em ToxoDB.

A construção do modelo estrutural foi realizada através de ferramentas de bioinformática, conforme exposto na figura 7.



Figura 7. **Esquema das etapas para modelagem molecular baseada em homologia.** O esquema mostra as etapas e as ferramentas de bioinformática utilizadas para modelagem molecular de fator de despolimerização de actina de *N. caninum* (NcADF).

3.3.3.1 Identificação dos moldes e alinhamento

Os modelos estruturais homólogos utilizados como molde para determinação estrutural da proteína modelada foram obtidos em PDB⁴ (*Protein Data Bank* – Banco de dados de proteínas). As buscas foram realizadas por BLAST, através do algoritmo BLASTp, utilizando PDB como banco de dados.

As sequências de aminoácidos das estruturas selecionadas a partir do PDB foram submetidas a alinhamento múltiplo através do *software* MegAlign 7.0.1 pelo modo ClustalW. As estruturas terciárias foram alinhadas em dupla no *software* Pymol (The PyMOL *Molecular Graphics System*, versão 1.5.0.4 Schrödinger, LCC), através do qual o valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation* – Desvio médio quadrático) foi calculado.

Os parâmetros para seleção dos moldes foram baseados em valor-E, identidade/similaridade e RMSD; os acessos selecionados tiveram suas estruturas secundárias alinhadas em ENDscript⁵ (ROBERT; GOUET, 2014).

3.3.3.2 Construção dos modelos estruturais

Após seleção dos moldes, o *software* Modeller 9.12 (ESWAR et al., 2006) foi utilizado para construção dos modelos de estrutura terciária. Para isso, foram utilizados os tutoriais básico e avançado de modelagem, recomendados pelo desenvolvedor do Modeller⁶.

3.3.3.2.1 Tutorial básico

O tutorial básico é utilizado quando a estrutura a ser modelada é baseada em apena um molde, com identidade entre as estruturas primárias do molde e da proteína a ser modelada maior que 30%. Para realização desse tutorial, foram seguidos os passos indicados, exceto a busca inicial na biblioteca do próprio Modeller e seleção de moldes, nas etapas 1 e 2 do tutorial, uma vez que essas etapas foram realizadas por busca em BLAST.

⁴ Acesso em: http://www.pdb.org/

⁵ Acesso em: http://endscript.ibcp.fr

⁶ Acesso em: https://salilab.org/modeller/tutorial/

O alinhamento básico constituiu-se, portanto, das etapas: alinhamento entra as sequências de aminoácidos a ser modelada e a sequência molde, seguida de construção de 25 modelos.

3.3.3.2.2 Tutorial avançado

O tutorial de modelagem avançado é baseado no uso de vários moldes para construção da estrutura final.

Para a realização desse tutorial, também foram realizadas as etapas de alinhamento entre sequência a ser construída e sequências homólogas, seguido de construção de 25 modelos.

3.3.3.3 Refinamento e validação dos modelos

Após a geração dos 25 modelos, aquele com menor valor de DOPE global (*Discrete Optimized Protein Energy*; SHEN, SALI, 2006) foi selecionado para refinamento e validação. Gráficos de resíduos de aminoácidos *versus* DOPE foram obtidos a partir do *software* GNUPLOT 5.0.

Os modelos selecionados foram analisados por Molprobity 4.3⁷ (CHEN et al., 2010), PROCHEK 3.5.4 (LASKOWSKI et al., 1993) e Verify3D (EISENBERG et al., 1997). PROCHECK foi utilizado através do servidor *Protein Structure Validation Software* 1.5 (PSVS⁸), enquanto que Verify3D foi acessado através de SAVES v.4⁹ (*The structure analysis verification server*, UCLA, *Los Angeles*, EUA).

Após análises, o modelo selecionado foi submetido a refinamento por ModRefiner¹⁰ (XU; ZHANG, 2011) e em seguida foi analisado novamente por Molprobity, PROCHECK e Verify3D. A visualização dos modelos foi feita através do *software* PyMOL.

3.3.3.4 Determinação do potencial eletrostático de superfície

As estruturas geradas por modelagem molecular foram analisadas pelo potencial eletrostático de superfície. Para isso, o cálculo da equação de Poisson-Boltzmann foi

⁷ Acesso em: http://molprobity.biochem.duke.edu/

⁸ Acesso em: http://psvs-1_5-dev.nesg.org/

⁹ Acesso em: http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/

¹⁰ Acesso em: http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/

feito pelo *software* APBS (*Adaptative Poisson-Boltzmann Solver*) (BAKER et al., 2001) através do servidor PDB2PQR 2.0.0¹¹ (DOLINSKY et al., 2004), usando campo de força AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*). O resultado foi visualizado no *software* PyMOL.

3.4 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes

3.4.1 Extração de RNA

A extração de RNA total de taquizoítas de *N. caninum* foi feita com Trizol (*Thermo Fisher Scientific*). Para isso, um tubo contendo 7,5 x 10^7 taquizoítas, armazenado em *freezer* a -70°C, foi descongelado em banho a 37°C, centrifugado a 9.500 x *g* por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1 ml de Trizol foi adicionado aos taquizoítas. O conteúdo foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após incubação, foram adicionados 200 µl de clorofórmio seguido de cuidadosa agitação por 16 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. O tubo foi, então, centrifugado a 9.500 x *g* por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa, contendo o RNA total, foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml.

Para a precipitação de RNA total, 500 μ I de isopropanol absoluto foram adicionados sobre a fase aquosa reservada anteriormente e foi feita uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado a 9.500 x *g* por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Sobre o pellet formado foi adicionado 1 ml de etanol 75% (v/v) e o tubo foi centrifugado a 9.500 x *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi seco à temperatura ambiente com o tubo aberto por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, o RNA presente no pellet foi ressuspenso com 30 μ I de água livre de RNA e incubado a 57,5°C por 10 minutos para desnaturação. A solução foi quantificada em espectrofotômetro GeneQuant pro (GE *Healthcare*) com comprimento de onda de 260 nm. A pureza da amostra foi avaliada pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀).

¹¹ Acesso em: http://nbcr-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/

3.4.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de RNA total com transcriptase reversa (GoScript *Reverse Transcription System*, Promega). A reação foi iniciada com a adição de 2 pmol/µl de *primers forward*, 1 µg de RNA e água livre de nuclease em um volume total de 5 µl. A reação foi incubada em banho seco por 5 minutos a 70°C e resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados à solução de RNA e *primer* uma mistura contendo 4 µl do tampão de reação 5X GoScript, 1,2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP mix, 20 unidades Weiss de inibidor de ribonuclease recombinante RNasin, 1µl de transcriptase reversa GoScript e água livre de nuclease em um volume total de 15 µl. Todo o conteúdo foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos para o anelamento, seguido de extensão a 42°C por uma hora. Terminada a extensão, a solução foi incubada por 15 minutos a 70°C para inativação da enzima transcriptase reversa.

3.4.3 Delineamento de primers

Através do *software Primer Select* (DNA*Star*) foram delineados *primers* que delimitam as sequências dos genes codificadores de NcABPs a partir das sequências preditas, no ToxoDB, para transcrição em RNA mensageiro (RNAm). Aos *primers* foram adicionados sítios para as enzimas de restrição *Bam*H I (*primer forward*) e *Hind* III (*primer* reverso), conforme tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para a amplificação dos genes de ABPs ADF e CAP (NCLIV_012510 e NCLIV_054140). As bases sublinhadas correspondem aos sítios de restrição. Tm = temperatura de *melting.*

| Sequência | Nome | Sequência 5' – 3' | Tm (°C) |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|
| NCLIV_012510 | ADF_forw_BamHI | TTT <u>GGATCC</u> TCCGGAATGGGTGTT | 42 |
| | ADF_r <mark>ev_</mark> HindIII | TTT <u>AAGCTT</u> TGCGAGGGATGC | 40 |
| NCLIV_054140 | CAP_forw_BamHI | CCC <u>GGATCC</u> CTCGAACTACATTG | 34 |
| | CAP_rev_HindIII | TTT <u>AAGCTT</u> GCGCGAGTACAG | 40 |

3.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amplificações dos fragmentos NCLIV_012510 e NCLIV_054140 (NcADF e NcCAP, respectivamente) por PCR foram realizadas com os kits GoTaq *DNA Polymerase* (Promega) e *FastStart PCR High Fidelity* (Roche). Para as reações com

MATERIAL e MÉTODOS_

ambos os kits, foram utilizados tampão fornecido pelo kit, MgCl₂ 25 mM, 10 mM de cada dNTP, *primers* a 20 pmol, Taq 5 u/ul, 2,5 µl de cDNA e água em quantidade suficiente para 50 µM.

As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler (Eppendorf). Durante a PCR, a temperatura de anelamento variou com o passar dos ciclos (PCR tipo *touchdown*). As condições utilizadas foram: 2 minutos a 95°C para ativação da enzima Taq, seguidos de três etapas contendo 5 ciclos, 5 ciclos e 25 ciclos. Todas as etapas eram compostas por desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguida de anelamento com 50°C, 48°C e 45°C nos primeiro, segundo e terceiro ciclos, respctivamente. O anelamento foi seguido de extensão a 72° por 2 minutos. Ao final das três etapas, uma extensão de 72°C por 10 minutos foi realizada.

3.4.5 Preparo de insertos

Todo o volume dos produtos das reações contendo material genético (PCR ou digestão) foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). As bandas correspondentes ao tamanho predito foram e recortadas do gel com auxílio de um bisturi. O material genético foi purificado (item 3.4.11) e analisado novamente em eletroforese em gel de agarose. Após análise, os insertos foram ligados em plasmídeos.

3.4.6 Clonagem em plasmídeo de clonagem – pGEM-T Easy

A clonagem das sequências de ABPs selecionadas foi feita inicialmente em plasmídeo de clonagem pGEM-T *Easy* (Promega) (figura 8), conforme especificações do fabricante. Para isso, os insertos previamente purificadas, provenientes das PCRs foram ligadas em pGEM-T *Easy*. As reações foram realizadas com a adição de 2 μl do produto da PCR a 5 μl do tampão de ligação 2X, 1 μl (50 ng) do plasmídeo pGEM, 1 μl (3 unidades Weiss) de T4 DNA ligase, 3 μl de água Milli-Q autoclavada e incubação a 4°C por 18 horas.



Figura 8. **Mapa do plasmídeo pGEM-T** *Easy*, da Promega. O mapa mostra a localização de pontos de referência do plasmídeo. Fonte: Manual técnico da Promega.

3.4.7 Clonagem em plasmídeos de expressão

3.4.7.1 pGEM/pET, pET28a(+) e pET32a(+)

O pGEM/pET é um plasmídeo construído pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA e YATSUDA, 2013, patente depositada) que consiste em um híbrido de pGEM-T *Easy* (Promega) e pET28a(+) (Novagen). Para a construção desse plasmídeo, a região do promotor até o terminador *T7* presentes em pET28a(+) foram inseridas em pGEM, levando à construção de um plasmídeo de expressão que confere resistência à ampicilina e apresenta caudas de histidina N e C-terminais, cuja afinidade com resinas de níquel permite a purificação de proteínas recombinantes.

Os plasmídeos pET28a(+) e pET32a(+) (ambos da EMD Millipore) são plasmídeos comerciais (figura 9).



Figura 9. **Mapas dos plasmídeos de expressão.** Mapas mostrando regiões de interesse e localização de regiões de atuação de enzimas de restrição de: **A)** pET28a(+) e **B)** pET32a(+). Fonte: Manuais da Novagen.

3.4.7.1.1 Preparo dos plasmídeos de expressão e dos insertos

Os plasmídeos pGEM/pET, pET28a(+) ou pET32a(+) ainda fechados e sem insertos, assim como pGEM-T *Easy* recombinante foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III (tabela 2) a 37°C por 18 horas. Essas enzimas foram utilizadas com objetivo de liberar o inserto do pGEM-T *Easy* e abrir os plasmídeos de expressão, conferindo extremidades coesivas compatíveis aos insertos e ao plasmídeo. O isolamento dos plasmídeos e insertos foi realizado conforme item 3.4.6.

| | pGEM-T Easy | pGEM/pET | pET28/pET32 |
|---------------------------------|-------------|----------|-------------|
| Tampão 10X <i>FastDigest</i> ®* | 3 µl | 3 µl | 1,5 µl |
| BamH FastDigest®* | 1 µl | 1 µl | 0,5 µl |
| Hind III FastDigest®* | 1 µl | 1 µl | 0.5 µl |
| Material genético | 10 µl | 10 µl | 5 µl |
| Água Milli-Q | 15 µl | 15 µl | 7,5 µl |
| Volume total | 30 µl | 30 µl | 15 µl |

Tabela 2. Reações de digestão com *Bam*H I e *Hind* III. As reações foram mantidas em banho-maria por 18 horas a 37°C.

*O tampão e ambas as enzimas são FastDigest®, da Thermo Fisher Scientific.

3.4.7.1.2 Ligação do inserto nos plasmídeos de expressão

A reação de ligação foi realizada entre os plasmídeos de expressão pré-digeridos com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III e os fragmentos oriundos da reação de digestão com as mesmas enzimas do plasmídeo pGEM-T *Easy* e ocorreu na presença da enzima T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*). Para a reação foram adicionados 2 µI do tampão T4 DNA Ligase 10X, 50 a 100 ng dos plasmídeos pET28a(+) ou pET32a(+) e o fragmento a uma concentração de cerca de três vezes maior que a do plasmídeo, assim como 1 U Weiss da enzima T4 DNA Ligase. A reação foi incubada em banho a 16°C por 18 horas. Após 18 horas, 1 µI da reação de ligação foi transformado em linhagem eletrocompetente de *Escherichia coli* TOP10.

3.4.8 Extração de DNA plasmidial – Miniprep

A extração de DNA plasmidial ou *miniprep* foi realizada através do uso de *kit* comercial, onde todos os tampões e as colunas de afinidade ao DNA foram adquiridos comercialmente, ou pela utilização de tampões feitos no próprio laboratório. O *miniprep* por *kit* comercial foi utilizado em todas as etapas envolvendo a construção dos plasmídeos recombinantes. A extração sem *kit* comercial foi realizada na Universidade de Edimburgo, durante as tentativas de extração dos plasmídeos da cepa de *E. coli* JM101 para posterior transformação em *E. coli* BL21 (DE3).

3.4.8.1 Extração por kit comercial

As extrações de DNA plasmidial foram feitas utilizando *kit* comercial, salvo quando indicadas extrações sem utilização do *kit*.

Para os *minipreps* foi utilizado o *kit AxyPrep Plasmid Miniprep* (Axygen). As células de *E. coli* TOP10 foram sedimentadas após sucessivas centrifugações a 9.500 x *g* por 1 minuto a 4°C. Os pellets foram ressuspensos em 250 µl de *Buffer* S1. Em seguida, 250 µl do *Buffer* S2 foram adicionados e homogenizados por inversão dos tubos. O *Buffer* S3 foi adicionado (350 µl) às soluções, que foram homogeneizadas cuidadosamente por inversão. As amostras foram, então, centrifugadas por 10 minutos a 9.500 x *g* a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para microcolunas devidamente acondicionadas em tubos coletores. As colunas foram centrifugadas a 9.500 x *g* por 1 minuto a 4°C e o líquido resultante nos tubos coletores foi descartado.

As colunas foram lavadas com 700 µl de *Buffer* W2 e centrifugadas novamente sob as mesmas condições anteriores. Após descarte do conteúdo eluído, as colunas foram centrifugadas novamente na mesma velocidade e temperatura, agora por 2 minutos para a remoção de traços do tampão de lavagem. Os tubos coletores foram descartados, sendo trocados por tubos de 1,5 ml a serem acoplados às colunas. Finalmente, para a eluição dos plasmídeos, 40 µl de água Milli-Q autoclavada foram adicionados diretamente às matrizes da coluna, que foram incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugadas a 9.500 x *g* por 2 minutos. As soluções eluídas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

3.4.8.2 Extração sem kit comercial

Culturas de bactérias foram centrifugadas a 16.000 x g por 1 minuto e os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram submetidos a lise alcalina (modificado de BIRNBOIM; DOLY, 1979). Para isso, eles foram ressuspensos em 100 µl de solução A (apêndice A.1) e 3 µl de RNase A foram adicionados a cada 1 ml de solução. Após ressuspensão dos pellets, foram adicionados 100 µl do tampão de lise (apêndice A.2) recém preparado, seguido de 100 µl de solução K (apêndice A.3). A suspensão foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 16.000 x g por 5 minutos. Após lise celular, os plasmídeos foram isolados por purificação em coluna ou por precipitação por isopropanol.

3.4.8.2.1 Purificação em coluna

Para purificação dos plasmídeos por coluna, foram utilizadas mini colunas provenientes do *kit FastPlasmid Mini* (5 PRIME, *Fisher Scientific*). A solução resultante da lise celular foi adicionada sobre uma mini coluna, que foi centrifugada por 1 minuto a 16.000 x g. A coluna foi lavada com solução de lavagem fornecida pelo mesmo *kit* e os plasmídeos foram eluídos em água deionizada.

3.4.8.2.2 Precipitação por isopropanol

A precipitação por isopropanol foi realizada pela adição de um volume de isopropanol correspondente a 50% do volume da solução proveniente da lise celular. Essa solução foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, seguida de centrifugação de 30 minutos por 16.000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o pellet

foi lavado com solução de etanol 70% (v/v). Após centrifugação e remoção do sobrenadante, o pellet foi parcialmente seco a temperatura ambiente e ressuspenso com água deionizada.

3.4.9 Eletroforese em gel de agarose

Para as eletroforeses foram utilizados géis de agarose 0,8% ou 2% (p/v), preparados com tampão TAE (apêndice A.4), adicionados de 0,34 µg/ml de brometo de etídio (solução de 10 mg/ml, da Promega). As corridas foram realizadas uma cuba *Easy Cast Mini* (*Owl, Thermo Fisher Scientific*) em tampão TAE sob uma voltagem de 100 V e amperagem livre. As amostras foram preparadas por diluição em Tampão de Corrida (6 X *Orange* DNA *Loading Dye, Thermo Fisher Scientific*). Como marcadores de peso molecular, foram utilizados *GeneRuler* 1 kb DNA *Ladder* ou *GeneRuler* DNA *Ladder Mix*, ambos da *Thermo Fisher Scientific*.

3.4.10 Purificação de material genético a partir de gel de agarose

A extração e purificação do DNA a partir de géis de agarose foi feita através do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Inicialmente, a banda de interesse, presente em um gel de agarose e visualizada através da luz UV, foi recortada e extraída do gel com o auxílio de um bisturi limpo e transferida para um tubo de 1,5 ml. A banda recortada, contendo massa de no máximo 400 mg foi incubada com o Capture buffer (10 µl para cada 10 mg do gel) a uma temperatura de 60°C por 15-30 minutos, até a agarose ser completamente dissolvida e o tampão adquirir uma coloração amarela ou laranja-claro. Uma vez dissolvida a agarose, a solução foi transferida à microcoluna GFX MicroSpin acoplada a um tubo coletor, incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 13.000 x g por 1 minuto a 4°C, para que o fragmento de DNA se ligue à matriz de sílica da microcoluna. A solução eluída foi descartada e 500 µl do Wash buffer foram adicionados à microcoluna, que foi centrifugada sob as mesmas condições anteriores. Novamente o conteúdo eluído foi descartado e a coluna foi submetida a uma centrifugação de 2 minutos a 13.000 x g a 4°C para remoção completa do tampão de lavagem. Em seguida, o tubo coletor foi descartado e substituído por um tubo de 1,5 ml, que foi acoplado à microcoluna. Sobre a matriz da microcoluna foram adicionados 10-50 µl de água Milli-Q autoclavada e, após incubação de 1 minuto à temperatura ambiente,
a microcoluna foi centrifugada a 13.000 x *g* por 1 minuto a 4°C para recuperação do DNA, que foi armazenado em -20°C.

3.4.11 Sequenciamento

Os *minipreps* provenientes de células *E. coli* TOP10 transformadas com pGEM-T *Easy* e plasmídeos de expressão recombinantes (ligados às sequências de NcADF e NcCAP) foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Profa. Dra. Maria Helena Goldman, na FFCLRP (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto). O sequenciamento de insertos em pGEM-T *Easy* foi feito com *primers* T7 e SP8, enquanto que o sequenciamento de insertos em plasmídeos de expressão foi realizado com *primers* específicos para as sequências dos insertos (tabela 1).

3.4.12 Transformação em cepas de Escherichia coli

Para a transformação de plasmídeos em células de *E. coli*, foram utilizadas duas abordagens: a eletroporação e a transformação química. A eletroporação foi a metodologia-padrão utilizada para transformação durante a construção dos plasmídeos de clonagem e expressão recombinantes. A transformação química foi utilizada somente na Universidade de Edimburgo para transformação dos plasmídeos transportados até lá.

3.4.12.1 Preparo de células eletrocompetentes

Uma colônia de células *E. coli* TOP10 ou BL21 (DE3), previamente plaqueadas em meio LB ágar foi repicada e incubada por 18 horas e 37°C em 50 ml de meio LB. Todo o processo foi feito em meio sem antibiótico. Após 18 horas, 5 ml do caldo foram inoculados em 500 ml LB e incubados a 37°C sob agitação (250 rpm – em Incubadora de Bancada Refrigerada CT-712 R, Cientec) até OD a 600 nm atingir de 0,5 a 0,8 (medida realizada no equipamento Genequant, GE *Healthscience*). Em seguida, toda a cultura foi incubada em gelo por 30 minutos e centrifugado por 15 minutos a 3.000 x *g* a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 500 ml de água (Milli-Q esterilizada) a 4°C e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Feito o procedimento anterior por duas vezes, o pellet resultante foi homogeneizado em 20 ml de glicerol 10% (v/v) esterilizado, este foi centrifugado (3.000 x g, 15 minutos, 4°C) e o pellet obtido foi novamente ressuspenso em glicerol 10%, porém em 1 ml.

Para determinar se as células haviam atingido concentração mínima para transformação, 7,5 µl do conteúdo obtido foram diluídos em 742,5 µl de água Milli-Q e tiveram sua OD medida a 600 nm. A quantidade de células é ideal se a OD é maior que 0,5, o que corresponde a 1 x 10⁸ UFC. Aproximadamente 17 alíquotas de 55 µl cada, contendo, em média, ~3 x 10⁸ UFC, foram armazenadas a -70°C.

3.4.12.1.1 Transformação por eletroporação

As reações de transformação ocorreram em cepas de *E. coli* eletrocompetentes TOP10 ou BL21 (DE3). As ligações das sequências em plasmídeos foram transferidas (1 µl) a um tubo 1,5 ml mantido em gelo. A esse tubo foram transferidos 50 µl de células eletrocompetentes, previamente mantidas e descongeladas em gelo. O conteúdo do tubo, após ser cuidadosamente misturado, foi transferido à cubetas de 2 mm que foram eletroporadas sob as seguintes condições: C= 25μ F, PC= $200\Omega e V$ = 2,5kV em equipamento GenePulser Xcell, da BioRad. Após a eletroporação foram adicionados 250 µl de meio YNZ+ (apêndice D.1) e o material da cubeta transferido para um tubo falcon de 15 ml para agitação por uma hora (350 rpm a 37°C). Ao final da incubação, o material foi plaqueado por esgotamento em meio LB ágar seletivo contendo somente 50 µl/ml de ampicilina ou kanamicina. As placas contendo LB ágar foram incubadas a 37°C por 18 horas.

3.4.12.2 Preparo de células quimiocompetentes

Estoques em glicerol de células *E. coli* JM101 ou BL21 (DE3) foram inoculados em 10 ml de meio LB e incubados por 18 horas a 37°C com agitação. Em seguida, foram adicionados 35 ml de meio LB sobre as culturas, que foram incubadas novamente a 37°C sob agitação até que a OD₆₀₀ atingisse aproximadamente 0,5. As culturas foram resfriadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 4.500 rpm (Labofuge 400R – Heraeus) por 20 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados; as células foram gentilmente ressuspendidas em solução de CaCl₂ a 100 mM e incubadas em gelo por 40 minutos. As suspensões foram novamente centrifugadas na mesma condição anteriormente citada e as células foram

ressuspendidas em CaCl₂ 100 mM contendo 20% (v/v) de glicerol. As suspensões foram aliquotadas e armazenadas em -20°C ou -70°C por, no máximo, sete dias.

3.4.12.2.1 Transformação química

Volumes apropriados de solução contendo plasmídeos a serem transformados foram transferidos para tubos de 1,5 ml e 100 µl de bactérias quimiocompetentes foram adicionados sobre eles. As células e os plasmídeos foram gentilmente misturadas e mantidas em gelo. Após 30 minutos de incubação, as amostras foram transferidas para banho seco de 42°C por 90 segundos e transferidas logo em seguida novamente para o gelo durante 1 minuto. A reação foi plaqueada em LB ágar (apêndice D.3) seletivo (50 µg/ml de kanamicina) e incubada por 18 horas a 37°C. As colônias resultantes foram inoculadas em 5 ml de meio LB e incubadas por 18 horas a 37°C.

3.4.13 Expressão heteróloga

3.4.13.1 Expressão heteróloga em E. coli BL21 (DE3)

Inicialmente, para a expressão, células *E. coli* eletrocompetentes BL21 (DE3) foram transformadas com os plasmídeos pET28a(+) ou pET32a(+) recombinantes. As colônias foram repicadas em meio LB com 50 µg/ml de ampicilina (pET32a(+)) ou kanamicina (pET28a(+)) e incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação. Após esse período, 500 µl de cada cultura foram transferidos, em duplicata, para 5 ml de meio LB com 50 µg/ml de ampicilina ou kanamicina. Os meios foram incubados a 37°C até que a OD₆₀₀ atingisse 0,5 a 0,8. Atingida a OD necessária, uma cultura de cada duplicata foi induzida com 1 mM de IPTG, enquanto que a outra cultura foi utilizada como controle da expressão; as culturas foram incubadas por 3 horas a 37°C ou 18 horas a 18°C e 120 rpm de agitação. Após a indução de expressão, os conteúdos dos poços foram transferidos para tubos de 1,5 ml e os pellets coletados por centrifugação a 9.500 x *g* por 1 minuto.

3.4.13.1.1 Extração total

Os pellets de BL21 (DE3) coletados após a indução da expressão foram ressuspensos em Tampão Tris-HCI 100 mM (apêndice B.1), tampão de ligação

(apêndice B.2) ou ureia 8 M (apêndice B.3) e submetidos à extração por sonicação (intensidade 7 em *Sonic Dismembrator model* 100, *Fischer Scientific*). Em seguida, os tubos foram centrifugados 9.500 x g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes analisados por SDS-PAGE.

3.4.13.1.2 Testes de expressão e solubilidade de NcADF

Para os testes de solubilidade da proteína recombinante NcADF, foram utilizadas células *E. coli* quimiocompetentes BL21(DE3), transformadas quimicamente com o plasmídeo recombinante pET28a(+). As colônias foram repicadas em meios LB (apêndice D.2), TB (apêndice D.4) ou 2 X TY (apêndice D.5) contendo 50 µg/ml de kanamicina, que foram submetidos a incubação por 18 horas a 37°C sob agitação. Em seguida, um volume da cultura correspondente a 10% do volume final da expressão foi transferido para novo meio seletivo e essa cultura foi incubada a 37°C sob forte agitação (150 rpm) até que OD₆₀₀ atingisse 0,5 - 0,8. A expressão foi induzida com 0,2 ou 1 mM de IPTG e as culturas incubadas por 18 horas a 18°C, temperatura ambiente (~22°C) ou 27°C, sob agitação moderada (100 rpm). Os pellets foram coletados por centrifugação a 5.000 x *g* por 15 minutos.

3.4.13.1.2.1 Extração total

Após coleta dos pellets, para lise celular, estes foram submetidos a sonicação em diferentes tampões de solubilização com amplitude de 5 ou 13 microns (Soniprep 150, Sanyo) e cinco ciclos de congelamento e descongelamento em gelo seco. Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada a 5.000 x *g* por 40 minutos e o sobrenandante foi utilizado para purificação em resina de níquel.

Os tampões de solubilização utilizados nos testes de solubilidade foram:

- a) Tampão de solubilização 1: ver apêndice B.4;
- b) Tampão de solubilização 2: apêndice B.5;
- c) Tampão P: apêndice B.6.

3.4.13.1.2.2 Teste de expressão em presença de etanol

Foi realizado teste de expressão de NcADF em presença de etanol. O etanol é conhecido por aumentar a quantidade de proteínas recombinantes expressas

(CHHETRI et al., 2015; THOMAS; BANEYX, 1996) quando adicionado ao meio de cultura durante a indução e aqui foi adicionado para avaliar se sua presença seria capaz de aumentar a forma solúvel da proteína.

Inicialmente, estoque de *E. coli* BL21 transformada com pET28a(+) ligado a cDNA codificador de NcADF foi inoculado em meio TB contendo 50 µg/ml de kanamicina. A cultura foi incubada por 18 horas a 37°C sob agitação. O volume correspondente a 10% do volume de expressão foi transferido para outros frascos contendo meio TB, kanamicina e etanol a 0, 3, 5 ou 10% (v/v). Essa cultura foi incubada a 37°C sob agitação até que OD₆₀₀ atingisse 0,5 - 0,8. Em seguida, a expressão foi induzida com 0,2 mM de IPTG por 18 horas a 27°C.

Os pellets foram coletados e lisados com cinco ciclos de congelamento e descongelamento em gelo seco, seguidos de sonicação a 13 microns em tampão de solubilização 1. As suspensões foram centrifugadas a 16.000 x *g* por 1 minutos, o sobrenadante foi reservado e o pellet resultante foi solubilizado em ureia 8 M. Os extratos foram analisados (12 µl) em SDS-PAGE.

3.4.14 Purificação de proteínas recombinantes em resina de níquel

As purificações foram realizadas por cromatografia de afinidade em 500 µl de resina de níquel (Ni Sepharose 6 *Fast Flow*, GE *Healthcare* ou His-Pur, Thermo Scientific), cujos átomos de níquel carregados positivamente (Ni⁺²) interagem com a cauda de histidina das proteínas recombinantes em pH básico e baixa concentração de imidazol. Foram feitos dois tipos de purificação: 1) em tampão desnaturante ou 2) em tampão não-desnaturante.

3.4.14.1 Purificação em tampão desnaturante

Para purificação em tampão desnaturante, a resina foi empacotada em colunas vazias (*Empty Disposable* PD-10 *Columns*, GE *Healthcare*) e equilibrada com a passagem de 3 ml de tampão ureia 8 M pH 8,0. Após o equilíbrio, foram adicionados às colunas fechadas os extratos contendo as proteínas recombinantes, assim como 3 ml de tampão ureia 8 M e os sistemas foram submetidos à agitação por 10 minutos, permitindo a interação da cauda de histidina com o níquel da resina. Feita a incubação, o conteúdo foi dispensado (recolhendo-se uma amostra, denominada de *flow through*), a resina foi lavada novamente com 3 ml de tampão ureia 8 M e, em seguida,

tampão ureia 8 M pH 6,3 (6 ml). A proteína recombinante foi eluída através do tampão ureia 8 M pH 4,5 em alíquotas de 500 µl.

3.4.14.2 Purificação em tampão não-desnaturante

3.4.14.2.1 Após verificação de solubilidade das proteínas recombinantes

A purificação em solução não-desnaturante foi feita a partir da solução obtida após sonicação do pellet de BL21 com tampão de ligação. A coluna previamente empacotada foi equilibrada com 3 ml de tampão de ligação e, em seguida, a amostra foi adicionada e incubada com a resina por 10 minutos sob agitação. Após incubação, o conteúdo da coluna foi dispensado (*flow through*), uma alíquota foi recolhida e a coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação. A amostra foi eluída com tampão de ligação (apêndice B.7) em alíquotas de 500 µl.

Para análise das frações eluídas e recolhidas foram utilizados 200 µl da solução de Bradford 1:5 (Coomassie blue G-250, *BioAgency*), na qual foram misturados 20 µl de cada fração. Frações que apresentaram coloração azul na solução de Bradford foram submetidas SDS-PAGE 12,5%, utilizando-se 10 µl de cada amostra.

3.4.14.2.2 Purificação de NcADF solúvel

O sobrenadante proveniente da lise de *E. coli* BL21 após expressão foi adicionado a uma coluna previamente empacotada e equilibrada contendo resina de níquel. A coluna foi incubada por 30 minutos a 4°C com agitação. Uma vez que a proteína recombinante estava imobilizada na resina, a solução foi descartada passando através da coluna e a coluna foi lavada com 3 ml de tampão P, seguido de lavagem com 8 ml de tampão de lavagem (apêndice B.8). A proteína recombinante foi eluída em 10 ml de tampão de eluição 2 (apêndice B.9). Imediatamente após a eluição, 1 mM de EDTA e 1 mM de DTT foram adicionados à solução eluída.

3.5 Eletroforese em gel de acrilamida

3.5.1 Desnaturante (SDS-PAGE)

Para eletroforese, os géis de 10, 12, 12,5 ou 15% foram submetidos à voltagem de 120-200 V e amperagem livre em tampão de corrida (apêndice B.10) para SDS-

PAGE. As amostras foram diluídas em tampão 3 X (*New England Biolabs*) ou tampão Laemmli 4X (apêndice B.11). Como marcadores moleculares foram utilizados o *PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific)* ou *Protein MW Marker* (*Thermo Scientific*) e, para o gel a ser utilizado em *western blot*, os pré-corados *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific)* ou *Spectra Multicolor Protein Ladder (Thermo Scientific)*. As amostras foram submetidas à eletroforese até que o marcador azul do tampão de amostra atingisse a região posterior final do gel. Os géis foram corados com Coomassie G-250 (apêndice B.12), após fixação em tampão de fixação (apêndice B.13) ou Coomassie R-250 (apêndice B.14) seguido de descoloração em tampão de descoloração (apêndice B.15). As imagens foram obtidas por *Image Scanner (Amersham Biosciences*).

3.5.2 Não-desnaturante (PAGE)

Para eletroforese em condições não-desnaturantes, foram utilizados os mesmos procedimentos de SDS-PAGE, porém com ausência de SDS no gel e em tampão de corrida. Além disso, não foram utilizados marcadores moleculares e as amostras foram diluídas em *Gel Loading Buffer* (Sigma). Os géis foram corados com Coomassie G-250 e as imagens foram obtidas por *Image Scanner*.

3.5.3 SDS-PAGE 2-D

SDS-PAGE 2-D é uma técnica que separa proteínas por duas de suas características: o ponto isoelétrico (pl) e o peso molecular. Em uma primeira dimensão, a separação pelo pl é feita por focalização isoelétrica, que submete as proteínas a um gradiente de pH sob um campo elétrico, permitindo que elas se movam até uma posição onde sua carga líquida seja zero. A separação pela massa molecular ocorre em seguida e é feita através de SDS-PAGE

3.5.3.1 Primeira dimensão ou focalização isoelétrica

As proteínas de *N. caninum* foram extraídas de pellet recém purificado de mais de 1 x 10⁸ taquizoítas e as proteínas de células Vero foram extraídas de células provenientes de cultura confluente em garrafa pequena. Para isso, foram adicionados ao pellet 500 µl de tampão de reidratação (apêndice B.17). Os pellets foram

ressuspendidos no tampão adicionado e os tubos foram centrifugados em seguida a 9.500 x *g* por 5 minutos. Para hidratar as *strips*, 125 μ l de cada extrato (*N. caninum* e Vero) foram utilizados, equivalente a 5 x 10⁷ taquizoítas ou mais. A esse volume foram adicionados DTT (final de 0,2 mM; Promega) e IPG *buffer* 3-11 NL (5 μ l; GE *Healthcare*).

Os 125 µl da solução preparada foram utilizados para reidratar cada *strip* de 7 cm (*Rehydrate Immobiline DryStrip gel* 3-11 NL, da GE *Healthcare*), posicionadas em *DryStrip Reswelling Tray* (suporte para reidratação de tiras; *GE Healthcare*) e cobertas de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*, da GE *Healthcare*). O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 18 horas. Após a reidratação, as *strips* foram dispostas no suporte apropriado do equipamento *Ettan* IPGPhor 3 (GE *Healthcare*), cobertas com óleo mineral e submetidas às condições elétricas indicadas pelo fabricante das *strips* (tabela 3) para a focalização isoelétrica. As *strips* foram armazenadas a -70°C até a sua utilização.

| | Tira de 3-11 NL | | | | | | |
|-------|----------------------------------|------|-----|--|--|--|--|
| Etapa | Tipo de voltagem Voltagem (V) kV | | | | | | |
| 1 | Step and hold | 300 | 0,2 | | | | |
| 2 | Gradient | 1000 | 0,3 | | | | |
| 3 | Gradient | 5000 | 4,0 | | | | |
| 4 | Step and hold | 5000 | 2,0 | | | | |
| total | | | 6,5 | | | | |

Tabela 3. Condições utilizadas para a focalização isoelétrica das tiras de 7 cm 3-11 NL em equipamento *Ettan* IPGPhor 3. Corrida efetuada a 20°C e corrente de 50 µA por tira.

3.5.3.2 Segunda dimensão ou SDS-PAGE

Antes de submeter as *strips* ao SDS-PAGE, estas foram incubadas com 10 mg/ml de DTT em tampão de equilíbrio (apêndice B.18) por 15 minutos, seguida de incubação em 25 mg/ml de iodoacetamida (GE *Healthcare*) em mesmo tampão também por 15 minutos.

As *strips* equilibradas foram dispostas sobre o gel de acrilamida 12,5% e cobertas com o tampão de selamento (apêndice B.19), que solidifica-se sobre as tiras e o gel, possibilitando a distribuição homogênea da corrente elétrica durante a eletroforese. O sistema eletroforético foi submetido a voltagem livre e amperagem constante de 10 mA/gel por 15 minutos para entrada homogênea da amostra no gel e

o processo foi completado a 20 mA/gel até o azul de bromofenol atingir o fim do gel. Dois géis, corridos em paralelo, foram utilizados para *western blot* (item 3.8) ou coloração por Coomassie G-250 (item 3.5.1).

3.6 Extratos totais de N. caninum e células Vero

Para os extratos totais de *N. caninum* e células Vero foram utilizados aproximadamente 5 x 10^7 sonicados com 500 µl de ureia 8 M ou tampão de amostra (apêndice B.16). Os tubos foram centrifugados a 9.500 x *g* por 3 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados.

3.7 Imunização de camundongos

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do campus de Ribeirão Preto (CEUA) (Protocolo nº 12.1.1898.53.5, anexo 1). Os animais foram fornecidos pelo biotério central do campus Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (PUSP-USP) e mantidos no biotério de animais de experimentação da FCFRP-USP sob condições convencionais.

Camundongos machos da linhagem BALB/c foram imunizados por injeção intraperitoneal com concentrações conhecidas das proteínas recombinantes e antígenos-controle emulsionadas com igual volume de adjuvante completo ou incompleto de Freund, sendo aplicados 100 µl da emulsão por camundongo. Os antígenos utilizados foram: NcAct₂₀₁₋₃₁₀, NcADF e NcCAP, além de taquizoítas de *N. caninum* (controle positivo) e o tampão ureia 8 M (controle negativo) (para maiores detalhes sobre a imunização, ver tabela 4). NcADF e NcCAP recombinantes foram obtidas neste trabalho, enquanto que NcAct₂₀₁₋₃₁₀, proteína recombinante correspondente a fragmento de actina entre os aminoácidos 201 e 310, foi expressa durante o trabalho de mestrado (BARONI, 2012).

A primeira imunização ocorreu na semana 0 com adjuvante completo de Freund. Outras três imunizações foram realizadas com intervalos de 3 semanas com adjuvante incompleto de Freund. Na semana 12, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e foi feita exsanguinação por punção cardíaca para coleta do soro hiperimune, culminando com a morte dos animais por hipovolemia. O sangue dos animais foi incubado a 37°C por 20 minutos, seguido de 4°C por 2 horas. Os tubos foram centrifugados a 9.500 x *g* por 10 minutos a 4°C e o soro foi isolado, aliquotado e armazenado em freezer a - 70°C. Para a utilização, os soros provenientes do mesmo grupo de animais foram reunidos na mesma proporção volumétrica.

| Antígono | Q | n ⁰ do onimoio | | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Antigeno | Semana 0 | Semana 3 | Semana 6 | Semana 9 | nº de animais |
| NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ | 50 µg | 50 µg | 50 µg | 50 µg | 7 |
| NcADF | 5 µg | 80 µg | 50 µg | 50 µg | 7 |
| NcCAP | 5 µg | 80 µg | 50 µg | 50 µg | 6 |
| Taquizoítas de Nc* | 5 x 10 ⁶ | 5 x 10 ⁶ | 5 x 10 ⁶ | 5 x 10 ⁶ | 3 |
| Ureia 8 M | 20 µl | 20 µl | 20 µl | 20 µl | 3 |

Tabela 4. Detalhes da imunização de camundongos por proteínas recombinantes e antígenoscontrole. Os tipos de antígenos, quantidade aplicada em cada imunização e o número de animais utilizados estão especificados.

*Nc = Neospora caninum.

3.8 Western blot

Para western blot foram utilizados géis contendo amostras a serem analisadas. O conteúdo desses géis foi transferido para membrana de PVDF (0,45 µm, Millipore), previamente incubada em metanol por 5 minutos, em sistema semi-seco (TE PWR 77, GE). No equipamento de transferência, o gel de acrilamida foi posicionado sobre a membrana de PVDF e ambos foram acomodados entre folhas de papel filtro (Whatman) umedecidas em tampão de transferência (apêndice B.20). A transferência ocorreu a 0,81 mA/cm² de membrana por 1 hora e 15 minutos. Após a transferência, as membranas foram coradas em solução de DB71 (apêndice B.21) por 5 minutos sob agitação e foram marcadas quanto à posição do marcador molecular, além do início e fim da corrida. As membranas foram, então, descoradas com solução de descoloração 2 (apêndice B.22) e foram lavadas com PBS-T (apêndice B.23) por 5 minutos. Após a lavagem, elas foram bloqueadas em PBS-GT (apêndice B.24) a temperatura ambiente sob agitação. Passada 1 hora, foram feitas três lavagens de 5 minutos cada com PBS-T e as membranas foram, então, incubadas com soros anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀, anti-NcADF, anti-NcCAP ou anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 (Santa Cruz Biotechnology), diluídos em PBS-GT, por 18 horas a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente três vezes por 5 minutos em PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase (*Anti-mouse* IgG – *whole molecule* – *Peroxidase, antibody porduced in rabbit*, da Sigma-Aldrich) diluído em PBS-GT.

Para a revelação, as membranas foram expostas à mistura equivolumétrica dos reagentes ativadores de peroxidase (Luminol, *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo Scientific) em temperatura ambiente por 5 minutos. A quimioluminescência foi detectada por exposição a filme radiográfico (Ortho CP-G *Plus*, AGFA) em um chassi radiográfico (18 x 24 cm, GE). Após exposição, o filme foi imerso por 1 minuto em solução de revelação (Exsil MX), seguido de imersão em água e, por fim, 1 minuto de imersão em solução de fixação (Exsil MX). Os filmes foram escaneados em *Image Scan*.

3.9 Dot blot

Para o *dot blot* foram utilizadas membranas de PVDF e nitrocelulose. A membrana de PVDF foi previamente incubada em metanol por 5 minutos. Sobre as membranas foram colocados 10 µl de extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante (tampão de amostra, apêndice B.16) ou não-desnaturante (sonicado em tampão de ligação sem imidazol, apêndice B.25) e elas foram incubadas até a secagem das amostras. Após secas, as membranas foram submetidas aos processos anteriormente descritos para *western blot* de bloqueio com PBS-GT e incubação com concentrações conhecidas de soro e anticorpo secundário, além da revelação por quimioluminescência (item 3.8).

3.10 Ensaios Imunoenzimáticos – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

3.10.1 ELISA sobre células íntegras

Em uma placa de 96 poços (ELISA-*Plate*, Microlon, 96 W, *flat-bott*, *medium binding* – Greiner *Bio One*), foram imobilizados taquizoítas íntegros de *N. caninum* recém-purificados (1 x 10^6 taquizoítas por poço) ou de células Vero também íntegras (5 x 10^4 células por poço) em poços previamente tratados com poli-L-lisina (0,2)

mg/ml), ou ainda extrato total de N. caninum ou células Vero em ureia 8 M (12,5 µg/ml) em 100 µl de tampão de sensibilização (apêndice B.26) por 18 horas à temperatura ambiente. Os pocos foram, então, lavados três vezes com PBS-T e bloqueados por uma hora com 100 µl/poço de PBS-GTE (apêndice B.27). Os poços contendo taquizoítas ou células Vero íntegros foram tratados por uma hora com 0,5% (v/v) de Triton X-100 para permeabilização. Em seguida, foram adicionados aos poços 100 µl/poço das soluções de soros diluídos em PBS-GT_E, sempre em duplicata, e incubados por uma hora a 37°C. A incubação foi seguida de três lavagens com PBS-T. Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos secundários anticamundongo conjugados à peroxidase diluídos em PBS-GTE. Cada poço recebeu 100 µl das soluções de anticorpo secundário e foi incubado a 37°C por uma hora, seguido de três lavagens com PBS-T. Após as lavagens, foram adicionados a cada poço 100 µl da solução de TMB (Pronto para uso, Invitrogen), incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, com isolamento luminoso. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de HCl 2 M. Em seguida, a placa foi analisada em 450 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram plotados em gráficos.

3.10.2 ELISA sobre proteínas purificadas ou extrato total

Em uma placa de 96 poços (ELISA-*Plate*, Microlon, 96 W, *flat-bott*, *medium binding* – Greiner Bio One), foram imobilizados extrato total de *N. caninum* ou proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀ (12,5 µg/ml e 1,25 µg/ml, respectivamente) em 100 µl de tampão de sensibilização por 18 horas à temperatura ambiente. Os poços foram, então, lavados três vezes com PBS-T e bloqueados por uma hora com 100 µl/poço de PBS-GT_E. A eles foram adicionados 100 µl/poço das soluções de soros diluídos em PBS-GT_E, sempre em duplicata, e incubados por uma hora a 37°C. A incubação foi seguida de três lavagens com PBS-T. Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos anti-camundongo conjugado com peroxidase diluídos em PBS-GT_E. Cada poço recebeu 100 µl das soluções de anticorpo secundário e foi incubado a 37°C por uma hora, seguido de três lavagens com PBS-T. Após as lavagens, foram adicionados a cada poço 100 µl da solução de TMB, incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, com isolamento luminoso. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de HCl 2 M. Em seguida, a placa foi analisada em 450 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram plotados em gráficos.

3.10.3 Análises estatísticas

As análises dos resultados provenientes do ELISA foram feitas em *software* GraphPad Prism 5.01 (Graph Pad, USA). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e os grupos experimentais foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), além disso, valores entre diferentes amostras foram comparados utilizando o teste multicomparação Bonferroni e significância estatística considerada quando o nível de erro estatístico foi menor que 5% (ou p≤0,05).

3.11 Imunofluorescência

Foram realizados ensaios preliminares de imunofluorescência utilizando várias diluições dos soros obtidos a partir das imunizações de camundongos: anti-NcAct₂₀₁₋ 310, anti-NcADF e anti-NcCAP.

Para a imunofluorescência, foram utilizados taquizoítas recém purificados. Os taquizoítas foram imobilizados após os tratamentos de fixação, permeabilização e incubação com anticorpos em lâminas com poços de aproximadamente 4 mm demarcados com caneta hidrofóbica (PAP pen, Sigma-Aldrich). Os taquizoítas foram fixados com formaldeído (Sigma-Aldrich) 3,65% (v/v) diluído em PBS por uma hora a temperatura ambiente. Após fixação e três lavagens com PBS 1X, foi adicionada solução de permeabilização (apêndice B.28), seguida de incubação de 1 hora a temperatura ambiente. Após mais três lavagens, os taquizoítas foram bloqueados com solução BSA-Glicina 10X (apêndice B.29) por 18 horas a 4 °C. Passadas as 18 horas, os taquizoítas foram lavados três vezes e incubados com várias diluições dos soros anti-NcADF, anti-NcCAP ou anti-NcAct201-310 em solução BSA-Glicina (apêndice B.30) por 45 minutos a temperatura ambiente. Após outras três lavagens, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-camundongo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) a uma concentração de 5 µg/ml diluído em solução BSA-Glicina em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. A marcação do núcleo foi feita com 0,5 µM de iodeto de propídeo (Santa Cruz Biotecnology) por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de três lavagens. Para finalizar, foram adicionadas gotas de glicerol 60% (v/v) em PBS e a lâmina foi coberta com lamínula de 24 x 60 mm. As lamínulas foram seladas com esmalte para evitar a desidratação da amostra e as lâminas finalizadas foram armazenadas a 4 °C até a sua utilização.

Para a captação de imagens foi utilizado o microscópio confocal TCS-SP8 AOBS (Leica *Microsystems*) do Laboratório de Microscopia Avançada, da FCFRP-USP. Os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente, utilizado uma objetiva de 63X com imersão a óleo e a aquisição das imagens foi realizada com o laser Argônio 488 nm para o Alexa Fluor 488 e HeNe 543 nm para o idodeto de propídio. As imagens captadas foram processadas pelo *software* ImageJ 1.46r (*National Institute of Health*, USA).

3.12 Espectrometria de massas (MALDI)

3.12.1 Banda contendo NcCAP recombinante e spots de SDS-PAGE 2-D

Uma banda visualizada em SDS-PAGE contendo NcCAP recombinante foi recortada do gel e dividida em três; essa banda foi, portanto, analisada como três amostras distintas. Além da banda, *spots* identificados por *western blot* a partir da detecção por soros anti-NcADF e anti-NcCAP em géis SDS-PAGE 2-D contendo extrato total de *N. caninum* foram excisados com auxílio de bisturi e submetidos a descoloração, digestão e dessalinização.

3.12.1.1 Descoloração das bandas

Antes de realizar a digestão das proteínas presentes nas bandas e *spots*, estas foram descoradas com solução de NH₄HCO₃ (apêndice B.31). Inicialmente, as bandas foram lavadas com 100 µl de água Milli-Q. Após 10 minutos, a água foi aspirada. Esse processo foi repetido uma vez mais. Feitas essas primeiras lavagens, os *spots*/bandas foram incubados por 15 minutos com solução de NH₄HCO₃, seguidas de incubação de mesma duração com acetonitrila (ACN) 100%. As incubações com NH₄HCO₃ e ACN foram repetidas mais uma vez. Todas essas incubações foram realizadas em um volume de 100 µl sob vigorosa e rápida agitação em vórtex. A ACN tem a função de secar os fragmentos de gel de agarose e incubações com soluções aquosas alternadas com ACN realizam um "efeito esponja" nas bandas. Finalizada a última incubação com ACN 100%, os tubos foram dispostos no concentrador a vácuo *Speed* Vac (CentriVap *Concentrator*, Labconco) para secagem completa.

3.12.1.2 Digestão com tripsina

Para a digestão proteica, os *spots*/bandas foram incubados com 15 µl de tripsina 25 ng/µl (Promega) em solução de NH₄HCO₃ a 37°C por 18 horas. Os peptídeos foram extraídos com solução de extração (apêndice B.32) e o volume submetido ao ZipTip C18 (Millipore) para dessalinização e secos em *Speed* Vac.

3.12.2 Análise por MALDI

Os peptídeos secos foram enviados para análise por MALDI no laboratório de Espectrometria de Massas de Substâncias Naturais e Sintética Bioativas do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP).

3.12.3 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados através de buscas nos bancos de dados ToxoDB 28 e NCBI utilizando o *software* Mascot versão 2.6 (*Matrix Science*) e parâmetros de tolerância de massa para os peptídeos precursores foi de 50 ppm e para os fragmentos de íons 0.6 Da, permitindo duas clivagens perdidas. Como modificação fixa, foi utilizada a carbomidometilação da cisteína e a oxidação da metionina foi escolhida como modificação dinâmica.

3.12.4 Caracterização bioquímica

3.12.4.1 Preparação de actina e NcADF

Actina liofilizada de músculo esquelético de coelho e actina liofilizada de músculo de coelho marcada com pireno (N-(1pirenil) iodoacetamida) ou PI-actina foram adquiridos da Cytoskeleton, Inc. e reconstituídas como indicado pelo fornecedor. Foram feitos estoques de actina (10 mg/ml), que foram aliquotados e armazenados em frações de 20 µl a -70°C.

NcADF foi expressa e purificada em sua forma solúvel, seguida de diálise contra tampão de armazenamento (apêndice B.33) durante 18 horas a 4°C, com uma troca de tampão após 2 horas. A quantificação da proteína recombinante foi feita em espectrofotômetro (Ultrospec 200, Pharmacia Biochem) a 280 nm usando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e coeficiente de extinção 13.980 M⁻¹ cm⁻¹,

calculado em ProtParam ExPASy¹² (GASTEIGER et al., 2005). A solução contendo a proteína recombinante foi aliquotada em volumes de 800 ou 1500 μ l e armazenada em criotubos de 2 ml a -70°C. Antes do uso em ensaios bioquímicos, a solução de NcADF foi centrifugada a 105.000 x *g* (OptimaMAX, Beckman Coulter, rotor TLS-55) por 20 minutos a 21°C para remover agregados.

3.12.4.2 Ensaio de cossedimentação

Actina foi diluída em tampão-G (apêndice C.1) e a solução foi incubada em gelo por 1 hora e ultracentrifugada a 53.600 x *g* por 20 minutos a 4°C (Optima MAX *Ultracentrifuge*, Beckman, rotor TLS-55) para remover agragados. A polimerização de actina foi induzida por 30 minutos a 22°C após adição de 1/10 do volume de tampão-F 10X (apêndice C.2). Em seguida, actina polimerizada (actina-F; 5 ou 10 μ M) foi incubada com várias concentrações de NcADF em tampão de sedimentação (apêndice C.3) por 1 hora a 22°C. As reações foram ultracentrifugadas por 30 minutos a 105.000 x *g*. O sobrenadante foi armazenado e o pellet foi lavado uma vez. Ao pellet e sobrenadante foram adicionados volumes apropriados de tampão Laemmli 1X e tampão Laemmli 5X, respectivamente. Quantidades equivalentes de pellet e sobrenadante foram submetidos a SDS-PAGE 12% e as imagens dos géis foram feitas por uma câmera Fujifilm Finepix S2000HD. As bandas foram quantificadas por ImageJ 1.46r.

3.12.4.3 Cinética de actina

3.12.4.3.1 Polimerização

Para o ensaio de polimerização de actina, foi utilizada 10% de PI-actina (em concentração total de 5 μ M em 400 μ I) incubada com 0-6 μ M de NcADF por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado o equivalente a 1/10 do volume da reação de ME 10X (apêndice C.4) para conversão de Ca-ATP-actina para Mg-ATP-actina, seguido de incubação por 5 minutos. A polimerização de actina foi induzida com a adição de KMEI 10X (apêndice C.5). A fluorescência foi medida em cubeta de quartzo a temperatura ambiente por 3000 segundos usando excitação e emissão a 365 e 407 nm, respectivamente (LS 50 Perkin-Elmer *Luminescence Spectrometer*).

¹² Acesso em: http://web.expasy.org/protparam/

3.12.4.3.2 Despolimerização

Para a despolimerização, 20-25% de PI-actina (10 µM) foi polimerizada em presença de sais após adição de KMEI 10X e incubação por 1 hora a 22°C. A redução da fluorescência foi medida com os mesmos parâmetros utilizados no ensaio de polimerização. A despolimerização foi induzida pela diluição de PI-actina-F para 1 µM em presença de 0-10 µM de NcADF em KMEI ou para 0,1 µM em presença de NcADF em tampão-G. A fluorescência foi medida em cubeta de quartzo a temperatura ambiente por 2000 segundos usando excitação a 365 nm e emissão a 407 nm (LS 50 Perkin-Elmer *Luminescence Spectrometer*). As constantes de velocidade foram calculadas por ajuste de curvas de decaimento exponencial de uma fase em GraphPad Prism 5.

3.12.4.4 Ensaio de queda de bola - viscosimetria de baixo cisalhamento

O ensaio de queda de bola foi realizado conforme descrito em MACIVER et al., 1991 e ilustrado na figura 10. Foram utilizadas concentrações finais de 10 µM de actina e 0-10 µM de NcADF. Ambas as proteínas foram misturadas em 180 µl de tampão-G antes da adição de 20 µl de KMET 10X (apêndice C.10). As soluções foram inseridas em tubos capilares de vidro de 100 µl (Pyrex 100 µl, Corning), cujas bases foram seladas com plasticina. Os tubos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente (~22°C) e, em seguida, foram, um de cada vez, adicionados em um suporte levemente inclinado a aproximadamente 30° com relação à base. Uma bola de aço foi colocada na abertura superior do tubo capilar e o tempo que ela levou para percorrer 8 cm do tubo foi marcado. Como controle, foram utilizadas concentrações de 2,5 e 5 µM de gelsolina. Os resultados foram mostrados como viscosidade normalizada (medida como velocidade de queda da bola) para minimizar as diferenças entre as preparações de actina.



Figura 10. **Esquema mostrando o ensaio de queda de bola (viscosimetria).** Um capilar de 100 µl totalmente preenchido com solução de actina polimerizada em presença ou ausência de NcADF foi colocado no suporte, que apresenta uma inclinação de aproximadamente 30º e uma régua acoplada. A bola de aço foi colocada na parte superior do capilar e o tempo que ela levou para percorrer 8 cm foi cronometrado.

3.12.4.5 Estado estacionário

Várias concentrações de PI-actina-G a 10% (0,1 a 2 µM ou 0,1 a 5 µM) foram misturados a concentrações fixas de NcADF (10 µM) em tampão-G. A polimerização de actina foi induzida por adição de KMEI 10X e incubação por 19 horas a 22°C. A fluorescência foi medida usando 365 nm para excitação e 407 nm para emissão (LS 50 Perkin-Elmer *Luminescence Spectrometer*). As linhas de tendência foram determinadas no *software* Office Excel (Microsoft) e as equações geradas foram utilizadas para determinação da concentração crítica (Cc) de actina. Para determinar Cc, foram determinadas as intersecções das linhas de tendência geradas pelas condições testadas com as linhas de fluorescência basal ou de actina-G.

3.12.5 Interação com actina-G

3.12.5.1 Gel nativo

O estoque de actina foi diluído para 10 μ M em tampão-G-Mg (apêndice C.7). Actina associada a ATP (5 μ M; Sigma-Aldrich) foi incubada com 0-20 μ M NcADF em tampão-G-Mg contendo 15% (v/v) de glicerol por 15 minutos a 22°C. Em seguida, 20 μ I de cada reação foi submetida a PAGE nativo. Os géis foram corados com Coomassie G-250 (item 3.5.1). As imagens foram obtidas por *Image Scanner* (*Amersham Biosciences*) e as bandas foram quantificadas por ImageJ 1.46r.

3.12.5.2 Gel bidimensional de ensaio de interação

Estoques de actina foram diluídos a 10 μ M em tampão-G-Mg. ATP-actina-G (5 μ M) foi incubada com 20 μ M NcADF em tampão-G-Mg contendo 15% (v/v) de glicerol em volume total de 200 μ I por 15 minutos a 22°C. Em seguida, a reação foi submetida a PAGE nativo, com descrito no item 3.5.2, porém com adição de 0,2 mM de MgCl₂,0,2 mM de ATP e 0,5 mM de DTT no tampão de corrida e no gel. A reação foi dividida em pelo menos quatro poços de corrida; em dois deles foram corridos 20 μ I de reação e transferidas para membrana de PVDF (para *western blot,* item 3.8), outro (também contendo 20 μ I de reação) foi corado, enquanto que um poço maior, contendo 75 μ I da reação, foi submetido à segunda dimensão de eletroforese. Este poço foi recortado e acomodado sobre um gel desnaturante SDS-PAGE de 12,5% com gel de empilhamento e selado com tampão de selamento (apêndice C.8). Os géis foram corados com Coomassie G-250 (item 3.5.1) e as imagens foram obtidas por *Image Scanner (Amersham Biosciences*).

3.12.5.3 Indução química de formação de ligações cruzadas (cross-linking)

Interação proteína-proteína ocorre quando duas proteínas ou porções de proteínas aproximam-se a uma curta distância e, para ser significativa, é necessário que a interação seja estruturalmente definida, não somente uma colisão ao acaso (KLUGER e ALAGIC, 2004). Agentes químicos que promovem a formação de ligações cruzadas entre proteínas são utilizados em diversas estratégias de estudos de interação proteína-proteína, principalmente quando essas interações são fracas ou transientes. A formação de ligações cruzados é um processo químico que une duas ou mais moléculas por ligações covalentes. Aqui, foram utilizados dois agentes formadores de ligações cruzadas para avaliação de ligação entre NcADF e actina-G de coelho: o formaldeído e o EDC (etildimetilaminopropilcarbodiimida).

O formaldeído é um agente formador de ligações cruzadas bifuncional, ou seja, contém dois sítios reativos por molécula. É uma molécula pequena, contendo apenas quatro átomos, o que permite apresentar um braço espaçador relativamente pequeno (de 2,3 a 2,7 Å). Pela sua facilidade em atravessar membranas, o formaldeído é

frequentemente utilizado em histologia para fixação de tecidos e componentes celulares.

O EDC é um formador de ligações cruzadas de distância zero. Causa conjugação direta de carboxil (-COOH) a aminas primárias (-NH₂), sem que faça parte, no final da reação, da ligação amida formada entre as moléculas-alvo.

3.12.5.3.1 Formaldeído

A ligação entre NcADF e actina-G de coelho foi investigada utilizando-se formaldeído como agente imobilizador de ligações cruzadas (NADEAU; CARLSON, 2007). Para isso, 70 µl de solução contendo 5 ou 10 µM de actina de coelho e 5 ou 10 µM de NcADF recombinante em tampão de interação (apêndice C.8) foram incubadas a 22°C por 10 ou 30 minutos em presença de 0,4, 2 ou 4% (p/v) de formaldeído (a partir de solução estoque de paraformaldeído 6% (p/v) em água, pH 8,0). Após incubação, as reações foram finalizadas com adição de tampão Laemmli 4X e submetidas a SDS-PAGE e *western blot*.

3.12.5.3.2 EDC (etildimetilaminopropilcarbodiimida)

Para utilização de EDC como imobilizador de ligações cruzadas, foram feitas reações de 70 µl contendo 5 µM de actina de coelho e 5 µM de NcADF recombinante em tampão de interação. As reações foram incubadas a 22°C por 30 minutos e o EDC (Sigma-Aldrich) recém solubilizado em água foi adicionado a uma concentração final de 2 mM na reação em dois momentos: 1 mM foi adicionado no tempo 0 e 1 mM foi adicionado após 15 minutos de incubação. Após 30 minutos, a reação foi finalizada com adição de 9 mM de glicina e, em seguida, as reações foram submentidas a SDS-PAGE e *western blot*.



4. RESULTADOS

4.1 Fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF)

4.1.1 Análises in silico

Inicialmente, foi realizada uma busca em ToxoDB, no banco de dados de *Neospora caninum* linhagem Liverpool, com a palavra-chave "*actin depolimerizing factor*". A partir dos resultados, foi selecionada uma proteína denominada "proteína hipotética" (acesso: NCLIV_012510). Apesar da denominação "proteína hipotética", esta proteína estava anotada como ortólogo ou parálogo de fatores de despolimerização de actina (ADF) de *Toxoplasma gondii* e *Eimeria tenella*.

NCLIV_012510 é número de acesso para um gene localizado no cromossomo FR823386, na posição 225683-227017 (-). Esse gene compreende uma sequência genômica de 1.335 pb e possui um íntron. Após *splicing*, o RNAm apresenta 357 pb. A proteína predita codificada por esse gene apresenta 118 aminoácidos.

4.1.1.1 BLAST, domínios conservados e alinhamentos

4.1.1.1.1 NCLIV_012510

A busca em BLASTp, a partir da sequência proteica predita identificada por NCLIV_012510, revelou homologia com diferentes fatores de despolimerização de actina (ADF) com identidade de ~90% com ADF de *T. gondii* e de 61 a 67% com ADFs de várias espécies de *Eimeria*. Além disso, os resultados da busca mostraram domínios específicos de interface com actina-F e actina-G e que essa proteína pertence à superfamília ADF_gelsolina (figura 11). Através de uma análise mais detalhada dos domínios conservados dessa sequência em Pfam, observou-se a presença do domínio ADF-H (*actin depolymerising factor homology domain* ou domínio de homologia de fator de despolimerização de actina) compreendendo os aminoácidos 9 ao 117 (pf00241). Segundo a literatura, o domínio ADF-H é um módulo globular com capacidade de ligar-se à actina-G e actina-F que está presente em várias ABPs (POUKKULA et al., 2011) e assemelha-se ao domínio *gelsolin fold* encontrado na proteína gelsolina (HATANAKA et al., 1996; MACIVER & HUSSEY, 2002).

Conserved domains on [gi|325115899|emb|CBZ51453|] hypothetical protein NCLIV_012510 [Neospora caninum Liverpool]



Figura 11. **Detecção de domínios conservados em NCLIV_012510**. *Print screen* da tela ilustrando o resultado da análise por BLAST de proteínas (BLASTp) da sequência proteica predita cujo acesso é identificado por NCLIV_012510 em ToxoDB. São mostrados os domínios conservados e de interface com actina-G e actina-F desta sequência. A barra graduada mostra a sequência de aminoácidos. Triângulos amarelos (na direção da seta verde) indicam sítios de interface (ligação) com actina-G e actina-F; retângulo amarelos em fundo rosa indicam *hits* específicos e retângulos bege em fundo azul claro, *hits* inespecíficos. A superfamília está indicada no retângulo bege inferior.

A sequência NCLIV_012510 foi alinhada a ADF/cofilinas de diversas espécies (figura 12) e, a partir das estatísticas do alinhamento, foi possível observar que, dentre as sequências analisadas, NCLIV_012510, como esperado, apresentou maior identidade/similaridade com ADF de apicomplexas, como ADF de *T. gondii* (89/94%), seguida de ADF de *E. tenella* (62/77%) e ADF1 de *Plasmodium falciparum* (36/58%) (tabela 5). Dentre ADF/cofilinas de não-apicomplexas, a proteína de acesso NCLIV_012510 apresentou maior identidade e similaridade com actoforina de *Acanthamoeba castelanii*, com 30 e 46%, respectivamente (tabela 5).

Os resíduos de cofilina de *Sacharomyces cerevisie* responsáveis por interação com actina foram identificados por diferentes técnicas, mutagênese (LAPPALAINEN et al., 1997) ou por *Synchrotron protein footprinting* (GUAN et al., 2002; figura 12, triângulos pretos e vermelhos, e retângulo roxo). Foi possível observar que as regiões de interação com actina-G são mais conservadas em NCLIV_012510, enquanto que o sítio C-terminal, de ligação exclusiva com actina-F, encontra-se ausente, assim como em ADF de outros organismos apicomplexas (figura 12).

63

View Standard Results 🗸 😨

RESULTADOS_



Figura 12. Alinhamento de sequências proteicas de ADF/cofilinas de organismos representativos e estrutura secundária de fator de despolimerização de actina de Toxoplasma gondii. Sequências alinhadas utilizando o algorítmo ClustalW. Alinhamento de estrutura secundária realizado em ESPript. As sequências alinhadas, pela ordem, são: ADF1 de Arabdopsis thaliana (AtADF, acesso AAC72407), actoforina de Acanthamoeba castelanii (AcActophor, AAA02909), cofilina de Sacharomyces cerevisae (ScCof, AAA13256), cofilina de Schizosaccaromyces pombe (SpCOF, CAB11258); ADF1 de Homo sapiens (HsADF1, AAB28361); destrina de Bos taurus (BtDestrin, NM001015586); ADF de Trypanosoma brucei (TbADF, XP 844108); ADF1 de Plasmodium falciparum (PfADF1, XP 001351592); ADF2 de P. falciparum (PfADF2, XP 001350325); ADF de Eimeria tenella (EtADF, ABM89551); ADF de T. gondii (TgADF, AAC47717), ADF de Neospora caninum (NcADF, XP_003881486). Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos destacados em cinza representam similaridade entre as sequências. Tg = estrutura secundária de ADF de T. gondii. Setas alaranjadas indicam folhas-beta; retângulos verdes indicam alfa-hélices. Os sítios de ligação com actina identificados em S. cerevisiae estão indicados com triângulos sobre as sequências alinhadas: nos triângulos pretos, sítios identificados por mutagênese (LAPPALAINEN et al., 1997); nos triângulos vermelhos, sítios identificados por Synchrotron protein footprinting (GUAN et al., 2002). Resíduos necessários para ligação exclusiva com actina-F estão destacados em retângulo roxo.

Também foram feitas buscas por peptídeo sinal na sequência proteica os quais não foram encontrados.

A partir das análises feitas com NCLIV_012510, foi possível identificá-la como pertencente à família ADF/cofilina e foi denominada NcADF.

Tabela 5. Identidade/similaridade (%) ADF/cofilinas de diversas espécies. Valores obtidos a partir de alinhamento por ClustalW das sequências: ADF1 de Arabdopsis thaliana (AtADF), actoforina de Acanthamoeba castelanii (AcActo), cofilina de Sacharomyces cerevisae (ScCof), cofilina de Schizosaccaromyces pombe (SpCOF); ADF1 de Homo sapiens (HsADF1); destrina de Bos taurus (BtDestrin); ADF de Trypanosoma brucei (TbADF); ADF1 de Plasmodium falciparum (PfADF1); ADF2 de P. falciparum (PfADF2); ADF de Eimeria tenella (EtADF); ADF de Toxoplasma gondii (TgADF), ADF de Neospora caninum (NcADF). Com grifo, identidade/similaridade entre NcADF e as outras quatro sequências.

| Identidade/ similaridade (%) | AcActo | ScCOF | SpCOF | HsADF1 | BtDestrin | TbADF | PfADF1 | PfADF2 | EtADF | TgADF | NcADF |
|------------------------------------|--------|-------|-------|--------|-----------|-------|--------|--------|-------|-------|--------------|
| AtADF | 45/62 | 34/57 | 35/60 | 26/46 | 26/46 | 24/52 | 20/41 | 32/54 | 28/48 | 33/48 | <u>31/48</u> |
| AcActo | - | 40/68 | 46/67 | 29/51 | 29/51 | 29/54 | 23/44 | 31/51 | 30/46 | 29/46 | <u>30/46</u> |
| ScCOF | - | - | 58/76 | 28/48 | 28/48 | 34/58 | 21/43 | 28/46 | 27/44 | 28/42 | <u>28/42</u> |
| SpCOF | - | - | - | 30/48 | 30/48 | 36/55 | 15/40 | 30/50 | 32/47 | 31/45 | <u>29/44</u> |
| HsADF1 | - | - | - | - | 100/100 | 22/42 | 19/33 | 20/38 | 24/36 | 23/35 | <u>23/36</u> |
| BtDestrin | - | - | - | - | - | 22/42 | 19/33 | 20/38 | 24/36 | 23/35 | <u>23/36</u> |
| TbADF | - | - | - | - | - | - | 19/41 | 24/42 | 20/37 | 21/40 | <u>20/38</u> |
| PfADF1 | - | - | - | - | - | - | - | 25/51 | 35/56 | 36/59 | <u>36/58</u> |
| PfADF2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 28/50 | 27/47 | <u>27/47</u> |
| EtADF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 61/78 | <u>62/77</u> |
| TgADF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | <u>89/94</u> |

4.1.1.2 Predição da estrutura terciária de NcADF

4.1.1.2.1 Seleção e análise dos modelos estruturais

Após busca através de BLASTp em PDB (*Protein Data Bank* – Banco de dados de proteínas), foram selecionadas as cinco estruturas terciárias de ADF/cofilina com maior valor-E: ADF de *T. gondii* (TgADF; acesso PDB: 2L72/2MOT), Actoforina de *Acantamoeba castelanii* (AcActo; 1AHQ), Actoforina de *Acanthamoeba polyphoga* (ApActo; 1CNU), ADF1 de *Arabidopsis thaliana* (AtADF1; 1F7S) e ADF1 de *P. falciparum* (PfADF1; 3Q2B) (tabela 6).

Tabela 6. **ADF/cofilinas selecionadas como potenciais modelos para predição estrutural de fator de despolimerização de actina de** *Neospora caninum* **(NcADF). Modelos selecionados por BLASTp para análise de viabilidade para utilização em predição das estruturas de NcADF por modelagem molecular baseada em homologia. aa = aminoácidos; PDB = Banco de dados de proteínas; Valor-E = valor esperado, que representa parâmetro que descreve o número de** *hits* **esperado ao acaso quando buscada sequência de mesmo tamanho.**

| Identificação PDB | Proteína | Organismo | Cadeia | Tamanho (aa) | Valor-E |
|----------------------|------------------------|---------------------------|--------|-----------------|---------|
| 2L72 / 2MOT | ADF (TgADF) | Toxoplasma gondii | А | 139 | 1e-78 |
| 1AHQ | Actoforina (AcActo) | Acantamoeba castelanii | А | 137 | 1e-26 |
| 1CNU | Actoforina (ApActo) | Acantamoeba polyphoga | А | 137 | 6e-26 |
| 1F7S | ADF1 (AtADF1) | Arabidopsis thaliana | A | 139 | 4e-25 |
| 3Q2B | ADF1 (PfADF1) | Plasmodium falciparum | A | 124 | 4e-24 |

Em seguida, para avaliar a similaridade das estruturas terciárias selecionadas, com exceção de ApActo, por ser idêntica a AcActo, as quatro estruturas tiveram suas sequências proteicas alinhadas pelo método ClustalW (figura 13). A sequência proteica de TgADF obtida a partir do PDB continha uma cauda de histidina, que foi marcada com traço vermelho (figura 13, TgADF).

RESULTADOS_



Figura 13. Alinhamento de sequências proteicas de ADF/cofilina correspondentes aos modelos estruturais selecionados. Foram alinhadas as sequências proteicas dos quatro modelos estruturais depositados no PDB selecionados a partir de BLAST com NcADF. As sequências proteicas alinhadas são: ADF de *Neospora caninum* (NcADF); ADF de *Toxoplasma gondii* (TgADF), acesso PDB 2L72; ADF1 de *Plasmodium falciparum* (PfADF1), acesso: 3Q2B; Actoforina de *Acantamoeba castelanii* (AcActofor), acesso: 1AHQ; ADF1 de *Arabidopsis thaliana* (AtADF1), acesso: 1F7S. Na linha vermelha, cauda de histidina da sequência TgADF. Fundo preto indica identidade; fundo cinza indica similaridade entre os aminoácidos.

As mesmas estruturas tiveram a relação identidade/similaridade entre si avaliadas após alinhamento múltiplo (tabela 7). NcADF apresentou maiores valores de identidade/similaridade com TgADF (91/95%) e menores com AcActo (33/51%). Quanto à estrutura primária, AcActo e AtADF1 apresentam menor identidade com relação a NcADF, quando comparadas com TgADF e PfADF1 e maior identidade entre si (tabela 7).

Tabela 7. **Identidade/similaridade (%) entre os modelos de ADF selecionados por BLAST.** Valores obtidos a partir de alinhamento por ClustalW das sequências: ADF1 de *Plasmodium falciparum* (PfADF1); Actoforina de *Acantamoeba castelanii* (AcActofor); ADF1 de *Arabidopsis thaliana* (AtADF1); ADF de *Toxoplasma gondii* (TgADF). Com grifo, identidade/similaridade entre NcADF e as outras quatro sequências.

| Identidade/similaridade (%) | TgADF | PfADF1 | AcActoforina | AtADF1 |
|--------------------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| NcADF | <u>91/95</u> * | <u>36/58</u> | <u>33/51</u> | <u>34/52</u> |
| TgADF | - | 36/58 | 32/49 | 35/52 |
| PfADF1 | - | - | 22/43 | 20/43 |
| AcActoforina | - | - | - | 45/62 |

*Valores obtidos a partir de alinhamento de sequência proteica sem cauda de histidina (ver figura 13).

A similaridade entre estruturas secundárias dos moldes selecionadas foi avaliada por alinhamento estrutural. As sequências primárias e secundárias de TgADF, AcActof, AtADF1 e PfADF1 foram alinhadas (figura 14). As quatro estruturas apresentam-se conservadas com relação a disposição de folhas-beta e alfa-hélices, variando quanto ao tamanho dessas regiões ao longo da sequência de aminoácidos das diferentes proteínas (figura 14).





11

ŧ

JUDITION

,™

8

2

н ÷

00000

8

ہ2

I

222

<u></u>8



Para avaliar a similaridade entre as estruturas terciárias, foram obtidos os valores de RMSD (desvio médio quadrático) para a posição dos carbonos alfa (Cα) (tabela 8). Foi observado que uma maior identidade/similaridade entre as sequências primárias não está diretamente relacionada a uma maior similaridade entre as estruturas terciárias. Por exemplo, com 20/43% de identidade/similaridade entre PfADF1 e AtADF1 – menores valores dentre as proteínas analisadas –, o RMSD obtido foi 0,9 Å (tabelas 7 e 8). Além disso, a maior similaridade entre estruturas foi observada entre AcActo e AtADF1, com valor de 0,722 Å (tabela 8). O menor valor de RMSD entre as proteínas analisadas foi entre AcActo e AtADF1 (0,722), enquanto que o maior foi entre AcActo e TgADF, de 2,283 Å (tabela 8).

Tabela 8. Valores do Desvio Médio Quadrático (RMSD) de carbonos-alfa (Cα) entre estruturas terciárias selecionadas de ADF/cofilinas. Valores de RMSD obtidos após alinhamento estrutural em Pymol de estruturas PDB de ADF/cofilina selecionados 1F7S, 1AHQ, 3Q2B e 2L72, correspondendo a ADF1 de *Arabidopsis thaliana* (AtADF1), Actoforina de *Acantamoeba castelanii* (AcActofor), ADF1 de *Plasmodium falciparum* (PfADF1) e ADF de *Toxoplasma gondii* (TgADF), respectivamente. Valores em Å.

| | RMSD (A) | | |
|------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|
| | 1AHQ (AcActoforina) | 1F7S (AtADF1) | 2L72 (TgADF) |
| 3Q2B (PfADF1) | 1,497 | 0,90 <mark>9</mark> | 1,885 |
| 1AHQ (AcActoforina) | - | 0,722 | 2,283 |
| 1F7S (AtADF1) | - | <u>-</u> | 2,081 |

A partir das análises das estuturas selecionadas, foram utilizadas duas metodologias para modelagem molecular baseada em homologia de NcADF. Uma delas utilizando apenas TgADF como molde, uma vez que esta apresentou identidade maior que 90% com NcADF (tabela 7), e a outra realizando modelagem utilizando múltiplos moldes, considerando todas as estruturas selecionadas como molde para o modelo de NcADF.

4.1.1.2.2 Construção e validação inicial do modelos

Inicialmente, tanto através do tutorial básico (utilizando apenas um molde), quanto do tutorial avançado (múltiplos moldes), 25 modelos de NcADF foram gerados para cada construção. Todos os modelos gerados foram avaliados guanto ao DOPE (energia otimizada discreta da proteína) – potencial estatístico calculado pelo Modeller ao final da modelagem para avaliar os modelos de proteína construídos -, e aqueles DOPE, ou seja, aqueles energeticamente favoráveis, menor foram com selecionadados em cada construção (figura 15). Dentre os modelos gerados a partir de um único molde (TgADF), aquele que apresentou o menor valor de DOPE foi o modelo 11 (figura 15), que aqui foi denominado NcADF_11_básico. Dos modelos gerados por múltiplos moldes (sendo eles: AcActof, AtADF1, TgADF e PfADF1), aquele energicamente mais favorável foi o modelo 25 (figura 15), aqui denominado NcADF 25 avançado.



Figura 15. Energia discreta otimizada da proteína (DOPE) para os modelos gerados em modelagem molecular baseada em homologia do fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Para cada modelo construído foi calculado o valor global de DOPE através do *software* Modeller 9.12. Em círculos vermelhos (•), os valores de DOPE para os modelos construídos a partir de único molde; em quadrados verdes (•), valores de DOPE para modelos gerados a partir de múltiplos moldes. Nas setas, os modelos com menor valor de DOPE de cada modalidade de construção.

RESULTADOS

Após elecionados dois modelos energeticamente favoráveis dentre todos os gerados em cada tutorial, ambos foram submetidos a novas análises de qualidades estereoquímicas das moléculas.

Inicialmente, os modelos NcADF_11_básico e NcADF_25_avançado tiveram os valores de DOPE por aminoácido comparados entre si. A partir do gráfico da figura 16, é possível observar algumas regiões onde os valores de DOPE são menores em NcADF_25_avançado, comparado com NcADF_11_básico, como dos aminoácidos 75 ao 85 (figura 16), região que contém alguns resíduos conservados descritos como responsáveis para ligação com actina em levedura (figura 12). Porém, guando analisados os aminoácidos de 110 a 118, NcADF_11_básico apresenta menor DOPE (figura 16). Essa região também apresenta, em levedura, resíduo de ligação com actina (GLU126, glutamato, em cofilina de S. cerevisiae), porém, esse resíduo não é conservado em NcADF (correspondente a SER112, serina; figura 12). Desse modo, serão considerados os valores globais de DOPE para comparação, apresentados na figura 15. sendo -11520,10 para NcADF 11 básico e -11581.07 para NcADF_25_avançado; este último sendo, portanto, mais favorável.



Figura 16. Valores de energia otimizada discreta de proteína (DOPE) por resíduo de aminoácido para os modelos de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) gerados a partir de molde único ou múltiplo. Os valores gerados após modelagem por Modeller 9.12 foram plotados usando o *software* GANUPLOT. Na linha vermelha, valores de DOPE por aminoácido de NcADF_11_básico; na linha verde, NcADF_25_avançado.

Os modelos selecionados, que apresentaram menor DOPE global, também foram avaliados quanto à confiabilidade do enovelamento por Verify 3D. Esse software determina a compatibilidade do modelo de estrutura terciária (3D) com os aminoácidos da estrutura primária (1D), classificando cada resíduo conforme sua localização na estrutura e ambiente químico. O modelo NcADF_11_básico apresentou 89% dos média aminoácidos com uma 1D-3D acima de 0,2, enquanto que NcADF_25_avançado apresentou 100%. Ambos foram considerados aprovados, pois apresentaram valores maiores que 80% de resíduos 1D-3D acima de 0,2.

Ao realizar avaliação por Molprobity, foram considerados os parâmetros clashscore entre aminoácidos e Molprobity score. Para clashscore, são consideradas sobreposições estéricas de 0,4 Å ou mais entre dois átomos não ligados entre si e o valor gerado considera a situação global da proteína modelo, ou seja, essa pontuação avalia o choque entre cadeias laterais de aminoácidos. O Molprobity score considera clashscore, rotâmeros e avaliação de Ramachandran, normalizadas para mesma escala de resolução de raio-X. Os resultados das análises por Molprobity são gerados pelo software em uma tabela, utilizando coloração vermelha/amarela/verde como indicativo de gualidade: a cor vermelha indica má gualidade, amarelo indica gualidade intermediária e verde, boa gualidade. NcADF 11 básico e NcADF 25 avançado apresentaram clashscore de 62,29 e 63,95 sobreposições ruins (>0,4 Å) por 1000 átomos, respectivamente; ambos os resultados foram mostrados associados a coloração vermelha, indicando má qualidade dos modelos nesse quesito (tabela 9). Para valores de Molprobity score, esses modelos apresentaram valores de 3,04 (vermelho) para NcADF_11_básico e 2,63 (amarelo) para NcADF_25_avançado (tabela 9).

| Tabela 9. | Avaliação | dos mo | delos | construído | s de | fator de | e d | lespolime | rização | de a | ctina | de A | I. |
|-----------|--------------|-----------|---------|-------------|-------|------------|-----|-----------|---------|--------|---------|------|----|
| caninum. | Os modelos | s gerados | s foram | avaliados | por N | lolprobity | y e | Verify3D. | A cor v | ermelh | a indio | ca m | á |
| qualidade | e amarela ir | ndica qua | lidade | intermediár | ia. | | | | | | | | |

| | Verify3 | D | Molprobity | | |
|-------------------|--|-----------|-------------|---------------------|--|
| Modelos | % de resíduos 1D-3D acima de 0,2 | Resultado | Clashscore* | Molprobity score | |
| NcADF_11_básico | 88,98 | Aprovado | 62,29 | 3,04 | |
| NcADF_25_avançado | 100 | Aprovado | 63,95 | 2,63 | |

* Valor atribuído ao número de sobreposições ruins (>0,4 Å) por 1000 átomos.

Para determinar a qualidade da estrutura dos modelos gerados, a distribuição dos ângulos phi (ψ) e psi (ϕ) foi avaliada através do gráfico de Ramachandran, gerado por PROCHECK. Segundo Laskowski et al. (1994), um modelo é considerado satisfatório quando ao menos 90% dos resíduos encontram-se em regiões favoráveis. Desse modo, NcADF 11 básico apresentou 99% dos resíduos em regiões favoráveis, sendo 91,3% em regiões mais favoráveis, 7,7% em regiões adicionalmente permitidas, 1% em regiões generosamente permitidas (referente a ASN56, asparagina) e nenhum resíduo em regiões não permitidas (tabela 10 e figura 17, A). Ao analisar o modelo NcADF_25_avançado, observou-se que este também apresentou 99% dos resíduos em regiões favoráveis, porém 97,1% estavam em regiões mais favoráveis, 1,9% distribuídos em regiões adicionalmente permitidas e 1 % em regiões não permitidas (tabela 10 e figura 17, B). Apesar de ambos os modelos não variarem na quantidade de resíduos distribuídos em regiões favoráveis, NcADF_25_avançado apresentou uma maior quantidade de resíduos em regiões mais favoráveis do que NcADF_11_basico (tabela 10). Porém, NcADF_25_avançado também apresentou 1% dos aminoácidos em regiões não favoráveis, relativo a ASP99 (aspartato; figura 17, B, na região branca, em vermelho).

| | Modelos | | | | |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|--|--|--|
| Regiões dos residuos | NcADF_11_básico | NcADF_25_avançado | | | |
| Mais favoráveis (%) | 91,3 | 97,1 | | | |
| Adicionalmente permitidas (%) | 7,7 | 1,9 | | | |
| Generosamente permitidas (%) | 1,0 | 0,0 | | | |
| Não permitidas (%) | 0,0 | 1,0 | | | |

Tabela 10. Estatísticas dos gráficos de Ramachandran para os modelos construídos de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Os gráficos de Ramachandran foram obtidos após análise em PROCHECK. Valores mostrados em porcentagem (%).



Figura 17. Gráficos de Ramachandran para os modelos constuídos de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF). Gráficos obtidos por análise em PROCHECK. Os gráficos foram obtidos para os modelos NcADF_11_básico (A) e NcADF_25_avançado (B). Em vermelho, regiões permitidas; em amarelo, regiões adicionalmente permitidas; em amarelo-claro, regiões generosamente permitidas; em branco, regiões não-permitidas. Quadrado vermelho (•) indica aminoácido em região generosamente permitidas ou não-permitida. Sinais em preto indicam aminoácidos em regiões permitidas ou adicionalmente permitidas.

Considerando todos os parâmetros avaliados na validação dos modelos gerados por modelagem baseada em homologia de NcADF, aquele que se mostrou geometrica e esteroquimicamente mais favorável para seguir com as etapas da modelagem foi o modelo NcADF_25_avançado. Dentre as análises comparativas realizadas entre os dois modelos selecionados, NcADF_25_avançado somente mostrou-se menos favorável que NcADF_11_básico em *clashscore* (tabela 8) e por apresentar 1% dos aminoácidos em posição não favorável do gráfico de Ramachandran (tabela 8). O modelo NcADF_25_avançado foi utilizado, portanto, nas análises seguintes, enquanto que o modelo NcADF_11_básico foi descartado.

4.1.1.2.3 Refinamento e validação final do modelo

Para tentar melhorar a qualidade do modelo selecionado, considerando os parâmetros avaliados anteriormente, NcADF_25_avançado foi submetido a refinamento molecular por ModRefiner. Após a obtenção do modelo refinado, aqui denominado NcADF_25_avançado_REF, as mesmas análises de validação descritas

acima foram realizadas. O único parâmetro em que a molécula apresentou uma relativa piora foi em resíduos 1D-3D acima de 0,2, caindo de 100% (tabela 9) para 85,59% (tabela 11). Todavia, ainda considerado um resultado favorável. Pelas análises realizadas em Molprobity, tanto *clashscore*, quanto Molprobity *score*, mostram relativa melhora da estereoquímica da molécula refinada. O *clashscore* caiu de 63,95 sobreposições ruins por 1000 átomos, valor indicado como vermelho (tabela 13), para 0 (valor verde, tabela 11). Enquanto que a Molprobity *score* caiu de 2,63 (tabela 11), amarelo, para 0,51 (tabela 11), classificado como verde. Todos os valores obtidos na validação após refinamento foram, portanto, favoráveis.

Tabela 11. Validação dos modelos construídos de fator de despolimerização de actina de *N. caninum* (NcADF) após refinamento. Os modelos gerados foram avaliados por Molprobity e Verify3D. A cor vermelha indica má qualidade e verde, boa qualidade.

| | Verify | /3D | Molpro | probity | |
|-----------------------|--|-----------|-------------|---------------------|---|
| Modelo | % de resíduos 1D- 3D acima de 0,2 | Resultado | Clashscore* | Molprobity score | |
| NcADF_25_avançado_REF | 85,59 | Aprovado | 0 | 0,51 | 1 |

*Choque entre aminoácidos. Valor atribuído ao número de sobreposições ruins (>0,4 Å) por 1000 átomos.

A distribuição dos ângulos phi (ψ) e psi (ϕ) também foram avaliadas no modelo NcADF_25_avançado_REF. O gráfico de Ramachandran mostrou que 99% dos aminoácidos continuavam nas regiões favoráveis, mas agora com 95,2% nas regiões mais favoráveis e 3,8% nas regiões adicionalmente permitidas (tabela 12 e figura 18).

Tabela 12. Estatísticas dos gráficos de Ramachandran para os modelos construídos de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) após refinamento. Os gráficos de Ramachandran foram obtidos após análise em PROCHECK. Valores mostrados em porcentagem (%).

| | Modelo |
|-------------------------------|-----------------------|
| Regiões | NcADF_25_avançado_REF |
| Mais favoráveis (%) | 95,2 |
| Adicionalmente permitidas (%) | 3,8 |
| Generosamente permitidas (%) | 1,0 |
| Não-permitidas (%) | 0,0 |
Apesar de uma ligeira queda na quantidade de aminoácidos em regiões mais favoráveis, quando comparado com os resultados de NcADF_15_avançado (tabela 12), NcADF_15_avançado_REF não mais apresenta aminoácidos em regiões não-permitidas (tabela 12 e figura 18).



Figura 18. Gráfico de Ramachandran para o modelos de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) após refinamento. Gráfico obtido por análise em PROCHECK. O gráfico foi obtido para os modelos NcADF_25_avançado_REF. Em vermelho, regiões permitidas; em amarelo, regiões adicionalmente permitidas; em amarelo-claro, regiões generosamente permitidas; em branco, regiões não-permitidas. Quadrado vermelho (**■**) indica aminoácido em região generosamente permitida ou não-permitida. Sinais em preto indicam aminoácidos em regiões permitidas ou adicionalmente permitidas.

4.1.1.2.4 Descrição da estrutura NcADF_25_avançado_REF (NcADF)

A estrutura de NcADF resultante é formada por 5 folhas-beta e 3 alfa-hélices. Sendo uma alfa-hélice seguida de dois pares de folhas-beta antiparalelas intercaladas com uma alfa-hélice; após o segundo par de folhas-beta, há uma terceira alfa-hélice antecedendo mais duas folhas-beta (figura 19, A). Na figura 19, a estrutura terciária de NcADF gerada foi mostrada em forma de *cartoon* e superfície. Os aminoácidos MET1 e ALA118 estão destacados em NcADF para melhor visualização da estrutura. Observando a estrutura de NcADF gerada, fica evidente a ausência do F-*loop* mais pronunciado (figura 19, A, seta), quando comparada com estruturas terciárias de ADF/cofilinas que apresentam esse F-*loop* de maior tamanho, como actoforina de *Acanthamoeba castelanii* (figura 19, C, seta). O F-*loop* compreende a folha-beta 4 e folha-beta 5, assim como a região de transição entre elas, sendo atribuída aos aminoácidos 73-81 (de actoforina) dessa região a capacidade de ligar-se a actina-F (POPE et al., 2000). Em NcADF, a região exposta do pequeno F-*loop* é composta pelos resíduos GLY66 (glicina), ASN67 e LYS68 (lisina), aminoácidos hidrofóbico, polar e carregado, respectivamente. Dentre esses resíduos, somente LYS68 é conservada entre os modelos (figura 13).



Figura 19. Estrutura terciária de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Estrutura obtida por modelagem molecular baseada em homologia por Modeller 9.12 e visualizada em Pymol. A) NcADF representada na forma de *cartoon*. B) Representação da superfície de NcADF. Estruturas mostradas com giro de 180º entre si em relação ao eixo y. Primeiro (MET1) e último (ALA118) aminoácidos destacados em azul escuro e azul claro, respectivamente. C) Estrutura terciária de actoforina de *Acanthamoeba castelanii* (acesso: 1AHQ). Nas setas, o F-*loop*.

A partir da estrutura terciária construída, foi realizado o cálculo do potencial eletrostático de superfície de NcADF. O perfil de distribuição de carga está representado na figura 20, onde é possível analisar as regiões de carga positiva (azuis), negativa (vermelhas) e neutra (brancas) na superfície da molécula. Dos aminoácidos que compõem a região exposta do F-*loop* de NcADF, ASN67 e LYS68 aparecem positivamente carregados, enquanto que GLY66 é negativamente carregado (figura 20, setas e círculo).



Figura 20. Representação do potencial eletrostático da superfície de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum*. O potencial eletrostático de superfície foi calculado através do *software* APBS e visualizado em Pymol. Estruturas mostradas com giro de 180º entre si em relação ao eixo y. Em vermelho, potencial negativo (-5 kT); em branco, potencial neutro; em azul, potencial positivo (5 kT). Em magenta, à esquerda, NcADF em formato *cartoon*. Nas setas e círculo verde, região exposta do F-*loop*: glicina 66 (GLY66; seta), asparagina 67 (ASN67; seta) e lisina 68 (LYS68; círculo verde).

4.1.2 Clonagem e expressão

Para a clonagem de NcADF, foram delineados *primers*, conforme figura 21, o que resultou em uma sequência amplificada predita, a partir de cDNA, de 350 pb.

O cDNA, obtido por transcrição reversa a partir de RNA extraído de *N. caninum*, foi utilizado na PCR para amplificação da sequência NcADF (figura 21, A, poço 2, na seta). Confirmadas as condições de amplificação da sequência, o cDNA foi utilizado novamente em PCR, agora com enzima *High Fidelity* (figura 21, B, poço 2, asterisco). A enzima taq *High Fidelity* foi utilizada com objetivo de diminuir os erros de transcrição. A partir das PCRs, foi possível observar bandas de ~350 pb, como esperado.



Figura 21. PCR de sequência codificadora de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Géis de agarose 0,8% com resultados das PCRs de NcADF. A) PCR de NcADF. *Poço 1:* marcador molecular; *poço 2:* amplificação de NcADF. Na seta, amplificação da região codificadora de NcADF, com ~350 pb. B) PCR de NcADF com enzima *High Fidelity. Poço 1:* marcador molecular; *poço 2:* amplificação de NcADF; *poço 3:* controle negativo; reação sem cDNA. Em *, amplificação de NcADF, com ~350 pb. Marcador molecular indicado à esquerda em pb.

O fragmento amplificado foi clonado em plasmídeo pGEM-*T Easy*, que, em seguida, foi submetido à digestão, sendo detectado o fragmento de 350 pb, como predito, a partir de três colônias de *Escherichia coli* TOP 10 analisadas (figura 22, no asterisco).



Figura 22. Digestão de pGEM-*T Easy* ligado em sequência codificadora de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) com enzimas *Bam*H I e *Hind* III. Gel de agarose 0,8%. Os *minipreps* provenientes de três colônias transformadas com a ligação de NcADF em pGEM foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind* III. *Poço 1*: marcador molecular; *poço 2:* digestão de pGEM ligado à NcADF proveniente de *miniprep* a partir de colônia 1; *poço 3:* igual poço 2, porém proveniente de colônia 2; *poço 4*: igual poços 1 e 2, porém proveniente de colônia 3. Em *, NcADF, com ~350 pb; Em #, pGEM, com ~3000 pb. Marcador molecular indicado à esquerda em pb.

Após clonagem em pGEM/pET e posterior digestão do mesmo com *Bam*H I e *Hind* III, foi confirmada a presença de inserto de ~350 pb em três colônias analisadas (figura 23, no asterisco).



Figura 23. Digestão de pGEM/pET ligado em sequência codificadora de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) com enzimas *Bam*H I e *Hind* III. Gel de agarose 0,8%. Os *minipreps* provenientes de três colônias transformadas com a ligação de NcADF em pGEM/pET foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind* III. *Poço 1*: marcador molecular; *poço 2*: digestão de pGEM/pET ligado à NcADF proveniente de *miniprep* a partir de colônia 1; *poço 3*: igual poço 2, porém proveniente de colônia 2; *poço 4*: igual poços 1 e 2, porém proveniente de colônia 3. Em *, NcADF, com ~300 pb; Em #, pGEM/pET, com ~3500 pb. Marcador molecular indicado à esquerda em pb.

Foram feitas tentativas de expressão de NcADF em *E. coli* BL21, a 37° ou 27°C (2 horas ou 6 horas, respectivamente) com 1 mM de IPTG. Como não foi possível expressar NcADF recombinante a partir de clonagem em plasmídeo pGEM/pET nas condições testadas, o fragmento correspondente à sequência codificadora de NcADF foi clonado em pET28a(+) e pET32a(+) para novas tentativas de expressão. Para isso, o fragmento de região codificadora de NcADF previamente isolado e clonado em pGEM-*T Easy* foi digerido com *Bam*H I e *Hind* III, liberando fragmento de tamanho compatível (350 pb) (figura 24, A), e clonado em plasmídeos de expressão pET28a(+) ou pET32a(+). As clonagens nesses plasmídeos de expressão foram confirmadas após digestão com enzimas *Bam*H I e *Hind* III (figura 24, B e C).



Figura 24. Digestão de pGEM-*T Easy*, pET28a(+) e pET32a(+) ligados a fragmento codificador de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Gel de agarose 0,8%. Purificações de plasmídeos (*minipreps*) provenientes de colônias resultantes de transformações de ligações de NcADF em pGEM-*T easy* (A), pET28a(+) (B) e pET32a(+) (C) digeridos com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind* III liberou fragmentos correspondente ao tamanho esperado de NcADF (350 pb). A) Digestão de pGEM-*T Easy. Poço 1*: marcador molecular; *poço 2*: resultado da digestão. B) Digestão de pET32a(+) recombinante. *Poço 1*: marcador molecular; *poço 2*: resultado da digestão. C) Digestão de pET32a(+) recombinante. *Poço 1*: marcador molecular; *poço 2*: resultado da digestão. Em &, pGEM-T *easy*; em #, pET28a(+); em @, pET32a(+); em *, fragmento de NcADF. Marcador molecularindicado à esquerda em pb.

A identidade do inserto foi confirmada por sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pGEM-T *Easy*, pET28a(+) e pET32a(+).

Após ligação de NcADF nos referidos plasmídeos de expressão, os plasmídeos recombinantes pET28_NcADF e pET32_NcADF foram transformados em *E. coli* BL21. Três colônias foram isoladas de cada transformação e submetidas à expressão após indução ou não com 1 mM de IPTG a 37 °C por 3 horas. As três colônias provenientes da transformação de pET28_NcADF expressaram uma proteína de ~18 kDa (figura 25, A, poços 2, 4 e 6; no asterisco), peso molecular compatível com o predito de 12,9 kDa somado ao peso de ~5 kDa esperado com o acréscimo das histidinas e regiões complementares codificadas por pET28a(+). As três colônias de pET32_NcADF também expressaram proteína recombinante, sendo, como resultado, visualizada uma proteína em ~32 kDa (figura 26, A, poços 2, 4 e 6), o que também é compatível com o peso molecular esperado, uma vez que pET32a(+) acrescenta uma cauda de tioredoxina à proteína expressa, além das histidinas, com peso de ~18 kDa. Nesse caso, também foi observada a expressão de proteína recombinante nas amostras não induzidas com IPTG (figura 25, A, poços 1, 3 e 5).

RESULTADOS

Em seguida, foram realizados testes de solubilidade por sonicação em tampão não desnaturante Tris-HCl 100 mM do pellet de BL21 submetido a expressão, seguido de sonicação em tampão desnaturante ureia 8 M (que solubiliza os corpos de inclusão). Foi possível observar que NcADF recombinante encontrou-se solubilizada, em quantidades significativas, em tampão Tris-HCl 100 mM tanto quando expressa a partir de pET28a(+) (figura 25, B, poço 2), como quando expressa a partir de pET32a(+) (figura 26, B, poço 2).



Figura 25. Expressão de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) em pET28a(+). Géis de acrilamida 12,5% corados com Coomassie G-250. Eletroforese de extratos de cultura de *E. coli* BL21 obtidos por sonicação. As culturas foram submentidas à expressão após indução ou não por 1 mM de IPTG a 37°C por 3 horas. A) Três colônias de *E. coli* BL21 transformadas com pET28a(+) recombinante foram isoladas e submetidas ou não a IPTG para expressão. O extrato foi obtido por sonicação com ureia 8 M. *Poços 1, 3 e 5*: colônias 1, 2 e 3 não induzidas com IPTG; e *poços 2, 4 e 6*: colônias 1, 2 e 3 induzidas com IPTG. Em *, banda de aproximadamente 18 kDa resultante da expressão. B) Colônia 1 submetida à expressão e sonicada com tampão Tris-HCI 100 mM; *poço 2*: cultura induzida com IPTG sonicada com Tris-HCI 100 mM; *poço 2*: cultura induzida com IPTG sonicada com ureia 8 M. *Poço 4*: cultura induzida sonicada com ureia 8 M. NI = cultura não induzida com IPTG; I = cultura induzida com IPTG; Tris = cultura sonicada em tampão Tris-HCI 100 mM; Ureia = cultura sonicada em ureia 8 M. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

Também foi realizada a expressão de NcADF recombinante nos dois plasmídeos de expressão a 18°C por 18 horas, condição esta que, visualmente, permitiu solubilização da proteína em tampão não desnaturante em quantidades um pouco maiores do que a expressão a 37° C (figura 26, C, poço 3).

RESULTADOS



Figura 26. Expressão de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) em pET32a(+). Géis de acrilamida 12,5% corados com Coomassie G-250. Eletroforese de extratos de cultura de E. coli BL21 por sonicação. As culturas foram submetidas à expressão após indução ou não por 1 mM de IPTG. A) Três colônias de E. coli BL21 transformadas com pET32a(+) recombinante foram isoladas e submetidas ou não a IPTG por 3 horas a 37°C para expressão. O extrato foi obtido por sonicação com ureia 8 M. Poços 1, 3 e 5: colônias 1, 2 e 3 não induzidas com IPTG; e poços 2, 4 e 5: colônias induzidas com IPTG. Em *, banda de aproximadamente 32 kDa resultante da expressão. B) Colônia 1 submetida à expressão por 3 horas a 37°C e sonicada com tampão Tris-HCI 100 mM, seguida de sonicação em ureia 8 M. Poco 1: cultura não induzida com IPTG sonicada com Tris-HCI 100 mM; poço 2: cultura induzida com IPTG sonicada com Tris-HCI 100 mM; poço 3: cultura não induzida sonicada com ureia 8 M; poço 4: cultura induzida sonicada com ureia 8 M. C) Colônia 1 submetida à expressão por 18 horas a 18°C e sonicada com tampão Tris-HCI 100 mM, seguida de sonicação em ureia 8 M. Poço 1: cultura não induzida com IPTG e sonicada com Tris-HCI 100 mM; poço 2: cultura não induzida e sonicada com ureia 8 M; poço 3: cultura induzida e sonicada com Tris-HCI 100 mM; poco 4: cultura induzida e sonicada com ureia 8 M. NI = cultura não induzida com IPTG; I = cultura induzida com IPTG; Tris = cultura sonicada em tampão Tris-HCl 100 mM; Ureia = cultura sonicada em ureia 8 M. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

Após expressão da proteína recombinante NcADF em pET32a(+) e pET28a(+) a 18°C por 18 horas, a purificação em resina de Ni⁺² foi realizada (figura 27). Em pET32a(+), NcADF recombinante foi purificada em condições desnaturantes (ureia 8 M, figura 27, A) e não desnaturantes (tampão de ligação, figura 27, C). A proteína expressa a partir de pET28a(+), foi purificada somente em tampão não desnaturante (figura 27, B). A afinidade das recombinantes pela resina de Ni⁺² mostrou que foram expressas com cauda de histidina, como esperado, apesar da pureza das alíquotas eluídas não ser a ideal, pois apresentaram algumas bandas não específicas além da banda representada pela proteína recombinante. As condições de purificação da proteína recombinante NcADF em tampão não desnaturante (figura 27, A e B) foram aprimoradas em ensaios mostrados a seguir. A proteína em tampão ureia 8 M purificada foi utilizada para imunização de camundongos para a obtenção de anticorpo policional anti-NcADF.



Figura 27. Purificação em resina de níquel de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) recombinante. Géis de acrilamida 12,5% corados com Coomassie G-250. NcADF recombinantes obtidos a partir de expressão em pET32a(+) e pET28a(+) foram purificados em resina de níquel. **A**) Proteína NcADF recombinante expressa em pET32a(+) a 18°C por 18 horas e purificada a partir de extrato em ureia 8 M. *Poço 1*: extrato total de *E. coli* BL21 em ureia 8 M pH 8,0; *poço 2*: *flow through*. Extrato total após passagem pela resina de níquel; *poço 3*: proteína NcADF recombinante expressa em pET28a(+) a 18°C por 18 horas e purificada eluída em ureia 8M pH 4,5. Em #, proteína NcADF recombinante. **B**) Proteína NcADF recombinante expressa em pET28a(+) a 18°C por 18 horas e purificada a partir de extrato em tampão de ligação (apêndice B.2). *Poço 1*: extrato total de *E. coli* BL21 em tampão de ligação; *poço 2*: *flow through* (extrato total após passagem pela resina de níquel); *poços 3 a 6*: proteína recombinante eluída em tampão de eluição. Em *, proteína NcADF recombinante. **C**) Proteína NcADF recombinante expressa em pET32a(+) a 18°C por 18 horas e purificada a partir de extrato em tampão de ligação. Em &, proteína NcADF recombinante. E.T. = extrato total. F.T. = *flow through*. P = proteína recombinante eluída. U = extrato total em ureia. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.1.2.1 Clonagem e purificação de NcADF recombinante solúvel

A padronização das condições para purificação de NcADF solúvel foi realizada na Universidade de Edimburgo e, para que a expressão fosse possível, o plasmídeo NcADF_pET28 foi transportado da Universidade de São Paulo até Edimburgo ligados em colunas de miniprep, uma vez que que tentativas de transformação química em *E. coli* JM101 a partir da eluição dos plasmídeos transportados em papel filtro foram realizadas sem sucesso.

Os plasmídeos foram inicialmente transformados em células JM101 e purificados por lise alcalina seguida de precipitação do DNA com isopropanol, evitando o uso de colunas de miniprep que, apesar de eficientes na purificação da amostra,

RESULTADOS_

comprometem a quantidade de DNA recuperada. Os plasmídeos purificados a partir de precipitação com isopropanol foram transformadas em células BL21, resultando em colônias, que foram isoladas em meio LB seletivo.

Antes que NcADF recombinante fosse adequadamente expressa, algumas condições de expressão, extração e purificação foram testadas. Inicialmente, quatro colônias foram testadas para expressão de NcADF utilizando-se as seguintes condições: 5 ml de meio LB, 1 mM IPTG a 37°C por 3 horas. Após a expressão, as células foram lisadas por sonicação usando baixa amplitude (máximo de 5 microns). Quando os extratos foram submetidos a SDS-PAGE, a quantidade de proteína recombinante observada era muito pequena assim como a de proteínas totais. Esse resultado indicou uma necessidade de otimização das condições de lise celular. Para isso, a expressão foi feita novamente utilizando agora apenas um clone; as células foram lisadas com sonicação em alta amplitude (13 microns), seguida de cinco etapas de congelamento e descongelamento em gelo seco. Essa modificação na etapa de lise resultou em uma maior quantidade de proteínas totais, observadas em SDS-PAGE (não mostrado).

Com o objetivo de tentar aumentar ainda mais a quantidade de proteína recombinante solúvel expressa, o protocolo de expressão foi otimizado novamente. Para isso, foram testadas algumas condições como alteração de temperatura e do meio. Apesar dessas condições terem sido otimizadas anteriormente (figura 27), houve uma nova necessidade de avaliar as condições a temperaturas acima dos 18°C anteriormente estabelecidos para expressão solúvel, uma vez que não havia acesso a um agitador com temperaturas controladas abaixo da temperatura ambiente. Desse modo, foi utilizado, para expressão, um meio mais rico que o LB, o meio TB, e temperatura controlada a 27°C ou temperatura ambiente, de aproximadamente 22°C.

Visando aumentar a proporção entre NcADF recombinante solúvel e insolúvel, foi realizado um teste de expressão com adição de etanol ao meio de cultura. Ao meio TB, foram adicionados 0-10% de etanol e a expressão foi conduzida a 27°C por 18 horas em presença de 0,2 mM de IPTG. Nas condições testadas, o etanol não foi capaz de aumentar a quantidade de proteína recombinante solúvel em relação à quantidade de proteína solubilizada em ureia 8 M (figura 28). Além disso, em altas concentrações, o etanol inibiu o crescimento das bactérias (figura 28, poços 4 e 5, 8 e 9).



Figura 28. **Teste de solubilização de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum** (NcADF) recombinante. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie R-250. NcADF recombinante expressa em *E. coli* BL21 em meio TB a 27°C com 0,2 mM IPTG em presença de 0, 3, 5 ou 10% de etanol; as células foram lisadas por sonicação em tampão de solubilização 1 (apêndice B.4), seguida de sonicação em tampão ureia 8 M. *Poço 1: E. coli* BL21 não transformada com plasmídeo NcADF_pET28 sonicada em tampão de solubilização 1; *poços 2 a 6: E. coli* BL21 transformada com NcADF_pET28 submetidas a expressão em presença de 0, 3, 5 e 10% de etanol, respectivamente, e sonicadas em tampão de solubilização 1; *poços 6 a 9: Pellet*s resultantes das amostras dos poços 2 a 5, agora sonicados em ureia. C = amostra controle (BL21 não transformada com NcADF_pET28). Em *, NcADF recombinante. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

A proteína recombinante NcADF foi purificada em coluna contendo resina de Ni⁺² após expressão em 500 ml de meio TB, temperatura ambiente, 0,2 mM de IPTG e extração em tampão de solubilização 2 (apêndice B.5), tamponado com Tris 50 mM, e com adição de glicerol e Triton X-100, para aumentar a estabilidade da proteina em solução e extrair maior quantidade de proteína durante a lise, respectivamente. Apesar de haver pouca quantidade de proteína recombinante no gel (figura 29), notouse, visualmente, logo após a eluição da resina, a precipitação da proteína em solução; as alíquotas tornaram-se turvas. Esse comportamento da proteína recombinante, nessas condições de purificação, indicou a necessidade da busca de novas condições que permitissem uma estabilidade maior da proteína em solução.



Figura 29. Purificação da proteína recombinante fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). SDS-PAGE 12% corado com Coomassie R-250. Proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) em 500 ml de meio TB por 18 horas em presença de 200 nM de IPTG a temperatura ambiente (~22°C). *Poço 1*: as células BL21 foram lisadas em tampão de solubilização 2, *poço 2*: *flow through*; *poços 3 a 7*: alíquotas foram coletadas após eluição em tampão de eluição. Em *, proteína recombinante NcADF. E.T. = extrato total; F.T. = *flow through*; P1-P5 = proteína recombinante eluída, alíquotas 1-5 Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

As novas condições testadas em seguida levaram em consideração os componentes do tampão de solubilização, o pH desse tampão e a presença de EDTA após a eluição da proteína purificada da coluna de Ni⁺².

Quando NcADF foi expressa nas mesmas condições citadas acima e as células foram lisadas em tampão de solubilização 2, também houve precipitação da proteína recombinante imediatamente após purificação. Foi, então, adicionado às alíquotas recém eluídas 1 mM de EDTA, com objetivo de quelar os íons de níquel desprendidos da resina para a solução contendo a proteína purificada, uma vez que a afinidade desses íons pelas caudas de histidina associadas às proteínas poderia estar levando à formação de agregados. A presença de EDTA retardou a precipitação da proteína, que não ocorreu imediatamente. Todavia, foi observada precipitação após 48 horas de congelamento a -20°C.

Com objetivo de evitar qualquer precipitação da proteína recombinante, o pH do tampão de lise foi modificado para 7,0, uma vez que que o pl teórico de NcADF recombinante foi estimado em 8,7. A proteína NcADF foi expressa nas mesmas condições anteriormente citadas, porém a lise foi realizada em presença de tampão P (apêndice B.6), sendo idêntico ao tampão de solubilização 2, porém com pH mais

RESULTADOS

ácido (pH de 8,0 para 7,0). A eluição também foi feita em presença de EDTA e DTT, e foi observada uma estabilidade da proteína nessas condições.

Para uso posterior, foi realizada tentativa de diálise da proteína recombinante em tampão-G (apêndice C.1), a ser utilizado nos ensaios bioquímicos para solubilização de NcADF, porém houve precipitação da proteína dentro do tubo de diálise. A diálise foi realizada, portanto, contra tampão de composição próxima a do tampão P, porém com menor concentração de alguns componentes que pudessem, em altas concentrações, gerar interferência nos ensaios posteriores. A figura 30 mostra a proteína NcADF recombinante expressa e purificada, após diálise em tampão de armazenamento.



Figura 30. Expressão e purificação da proteína recombinante fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) solúvel. Proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) em 500 ml de meio TB por 18 horas em presença de 200 nM de IPTG a temperatura ambiente (~22°C). *Poço 1*: após expressão, as células BL21 foram lisadas em tampão-P; *poço 2*: *flow through*; *poço 3*: a solução eluída foi dializada por pelo menos 18 horas contra tampão de armazenamento. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.1.3 Detecção e localização de NcADF

A partir da proteína recombinante NcADF expressa em pET32a(+), camundongos foram imunizados. Após exsanguinação, os soros foram isolados. O soro aqui denominado anti-NcADF é composto por uma mistura equivolumétrica dos soros contendo os anticorpos policionais provenientes de todos os animais imunizados com NcADF.

4.1.3.1 Detecção de NcADF recombinante e nativa

O soro anti-NcADF obtido foi utilizado, inicialmente, para identificação de NcADF recombinante expressa em pET32a(+) (NcADF_pET32), mesma forma utilizada para imunização. O mesmo soro foi utilizado também para identificação de NcADF expressa em pET28a(+) (NcADF_pET28) e purificada em sua forma solúvel, assim como para detecção de NcADF endógena a partir de extrato total de *N. caninum*. Ambas as formas recombinantes foram detectadas pelo soro anti-NcADF (figura 31, A e B). NcADF_pET32 foi detectada como uma banda mais intensa de ~35 kDa e outra de ~70 kDa, podendo esta ser resultado de dimerização da proteína recombinante (figura 31, A); NcADF_pET28 foi detectada com ~18 kDa (figura 31, B). A utilização do soro em concentração 1:15.000 contra extrato total de *N. caninum* detectou três bandas de ~25, ~20 e ~14 kDa (figura 31, C). Considerando que o peso molecular predito para NcADF é de 12,9 kDa, a banda de ~14 kDa (figura 31, C, asterisco) seria a candidata mais indicada a corresponder à proteína buscada.



Figura 31. Detecção de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF). *Western blot* utilizando soro anti-NcADF e anticorpo secundário em concentração 1:10.000. Filme autorradiográfico a partir de transferência de conteúdo de SDS-PAGE. A) SDS-PAGE 15%. NcADF recombinante expressa em pET32a(+). Soro anti-NcADF 1:200.000. B) SDS-PAGE 12,5%. NcADF

recombinante expressa em pET28a(+) na forma solúvel. Soro anti-NcADF 1:15.000 **C)** SDS-PAGE 15%. Extrato total de *N. caninum* em tampão de amostra. Soro anti-NcADF 1:15.000. Em *, banda com peso molecular próximo ao predito para NcADF. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.1.3.2 SDS-PAGE 2-D

O extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante foi submetido a SDS-PAGE 2-D como mais uma ferramenta de caracterização de NcADF endógena através de *western blot* e espectrometria de massas. Duas *strips* foram submetidas à SDS-PAGE em paralelo. Um dos géis foi corado com Coomassie G-250 e o outro teve seu conteúdo transferido para membrana de PVDF, para realização de *western blot* com soro anti-NcADF 1:15.000. Foram observados oito *spots* marcados com soro anti-NcADF (figura 32, B). Os *spots* estavam distribuídos em três pesos moleculares: de ~15, 25 e 35 kDa; o pl dos *spots* de ~35 kDa variaram de 6 a 7,1, enquanto os *spots* de ~25 kDa apresentaram valores de pl entre 5,6 e 6,1. O *spot* de ~15 kDa, mostrou pl de 6. O pl foi calculado através do gráfico da figura 32, C. A partir da localização mostrada pelo *western blot*, os *spots* foram localizados no gel corado e sinalizados na figura 32A, conforme a figura 32B. Como controle, extrato total de células Vero equivalente a uma garrafa pequena de cultura foi utilizado em *western blot* 2-D com soro anti-NcADF, nas mesmas condições descritas acima, e não foram detectados *spots* (não mostados).

RESULTADOS



Figura 32. Detecção de fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) endógeno por padrão bidimensional. SDS-PAGE 12,5% e *strip* 3-11 não linear (NL). Extrato total de *N. caninum* em tampão de amostra contendo 5 x 10⁷ taquizoítas foi submetido à SDS-PAGE 2-D. A) SDS-PAGE 2D. Gel corado com Coomassie G-250. B) *Western blot*. Imunolocalização com soro anti-NcADF 1:15.000 e anticorpo secundário anti-camundongo 1:10.000. C) Gráfico utilizado para cálculo de pl a partir de *strip* 3-11 NL. Gráfico extraído do Manual *Data File 2-D Electrophoresis – Immobiline DryStrips Gel (Amersham Biosciences)*. Nas setas, *spots* indentificados por *western blot*. Peso molecular indicado à esquerda em kDa em A e B.

4.1.3.2.1 Identificação dos spots

Os oito *spots* de SDS-PAGE 2-D correspondentes àqueles detectados por soro anti-NcADF em *western blot* (figura 32, A) foram submetidos a espectrometria de massas para identificação das proteínas. Os resultados de MS/MS foram buscados em bancos de dados ToxoDB e NCBI. Dos oito *spots*, apenas quatro puderam ser identificados (tabela 13). Dentre os *spots* identificados, o de número 8 correspondeu ao acesso NCLIV_012510, de NcADF (tabela 13). Desse modo, foi possível confirmar a detecção de NcADF endógena pelo soro anti-NcADF. Tabela 13. Peptídeos identificados por espectrometria de massas (MS/MS) a partir dos *spots* de SDS-PAGE correspondentes à detecção de proteínas com soro anti-NcADF. As buscas foram feitas em ToxoDB 28 e NCBI. Em negrito, a identificação de fator de despolimerização de actina (NcADF).

| Spot | Peptídeo | Busca ToxoDB 28 (Identificação e acesso) | Busca NCBI (Identificação e acesso) | Score |
|------------|---|---|--|-------|
| Α1 | R.GSEAASAPYPVSEESTGGGAQDAPETDAR.G R.GSEAASAPYPVSEESTGGGAQDAPETDAR.G K.SCVCLCLLPVLMLALAMDK.A | NCLIV_046770 (putative transmembrane amino acid transporter – <i>N.</i> <i>caninum</i>) | - | 36 |
| | MLSNIDSIPTLTNVNYDGQK.V M.LSNIDSIPTLTNVNYDGQKVIDLMK.Q M.LSNIDSIPTLTNVNYDGQKVIDLMK.Q | - | E18064_360179 (proteína hipotética de <i>Elizabethkingia</i> <i>anophelis</i>) | 64 |
| A3 | R.ADVFEDFQGR.S | NCLIV_025240 (putative Gbp1p protein – <i>N.</i> <i>caninum</i>) | - | 37 |
| A4 | K.NMITGAAQMDGAILVVSAYDGPMPQTR.E R.VEQGTAKMNEAVEIVGGR.E | NCLIV_025450 (putative elongation factor Tu – <i>N. caninum</i>) | | 33 |
| A 8 | R.FGVYDCGNK.I K.IQFVLWCPDNAPVKPR.M | NCLIV_012510 (hypothetical protein – <i>N. caninum;</i> NcADF) | - | 101 |

4.1.3.3 Avaliação de reatividade do soro anti-NcADF contra NcADF solúvel

A reatividade do soro-anti NcADF foi testada contra pET28_NcADF por ELISA, uma vez que a utilização desse soro contra NcADF solúvel também foi utilizada em ensaios onde foi necessária detecção dessa proteína. Essa avaliação foi necessária, considerando que o soro foi obtido a partir de NcADF expressa em pET32a(+) e desnaturada. O soro anti-NcCAP (ver item 4.2) foi utilizado como controle.

Para avaliar a reatividade contra NcADF solúvel, foi realizado ELISA, onde foram imobilizados 100 µl de solução de NcADF a 2 µM em placa de 96 poços. O soro anti-NcADF foi utilizado em concentrações de 1:250 a 1:8.000 (figura 33, A, B e C) e visualizado após uso de anticorpo secundário associado a peroxidase em concentrações de 1:5.000 (figura 33, A), 1:10.000 (figura 33, B) ou 1:20.000 (figura

RESULTADOS

33, C). Como controle, soro anti-NcCAP também foi testado contra NcADF (figura 33). Apesar da esperada reação cruzada entre soro anti-NcCAP contra NcADF recombinante, uma vez que a imunização dos camundongos tanto com NcADF, quanto com NcCAP foi feita utilizando proteínas recombinantes contendo cauda de histidina e tioredoxina, a detecção foi mais acentuada quando soro específico anti-NcADF foi utilizado (figura 33). As diferenças foram significativas quando os soros foram utilizados em maiores concentrações em todas as concentrações de anticorpo secundário testadas (figura 33, A, B e C). Desse modo, o soro anti-NcADF gerado contra NcADF expressa em pET32a(+) e desnaturada mostrou-se reativo e específico contra NcADF expressa em pET28a(+) e em forma não desnaturada (figura 33, D).



Figura 33. Análise de detecção de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) recombinante solúvel expressa em pET28a(+) pelo soro anti-NcADF. Detecção por ELISA. Foram imobilizados 100 µl a 2 µM da proteína recombinante solúvel expressa em pET28a(+) em placas de 96 poços. As proteínas recombinantes foram submetidas a várias concentrações de soros anti-NcADF e anti-NcCAP. A), B) e C) Soros anti-NcADF e anti-NcCAP utilizados nas concentrações 1:250 a 1:8.000. A) Anticorpo secundário utilizado na concentração 1:5.000; B) Anticorpo secundário a 1:20000. D) Soros anti-NcADF e anti-NcCAP utilizados nas concentrações 1:500 ou 1:1.000 e soros controle anti-*N. caninum* e anti-ureia diluídos 1:500. Anticorpo secundário recombinante anti-*N. caninum* e anti-ureia diluídos 1:500. Anticorpo secundário (*) indicam p<0.05.

4.1.3.4 Imunolocalização

Para localização de NcADF endógena, taquizoítas recém-purificados de *N. caninum* foram submetidos a imunofluorescência por microscopia confocal.

NcADF, reconhecido pelo soro, foi localizado nos taquizoítas de maneira difusa pelo citoplasma, porém menos acentuada nas regiões apical e posterior (figura 34).



Figura 34. **Imunolocalização do fator de despolimerização de actina de Neospora caninum** (NcADF) em taquizoítas de *N. caninum*. Microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* purificados, imobilizados e marcados com soro anti-NcADF antes da imobilização em lâmina tratada com polilisina. A marcação foi feita com soro anti-NcADF diluído 1:500, visualizada com Alexa Fluor 488 e o núcleo, com iodeto de propídeo (IP). Imagens de campo claro, marcação com iodeto de propídeo, marcação de anti-NcADF visualizada com Alexa-Fluor 488 e sobreposição de imagens fluorescente e sobreposição completa. Escala indicando 5 µm.

4.1.4 Caracterização bioquímica e funcional de NcADF recombinante

Como pôde ser expressa de maneira solúvel, NcADF foi caracterizada através de ensaios bioquímicos e de interação com actina heteróloga de músculo esquelético de coelho, sendo aqui denominada apenas actina de coelho.

4.1.4.1 Cossedimentação com actina

Proteínas da família ADF/cofilina são conhecidas pela capacidade de desmontar filamentos de actina e interagir com actina-F. Essas habilidades foram investigadas em NcADF recombinante, usando o ensaio de cossedimentação com actina. Inicialmente, 10 μ M de actina-F foram incubados com 5 ou 20 μ M de NcADF em solução não tamponada por 1 hora antes de ser ultracentrifugada a 105.000 x *g*. A quantidade de actina e NcADF no sobrenadante e no pellet foram quantificadas. Ambas as concentrações de NcADF utilizadas neste ensaio foram capazes de aumentar a quantidade de actina detectada no sobrenadante, quando comparada a actina controle sem NcADF (figura 35). Além disso, o desmonte dos filamentos de actina foi maior quando NcADF estava presente em 20 μ M, mostrando um efeito dependente da dose (figura 35). A quantidade de NcADF no pellet e no sobrenadante foram quantificados e uma pequena porcentagem (10,5%) de NcADF foi detectada no pellet apenas quando adicionada em maior concentração (20 μ M; figura 35, na tabela).



Figura 35. **Despolimerização de actina-F de coelho por fator de despolimerização de actina de** *Neospora caninum* (NcADF). SDS-PAGE 12% corado com Coomassie R-250. Actina foi polimerizada em condições com altas concentrações de sais. Em seguida, actina-F foi incubada em presença de 5 ou 20 µM de NcADF recombinante e a mistura foi ultracentrifugada a 105.000 x *g* por 30 minutos a 4°C. *Pellet* (P) e sobrenadante (S) foram analisados em SDS-PAGE. As intensidades das bandas foram quantificadas por ImageJ e o resultado foi mostrado na tabela logo abaixo do gel.

A capacidade de ADF/cofilinas em cossedimentar com actina-F e desmontar os filamentos de actina é conhecida por ser regulada por pH em reações *in vitro* (HAWKINS et al., 1993). *In vivo*, a distribuição de ADF/cofilinas nas células, relacionada com regiões de actina-G e actina-F podem ser controladas pelo pH (BERNSTEIN et al., 2000). A influência do pH na atividade de NcADF foi testada na cossedimentação utilizando 5 μ M de actina-F em solução de sedimentação tamponada em pH 8,0 ou 6,5. Nessas condições, a densidade relativa de actina diminuiu no sobrenadante de maneira dependente da concentração de NcADF presente (figura 36), assim como observado em condições não tamponadas (figura 36). Apesar da presença em excesso de duas vezes a molaridade de actina, NcADF foi capaz de desmontar apenas uma quantidade limitada de actina-F, restando ~75% de actina no pellet (figura 36, A). Em ambas as condições de pH testadas, o efeito da presença de NcADF sobre a sedimentação de actina-F não foi sensível ao pH do meio (figura 36, A). Entretanto, a presença de NcADF no pellet (~8,5%) foi observada

apenas quando em pH mais baixo (6,5) e apenas quando NcADF estava presente em maior concentração (figura 36, B).



Figura 36. Efeito do pH na desmontagem de actina-F de coelho em presença de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Actina de coelho (5 μ M) foi polimerizada com tampão-F e incubada com diferentes concentrações de NcADF recombinante em pH alto e baixo. Após ultracentrifugação a 105.000 x *g*, *pellet* (P) e sobrenadante (S) foram analisados em SDS-PAGE e a densidade das bandas foi quantificada por ImageJ. A) Efeito do pH na quantidade de actina nos *pellet*s (círculos) e no sobrenadante (quadrados) em pH 6,5 (círculos e quadrados abertos pretos) ou 8,0 (círculos e quadrados preenchidos vermelhos) após incubação de actina com 5 ou 10 μ M de NcADF. B) Efeito do pH na cossedimentação de NcADF e actina-F no *pellet*. Os dados mostrados são resultado de dois experimentos independentes (média ± erro padrão).

4.1.4.2 Cinética de PI-actina

O efeito de NcADF na cinética de actina foi investigado usando actina de coelho contendo 10-25% de actina de coelho marcada com N-(1pirenil) iodacetamida (PI-actina). Nesses ensaios, a fluorescência de actina é medida durante o processo de polimerização, uma vez que a fluorescência de PI-actina filamentosa é 25 vezes maior que PI-actina monomérica (KOUYAMA; MIHASHI, 1981). A fluorescência medida é, portanto, proporcional à quantidade de filamentos de actina presentes na amostra.

4.1.4.2.1 Cinética de polimerização

Para investigar o efeito de NcADF na polimerização de actina, a fluorescência emitida por PI-actina 10% durante a polimerização em presença ou ausência de NcADF foi medida em função do tempo. PI-actina foi incubada com 0-6 µM de NcADF por 10 minutos antes de Ca-actina ser convertida em Mg-actina. A polimerização foi induzida pela adição de tampão KMEI. Dois experimentos foram obtidos com

resultados similares (figura 37). No primeiro experimento, actina foi reconstituída e prontamente utilizada (figura 37, A), enquanto que o segundo experimento foi realizado com actina descongelada (figura 37, B). Em ambos os resultados, foi possível observar um aumento na taxa inicial de polimerização (figura 37, A e B). Quando NcADF estava presente em concentração maior (6 µM) foi observada uma aceleração do estágio tardio de polimerização, caracterizando um pico seguido de queda na fluorescência (figura 37, A, quando presentes 6 µM de NcADF); efeito denominado *overshoot* ou de ultrapassagem.



Figura 37. Fluorescência de polimerização de actina em função do tempo em ausência ou presença de várias concentrações de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Actina de coelho (5 µM contendo 10% de PI-actina) foi incubada por 10 minutos com 0-6 µM de NcADF antes de Ca-actina ser convertida em Mg-actina pela adição de 10X ME (apêndice C.4). A polimerização de actina foi induzida com KMEI e a fluorescência foi medida com um espectrômetro de luminescência em função do tempo (excitação 365 nm e emissão 407 nm). **A)** Primeiro experimento

usando 0-6 μ M de NcADF e actina prontamente reconstituída. **B)** Segundo experimento usando 0-3 μ M de NcADF de actina descongelada.

4.1.4.2.1.1 Cinética de polimerização de actina com ou sem fosfato

Durante o ensaio de polimerização de actina foi observado o efeito de ultrapassagem na fluorescência quando NcADF estava presente em concentração de 6 µM. Esse efeito pode ser um indicativo de quebra de filamentos de actina (COOPER et al., 1986; MACIVER et al., 1991). Com o objetivo de avaliar o efeito do fosfato inorgânico na quebra de actina por NcADF, 5 µM ou menos de 10% PI-actina foram incubadas por 10 minutos com 10 µM de NcADF antes de converter Ca-actina em Mgactina. A polimerização de actina foi induzida pela adição de KMEI (apêndice C.5) contendo ou não 25 mM de tampão fosfato de sódio pH 8,0. Dois experimentos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da concentração de actina que foi 5 μ M no primeiro experimento (figura 38, A e B) e menos de 5 μ M no segundo (figura 38, C e D). Quando o segundo experimento foi realizado, um erro levou ao uso de menos de 5 µM de actina durante a execução do experimento. Essa diferença na concentração de actina em ambos os experimentos pode ser notada ao comparar as duas curvas de polimerização formadas pela actina, quando esta esteve presente sozinha. A polimerização de 5 µM de actina atingiu o estado estacionário em menos de 3000 segundos (figura 37); fato não observado guando actina esteve presente em menor concentração (figura 38, C). Apesar da concentração desconhecida de actina em um dos experimentos, foi possível observar o mesmo comportamento em ambos os testes realizados: a adição de fosfato inorgânico à reação não alterou a polimerização de actina nas amostras-controle (figura 38, A e C). Porém, o fosfato inibiu completamente o efeito de ultrapassagem observado na polimerização de actina em presença de NcADF (figura 38, B e D).

A partir do experimento conduzido para avaliação de fosfato, foi possível observar um outro efeito de NcADF na cinética de actina. Quando os resultados provenientes dos itens C e D da figura 38 foram plotados juntos, sem normalização dos dados, foi possível observar que na concentração de 10 µM, NcADF reduziu a taxa de polimerização de actina, ao contrário do observado com 0-6 µM de NcADF (figura 37).

RESULTADOS



Figura 38. Fluorescência de polimerização de Pl-actina em função do tempo em presença ou ausência de 10 μM de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) e 25 mM de tampão fosfato pH 8,0. Actina de coelho (5 μM contendo 10% de Pl-actina) foi incubada por 10 minutos com 0-6 μM de NcADF antes de Ca-actina ser convertida em Mg-actina pela adição de 10X ME (apêndice C.4). A polimerização de actina foi induzida com KMEI e a fluorescência foi medida com um espectrômetro de luminescência em função do tempo (excitação 365 nm e emissão 407 nm). A) 5 μM de Pl-actina incubada com 10 μM de NcADF em presença ou ausência de 25 mM de tampão fosfato. B) 5 μM de Pl-actina incubada com 10 μM de NcADF em presença ou ausência de 25 mM de tampão fosfato. C) Idem A, porém com concentração desconhecida de Pl-actina. D) Idem B, porém com concentração desconhecida de Pl-actina. C) norem com concentração dados das linhas finas (sem fosfato) de C e D, plotados sem normalização. Os dados apresentados foram normalizados.

RESULTADOS_

4.1.4.2.2 Cinética de despolimerização

Para avaliar o efeito de NcADF na cinética de despolimerização de actina, a fluorescência durante a despolimerização em presença ou ausência de NcADF foi registrada em função do tempo. Em um primeiro experimento, 10 µM de PI-actina foram polimerizadas com adição de KMEI e 1 µM de actina-F foi incubado com 1,25-10 µM de NcADF. A reação foi realizada em presença de altas concentrações de sais, isto é, em condições de polimerização. As condições utilizadas estabilizaram os filamentos, resultando em uma pequena diminuição da fluorescência de PI-actina (figura 39, A). Nessas condições, a presença de NcADF causou uma queda da fluorescência inicial de PI-actina, quando comparada ao controle (figura 39, A). Essa queda foi mais pronunciada quando 10 µM de NcADF estava presente e foi seguida de uma diminuição exponencial da fluorescência (figura 39, A). A partir do comportamento exponencial da diminuição da fluorescência, as constantes de velocidade (Kobs) foram calculadas e plotadas em função da concentração de NcADF. Os valores de Kobs indicam a probabilidade de actina-F sofrer quebra e a presença de altas concentrações de NcADF foram responsáveis pelo aumento de Kobs (figura 39, B).



Figura 39. Fluorescência de despolimerização de PI-actina em presença ou ausência de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) em condições de estabilização de filamentos. Actina de coelho (1 μ M contendo PI-actina 20%) foi diluída em tampão com altas concentrações de sais em presença de 0-10 μ M de NcADF. A) Fluorescência de PI-actina adquirida em função do tempo após misturar, da curva inferior para a inferior superior, 10, 5, 2,5, 1,25 ou 0 μ M de NcADF. Linhas pretas representam ajuste de curvas de decaimento exponencial. Linhas cinzas representam os dados obtidos a partir da medição de fluorescência. B) Constante de velocidade (K_{obs}) em função da concentração de NcADF.

Para evitar o efeito de queda de fluorescência quando NcADF foi adicionada e confirmar a relação entre K_{obs} e a concentração de NcADF, o ensaio de despolimerização foi realizado novamente, mas agora utilizando uma concentração de actina abaixo da concentração crítica e em presença de baixas concentrações de sais, isto é, condições que favoreçam o desmonte espontâneo dos filamentos de actina. Para isso, 0,1 µM de actina-F (PI-actina 25%) foi misturada a 0-0,4 µM de NcADF em tampão-G. Nessas condições, a queda na fluorescência inicial foi menor (figura 40, A), comparada às condições anteriormente utilizadas (figura 39, A).

Entretanto, a relação entre concentração de NcADF e Kobs manteve o crescimento (figura 40, B).



Figura 40. Fluorescência de despolimerização de PI-actina em presença ou ausência de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) em condições favoráveis à despolimerização de filamentos. Filamentos de actina de coelho (0,1 µM contendo PI-actina 25%) foi diluída em tampão contendo baixas concentrações de sais em presença de 0-0,4 µM de NcADF. A) Fluorescência de PI-actina adquirida em função do tempo após adição de 0, 0,05, 0,1, 0,2 ou 0,4 µM de NcADF. B) Constante de velocidade (Kobs) em função da concentração de NcADF.

4.1.4.3 Queda da bola - viscosidade de baixo cisalhamento

Com o objetivo de investigar a capacidade de quebra de filamentos de actina por NcADF, foi empregado um ensaio de viscosimetria, o ensaio de queda da bola (MacLEAN-FLETCHER e POLLARD, 1980). Sabendo que a viscosidade da amostra é uma função inversa da velocidade medida de uma bola em queda e que a presença de filamentos de actina aumenta a viscosidade da amostra, a redução da viscosidade

foi atribuída à quebra dos filamentos. Para realizar o experimento, 10 μ M de actina foram misturados a 0-10 μ M de NcADF e a polimerização foi induzida com KMET (apêndice C.6). A mistura foi incubada por 1 hora e a viscosidade foi obtida medindo a velocidade que a bola leva para percorrer o capilar contendo a solução de actina-F e NcADF. Como controle, também foram utilizados 2,5 e 5 μ M de gelsolina, uma ABP conhecida pela sua capacidade de quebra dos filamentos de actina.

NcADF reduziu a viscosidade e o efeito foi dependente da sua concentração (figura 41). Quando NcADF estava presente a uma concentração de 2,5 μ M, a viscosidade da solução foi reduzida em 25%, enquanto que a redução foi de quase 90% quando NcADF foi adicionada a 10 μ M (figura 41). A gelsolina, nas concentrações utilizadas, diminuiu a viscosidade de modo que a bola caiu tão rápido que não foi possível cronometrar o tempo.



Figura 41. Efeito do fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) na viscosidade de baixo cisalhamento de actina de coelho. Actina de coelho (10 μ M) foi polimerizada por 1 hora em presença de 0-10 μ M de NcADF após adição de KMET. A viscosidade foi medida como velocidade de queda da bola. Os dados foram normalizados e os resultados são representativos de dois experimentos independentes (média ± erro padrão).

4.1.4.4 Estado estacionário

Para avaliar o papel de NcADF no estado estacionário de actina de coelho, em um primeiro experimento, uma diluição seriada de PI-actina (0-2 µM; concentrada 10%) foi incubada com 0-4 µM de NcADF e a polimerização foi induzida, em seguida, com adição de KMEI. Após atingirem o equilíbrio, as reações tiveram a fluorescência

RESULTADOS_

medida e os resultados foram plotados *versus* concentração de actina. A fluorescência basal emitida por PI-actina monomérica foi calculada como a média dos valores de fluorescência que se mantiveram em uma linha imaginária basal (figura 42, A). Nas condições utilizadas, NcADF causou uma diminuição da fluorescência de PI-actina no estado estacionário em todas as concentrações em que esteve presente na reação (figura 42, A). Além disso, foi possível observar uma tendência de aumento da concentração crítica (Cc) de PI-actina com a elevação da concentração de NcADF. A Cc aumentou aproximadamente 2,5 vezes quando 4 µM de NcADF estava presente na reação (tabela 11). Também foi realizada uma reação-controle contendo somente o tampão de armazenamento, onde NcADF, com objetivo de avaliar se o tampão de armazenamento interfere no estado estacionário de PI-actina. A presença de tampão de armazenamento não causou alterações no Cc de PI-actina, quando comparado com as reações não contendo esse tampão (figura 42, A).

Para melhor avaliar o efeito de NcADF no estado estacionário de PI-actina, concentrações mais altas de PI-actina e NcADF foram utilizadas em um novo experimento. PI-actina em concentrações de 0-5 μ M foram incubadas, agora, com 10 μ M de NcADF. Além disso, para melhor observação da fluorescência basal, foram utilizadas, como controle, as mesmas concentrações de PI-actina sem adição de KMEI, ou seja, sem indução de polimerização. Os mesmos padrões foram observados, com relação ao primeiro experimento; a presença de NcADF causou diminuição da fluorescência de PI-actina no estado estacionário em as concentrações de PI-actina testadas e aumento a Cc (figura 42, B). A Cc de PI-actina foi estimada em 0,3 ± 0,083 μ M, calculada pela média dos valores obtidos nos dois experimentos (figura 42, A e B).



Figura 42. Efeito de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) no estado estacionário de actina de coelho. Várias concentrações de actina de coelho (contendo 10% de Plactina) tiveram a polimerização induzida com KMEI. As reações foram incubadas por 19-20 horas a 22°C e a fluorescência das amostras foi determinada. A) Experimento 1. Concentrações de Plactina de 0-2 μ M incubadas com 0 μ M (círculo aberto \circ), 1 μ M (triângulo fechado \blacktriangle), 2 μ M (triângulo aberto Δ) ou 4 μ M (losango aberto \diamond) de NcADF ou tampão de armazenamento (círculo fechado \bullet). B) Experimento 2. Concentrações de Pl-actina de 0-5 μ M incubadas com 0 (círculo aberto \circ) ou 10 μ M (triângulo aberto Δ) de NcADF; como controle, foram utilizados 0-5 μ M de Pl-actina monomérica (círculo fechado \bullet).

Em presença de 10 μ M de NcADF, a Cc de PI-actina foi 1,11 μ M (tabela 14). Para cálculo da Cc foram usadas as equações obtidas a partir das linhas de tendência do gráfico da figura 42 (apêndice E). Os valores da Cc em presença das concentrações testadas de NcADF estão listadas na tabela 14.

| | Experimento 1 | | | | Experimento 2 | | |
|----------------|---------------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| NcADF (µM) | 0 | 0 * | 1 | 2 | 4 | 0 | 10 |
| Cc actina (µM) | 0,242 | 0,234 | 0,343 | 0,376 | 0,627 | 0,359 | 1,111 |

Tabela 14. Valores de concentração crítica (Cc) de actina em presença de NcADF. A Cc foi calculada com base nas equações obtidas a partir da determinação da fluorescência de PI-actina e estado estacionário.

*Actina em presença de tampão de armazenamento.

4.1.4.5 Interação de NcADF com actina

Para investigar se NcADF interage com actina-G de coelho, foi realizado, incialmente o ensaio bidimensional de interação entre as duas proteínas, onde 20 µM de NcADF foram incubados com 5 µM de ATP-actina-G em tampão-Mg-G (apêndice C.7) por 15 minutos. A mistura foi submetida a PAGE nativo onde, em 2 poços foram aplicados 20 µl da reação e em um poço foram aplicados 75 µl da mesma reação. Após a corrida, os poços foram recortados; aquele contendo maior volume de reação foi posicionado sobre um gel desnaturante, ou seja, contendo SDS, e foi realizado um SDS-PAGE. Ao proceder dessa maneira, qualquer interação presente entre actina-G e NcADF seria desfeita e mostrada em SDS-PAGE como duas bandas de massa molecular diferentes, mas com a mesma localização, caso uma linha vertical imaginária seja traçada no gel. Quanto aos outros dois poços, um deles foi corado com Coomassie G-250, enquanto que o outro foi submetido a *western blot* e marcado com soro anti-NcADF.

No gel bidimensional, foi observada uma coincidência vertical entre as bandas compostas por NcADF (figura 43, A, seta vermelha) e actina-G (figura 43, A, seta azul), indicando interação entre as duas proteínas. Essa interação pode ser observada também no gel nativo antes da corrida desntaturante como uma banda entre NcADF e actina (figura 43, B, gel). A presença de NcADF nessa banda intermediária foi identificada por detecção com soro anti-NcADF (figura 43, B, WB). NcADF não penetrou efetivamente no gel, permanecendo na parte superior do PAGE nativo (figura 43, B e resultados não mostrados) e a quantidade de NcADF que foi detectada mais adiante no gel penetrou, possivelmente, por estar interagindo com actina (figura 43, A e B). A visualização de actina livre, sem interação com NcADF, foi possível na banda presente na maior distância a partir do início da corrida em PAGE nativo (figura 43, B). A presença de actina na banda intermediária foi visualizada no gel bidimensional,

na região verticalmente coincidente com NcADF (figura 43, A). A confirmação da corrida de actina e NcADF foi possível quando, em um novo ensaio nas mesmas condições previamente citadas, essas proteínas foram adicionadas em um poço adjacente ao gel nativo no SDS-PAGE, confirmando o peso molecular das proteínas provenientes do ensaio em PAGE nativo (figura 43, C, em P). Para melhor visualização e compreensão do ensaio de interação bidimensional, uma representação esquemática dos procedimentos e do resultado obtido foi feita na figura 43D.





Figura 43. Avaliação da interação de actina de coelho com fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). Ensaio bidimensional de interação entre proteínas. NcADF (20 μM) e actina de coelho (5 μM) foram incubadas por 15 minutos e submetidas a PAGE nativa 8%. A) Uma fatia do gel não-desnaturante correspondente a um poço semelhante ao posicionado acima do gel desnaturante, porém com mais que o dobro do volume de reação, foi recortada e posicionada sobre o gel SDS-PAGE 12,5% e submetida à eletroforese. B) Outra fatia foi corada com Coomassie G-250, enquanto que uma terceira fatia teve seu conteúdo transferido à membrana PVDF, que foi revelada com soro anti-NcADF diluído 1:15.000. C) SDS-PAGE nas mesmas condições de B; adicionado padrão com actina de coelho e NcADF recombinante no poço P (padrão). D) Representação entre NcADF recombinante e actina de coelho mostrado em A. Setas vermelhas, regiões onde NcADF coincide com actina; setas azuis, regiões onde actina coincide com NcADF.

RESULTADOS_

Para confirmar a interação entre NcADF e actina observada no ensaio bidimensional foram utilizados dois agentes formadores de ligação cruzada: formaldeído e EDC.

O formaldeído é amplamente utilizado para a fixação de estruturas celulares, devido ao pequeno tamanho de sua molécula e capacidade inerente de tornar estáveis interações transientes entre proteínas (SRINIVASA et al., 2015). Aqui, inicialmente, a capacidade desse composto em formar ligações cruzadas entre NcADF e actina de coelho foi avaliada em um ensaio *in vitro*. Para isso, NcADF recombinante e actina de coelho foram incubadas com presença de 0,4, 2 ou 4% de formaldeído por 10 ou 30 minutos. Como resultado, houve formação de uma banda adicional de ~60 kDa, além daquelas formadas por actina e NcADF. Essa banda corresponde à soma das massas moleculares das duas proteínas em questão. Ela foi observada quando concentrações de 2 e 4% de formaldeído foram utilizadas (figura 44, *poços 2, 3, 5 e 6*), sendo mais evidente em presença de 4% de formaldeído (figura 44, *poços 3 e 6*). A banda correspondente à interação entre NcADF e actina ficou mais evidente na incubação de 30 minutos e 4% de formaldeído (figura 44, *poço 6*), quando comparada à de 10 minutos com 4% de formaldeído (figura 44, *poço 3*).


Figura 44. Avaliação de interação entre fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) recombinante e actina de coelho utilizando formaldeído como agente formador de ligação cruzada. SDS-PAGE 12,5%. NcADF recombinante (10 μ M) e actina de coelho (10 μ M) foram incubadas em tampão de interação com presença de 0,4, 2 ou 4% de formaldeído por 10 ou 30 minutos. *Poços 1 e 4:* presença de 0,4% de formaldeído. *Poços 2 e 5:* 2% de formaldeído. *Poços 3 e 6:* 4% de formaldeído. *Poços 1 a 3:* incubação por 10 minutos. *Poços 4 a 6:* incubação por 30 minutos.

A avaliação de interação entre NcADF e actina de coelho foi repetida nas condições anteriores com incubação de 30 minutos e 4% de formaldeído. A formação da banda de interação antre NcADF e actina foi observada novamente com ~60 kDa (figura 45, A, seta). A mesma reação foi submetida a *western blot* para detecção de actina e NcADF com o anticorpo anti-β-actina C4 e soro anti-NcADF, respectivamente. A banda correspondente a actina, de 42 kDa, foi detectada, porém o anticorpo não detectou actina em 60 kDa (figura 45, B). O soro anti-NcADF detectou NcADF com ~18 kDa e ~60 kDa (figura 45, B). Apesar da falta de evidência de identificação de actina em peso molecular de 60 kDa, a presença de NcADF nessa região do gel indica interação de NcADF com actina. A falta de detecção de actina acima do peso molecular predito pode ter ocorrido devido a baixa sensibilidade do anticorpo para concentrações baixas de actina.

Além do formaldeído, o EDC também foi utilizado com agente formador de ligações cruzadas na reação de actina de coelho com NcADF recombinante. A reação

foi feita nas mesmas condições da reação descrita em presença de formaldeído: 30 minutos de incubação a 22°C. Foram utilizados 5 μ M de actina e NcADF e 2 μ M de EDC. Como resultado, uma banda de ~60 kDa também foi observada, indicando interação entre NcADF e actina (figura 45, C).



Figura 45. Avaliação de interação entre fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF) recombinante e actina de coelho utilizando agentes formadores de ligação cruzada. SDS-PAGE 12,5%. NcADF recombinante e actina de coelho foram incubadas em presença de agentes formadores de ligação cruzada por 30 minutos. **A)** Gel corado com Coomassie G-250. NcADF recombinante (10 μ M) e actina de coelho (10 μ M) foram incubadas em presença ou ausência de 4% de formaldeído por 30 minutos. *Poço 1*: actina e NcADF em ausência de formaldeído (C); *poço 2*: actina e NcADF em presença de formaldeído (F). **B)** *Western blot* a partir da reação em presença de formaldeído. Um gel contendo reações provenientes da mesma reação de B, foi transferido para membrana de PVDF e revelado com anticorpo anti- β -actina C4 ou anti-NcADF. *Poço 1*: anti- β -actina C4 (1:2.000); *poço 2*: anti-NcADF (1:10.000). **C)** Gel corado com Coomassie G-250. NcADF recombinante (5 μ M) e actina de coelho (5 μ M) foram incubadas em presença ou ausência de EDC. Após 30 minutos, a reação foi inibida com 9 mM de glicina. *Poço 1*: actina e NcADF em ausência de EDC. Nas setas, interação entre actina e NcADF.

4.2 Proteína associada a ciclase de N. caninum (NcCAP)

4.2.1 Análises in silico

Através das buscas em ToxoDB, foi selecionada também para este estudo a proteína associada a ciclase putativa (CAP – *Ciclase Associated Protein* – NCLIV_054140).

O acesso NCLIV_054140 identifica um gene localizado no cromossomo FR823392, na posição 816486 - 817469 (-), gene esse que apresenta 984 pb e 2 íntrons; sem íntrons, a sequência codificada por RNAm apresenta 672 pb. A proteína predita codificada por esse gene apresenta 223 aminoácidos.

4.2.1.1 Blast, domínios conservados e alinhamentos

A análise por BLASTp utilizando sequência proteica identificada por NCLIV_054140, com os mesmos parâmetros para a busca indicada para NcADF, mostrou similaridade com proteína associada a ciclase (CAP) de *T. gondii* e diversas espécies do gênero *Eimeria* – apontando identidade maior que 50% – e *Plasmodium*. Ao analisar os resultados da busca por domínios conservados, foi observada presença do multidomínio CAP C-terminal (CAP-C) (figura 46), enquanto que uma análise da mesma sequência em Pfam revelou que esta pertence à família CAP-C. Os resultados da busca em Pfam indicam que CAP-C (pfam08603) se encontra entre os aminoácidos 60 e 221.



Figura 46. **Detecção de domínios conservados em NCLIV_054140**. *Print screen* da tela. Resultado análise por BLAST de proteínas (BLASTp) da sequência proteica predita identificada pelo acesso NCLIV_054140 do banco de dados ToxoDB. Barra graduada mostra a sequência de aminoácidos; setas azuis sobre fundo rosa mostra *hits* específicos; retângulo azul sobre fundo azul indica *hits* não específicos; as superfamílias estão indicadas nos retângulos azuis sobre fundo amarelo; em cinza, os multidomínios.

Foi realizado um alinhamento entre NCLIV_054140 e CAP de outros organismos apicomplexas, assim como com Srv2 de Saccharomyces cerevisiae, de onde NCLIV 054140 apresentou maiores valores de identidade/similaridade com CAP de T. gondii (81/86%) e menores com Srv2 de S. cerevisiae (11/20%) (figura 47). Os valores de identidade e similaridade apontados são baseados no alinhamento da sequência proteica NCLIV_054140, conforme apresentada em ToxoDB, incluindo a região de 17 aminoácidos presentes antes da metionina (figura 47, seguência sublinhada). Com exceção de alguns aminoácidos da região N-terminal, CAP dos organismos apicomplexas alinharam-se à região C-terminal de Srv2 formada por estruturas de folhas-beta (figura 47), em consonância com a estrutura secundária de C. parvum, formada exclusivamente por folhas-beta (ver apêndice F). Essa região de folhas-beta na porção C-terminal de Srv2 e CAP de mamíferos compreende o domínio CAP-C (MAKKONEN et al., 2013; ONO, 2013), confirmando que CAPs de organismos apicomplexas são formadas apenas pelo domínio CAP-C. A identidade apresentada pela região de NCLIV_054140 alinhada à região correspondente ao domínio WH2 de Srv2 foi insignificante, enquanto que a identidade da sequência de N. caninum alinhada com a região C-terminal de Srv2 formada por folhas-beta foi de 35%. Esse é um valor aproximado da identidade de CAPs de E. tenella, C. parvum e P. falciparum com a sequência de N. caninum (figura 47).



/20% /100% /86% /49% /53% /47%

| | 510 | 520 | |
|-------|---------------------------|------------------------------------|-----|
| Srv2 | OMKHSFA. | DGKFKSAVFEHAG. | 11 |
| NcCAP | OF H H HIK. | .NGVLETR VSELY SR | 100 |
| TaCAP | QFHHNIK. | .NGVLHTR VSELY SC | 81 |
| CDCAP | CF VTKYNE: | SK G KLESMVSPLYG. | 34 |
| EtCAP | CF H H KLNP | . D gklhtrvsdlysc | 37 |
| PfCAP | CF Q H HLE. | . N G KLTTR VSDLY KF | 31 |
| | | | |

117

Figura 47. Alinhamento de sequências proteicas de proteínas associadas a ciclase (CAP) de organismos apicomplexas e Srv2 de Sacchaormyces cerevisiae. Sequências alinhadas utilizando MultAlin. Alinhamento de estrutura secundária de Srv2 de S. cerevisiae relizado em ESPript. As sequências alinhadas, pela ordem, são: Srv2 de S. cerevisiae (acesso NCBI: AAA350941), CAP de *Neospora caninum* (NcCAP, acesso ToxoDB: NCLIV_054140), CAP de *Toxoplasma gondii* (TgCAP, XP002364249); CAP de *Cryptosporidium* parvum (CpCAP, XP_626004), CAP de *Eimeria tenella* (EtCAP, CDJ399095) e CAP de *Plasmodium falciparum* (PfCAP, XP001350984). Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos em negrito representam similaridade. Os valores de identidade e similaridade das sequências com relação a NcCAP estão mostrados em seguida do alinhamento e foram obtidos por alinhamento por ClustalW. Setas representam folhas-beta. Sublinhada, sequência de 17 aminoácios de NcCAP antes da metionina. Os domínios e regiões de destaque estão representados em barras preenchidas cinzas e pretas acima das sequências alinhadas (baseado em CHAUDHRY et al., 2010; QUINTERO-MAZON et al., 2009 e informações do acesso P17555 em UniProtKD¹³).

Buscas por peptídeo sinal mostraram que essa proteína não apresenta região com essa função.

Com base na detecção de domínio conservado (CAP-C) na proteína cujo acesso é NCLIV_015410, assim como a identidade dessa proteína com proteínas associadas a ciclase, esse acesso será aqui denominado NcCAP ou proteína associada a ciclase de *N. caninum*.

4.2.2 Clonagem e expressão

Para obtenção da proteína NcCAP recombinante, foi, inicialmente, sintetizado o cDNA contendo a sequência codificadora de NcCAP. A partir desse cDNA, foi realizada PCR (figura 48, A, poço 2) e, após determinação das melhores condições de amplificação, a enzima *High Fidelity* foi utilizada para diminuir a chance de erros de anelamento (figura 48, B, poço 2). Como resultado da amplificação, uma banda de maior intensidade de ~700 pb foi observada (figura 48, A e B, poços 2); o predito para a sequência que foi amplificada é 660 pb.

¹³ Acesso em: http://www.uniprot.org



Figura 48. PCR da sequência codificadora de proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP). Gel de agarose 0,8% com resultados das PCRs para amplificação da sequência codificadora de NcCAP a partir de cDNA de *N. caninum*. A) PCR de NcCAP. *Poço 1*: marcador molecular; *poço 2*: amplificação de NcCAP. Na seta, amplificação de NcCAP, com ~700 pb. B) PCR de NcCAP com enzima *High Fidelity. Poço 1*: Marcador Molecular; *poço 2*: amplificação de NCLIV_054140; *poço 3*: controle negativo, reação sem cDNA. Em *, amplificação de NcCAP, com ~700 pb. Marcadodr molecularindicado à esquerda em pb.

O fragmento amplificado foi purificado do gel de agarose e ligado em pGEM-*T Easy*. Três colônias provenientes da transformação da ligação foram isoladas e tiveram o plasmídeo purificado. Os plasmídeos foram digeridos, sendo possível a detecção de um inserto de ~700 pb, valor próximo ao predito de 660 pb (figura 49, A).

Para expressão da proteína recombinante, o fragmento digerido a partir do plasmídeo pGEM-*T Easy* foi clonado em pGEM/pET. A ligação do fragmento no plasmídeo de clonagem foi confirmada por digestão, a qual liberou inserto de ~700 pb (figura 49, B).



Figura 49. Digestão de plasmídeos ligados à sequência codificadora de proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP). Gel de agarose 0,8%. Material genético proveniente de *minipreps* foram digeridos com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III. A) Os *minipreps* provenientes de três colônias transformadas com a ligação de NcCAP em pGEM foram digeridos. *Poço 1*: marcador molecular; *poços 2, 3 e 4*: digestão de pGEM recombinante ligado a cDNA codificador de NcCAP proveniente das colônias 1, 2 e 3, respectivamente. B) Os *minipreps* provenientes de três colônias transformadas com a ligação de NcCAP em pGEM/pET foram digeridos. *Poço 1*: marcador molecular; *poços 2, 3 e 4*: digestão de pGEM recombinante ligado a cDNA codificador de NcCAP proveniente das colônias 1, 2 e 3, respectivamente ligado a cDNA codificador de NcCAP proveniente das colônias 1, 2 e 3, respectivamente. Em *, NcCAP, com ~700 pb; em #, pGEM-T *easy*, com ~3000 pb; em &, pGEM/pET, com ~3500 pb. Marcador molecular indicado à esquerda em pb.

Após tentativa de expressão de *E. coli* BL21 transformada com cDNA codificador de NcCAP clonado em pGEM/pET, não foi observado resultado de expressão positivo para NcCAP. Desse modo, nova clonagem foi feita em plasmídeos de expressão pET28a(+) ou pET32a(+). Para isso, o fragmento que corresponde à região codificadora de NcCAP, previamente isolado e clonado em pGEM-*T Easy*, foi digerido novamente com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind* III e ligado nos referidos plasmídeos de expressão. A identificação e confirmação da identidade do inserto foi feita por sequenciamento tanto em pGEM-T *Easy* quanto nos plasmídeos de expressão pET28a(+) ou pET32a(+).

Após transformação dos plasmídeos recombinantes em *E. coli* BL21, duas colônias de cada (totalizando quatro colônias) foram isoladas e submetidas à expressão com indução ou não de 1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C. Após o tempo de indução, para verificar a solubilidade da proteína expressa, as culturas foram sonicadas com Tris-HCI 100 mM seguida de sonicação com ureia 8 M. Como resultado, foi observada expressão de proteína com peso molecular próximo a 35 kDa nas duas colônias transformadas com pET28_NcCAP (figura 50, A, poços 4 e 8, no asterisco). O peso molecular da proteína expressa estava um pouco acima do

predito de 29,6 kDa, considerando as caudas de histidina expressas pelo pET28a(+). Nas duas colônias provenientes da transformação com pET32_NcCAP, também houve expressão de proteína de ~50 kDa (figura 50, B, poços 4 e 8, no asterisco). Somada a cauda de tioredoxina e histidinas com NcCAP recombinante, seria predita a expressão de uma proteína de ~42 kDa. Ambas as formas recombinantes migraram em SDS-PAGE de maneira diferente da predita, apresentando peso molecular acima do esperado.

A partir dos testes de solubilidade, foi possível observar que as duas proteínas recombinantes permaneceram em ureia 8 M, indicando uma expressão de NcCAP preponderante em corpos de inclusão (figura 50, A e B, poços 4 e 8).



Figura 50. Expressão e avaliação da solubilidade da proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP) em pET28a(+) e pET32a(+). SDS-PAGE 12,5% corados com Coomassie G-250. As culturas foram submetidas à expressão após indução ou não por 1 mM de IPTG. Duas colônias de *E. coli* BL21 transformadas em pET28a(+) (A) ou pET32a(+) (B), isoladas e submetidas ou não a IPTG para expressão a 37°C por 3 horas. O extrato foi obtido após sonicação com Tris-Cl 100 mM, seguido de sonicação em ureia 8 M. *Poços 1 a 4*: colônia 1 e de 5 a 8: colônia 2; *poços 1 e 5*: cultura não induzida com IPTG em Tris-Cl 100 mM; poços 2 e 6: cultura não induzida em ureia 8 M; poços 3 e 7: cultura induzida com IPTG em Tris-Cl 100 mM; *poços 4 e 8*: cultura induzida em ureia 8 M. Em *, banda de aproximadamente 45 kDa resultante da expressão e solubilização. NI = cultura não induzida com IPTG; I = cultura induzida com IPTG; Tris = cultura sonicada em tampão Tris-HCl 100 mM; Ureia = cultura sonicada em ureia 8 M. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

Com o objetivo de tentar aumentar a solubilidade de pET32_NcCAP em tampão não-desnaturante, a cultura foi submetida à expressão com 1 mM de IPTG a 18°C por 18 horas, porém a maior parte permaneceu solubilizada apenas em ureia 8 M (figura 51, A, asterisco). O mesmo ocorreu quando a expressão foi realizada, nas mesmas condições de temperatura e tempo de expressão, com indução de 0,25 e 0,5 mM de

IPTG (figura 51, B, asterisco). Portanto, nas condições testadas, não foi possível obter NcCAP recombinante na sua forma solúvel em quantidades significativas.



Figura 51. Testes de solubilidade da proteína associada à ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP) recombinante expressa em pET32a(+). SDS-PAGE corados com Coomassie G-250. Colônia submetida à expressão a 18°C por 18 horas e sonicada com tampão Tris-HCI, seguida de sonicação em ureia 8 M. A) SDS-PAGE 15%. Expressão de NcCAP induzida com 1 mM de IPTG. *Poço 1*: cultura não induzida com IPTG sonicada com Tris-HCI; *poço 2*: cultura induzida com IPTG sonicada com Tris-HCI; *poço 3*: cultura não induzida sonicada com ureia 8 M; *poço 4*: cultura induzida sonicada com ureia 8 M. No *, banda correspondente a NcCAP recombinante. B) Gel de acrilamida 12,5%. Expressão de NcCAP induzida com 0,5 ou 0,25 mM de IPTG. *Poços 1, 3 e 5*: cultura sonicada com Tris-CI 100 mM; *poços 2, 4 e 6*: cultura sonicada com ureia 8M; *poços 1 e 2*: culturas não induzidas; *poço 3 e 4*: culturas induzidas com 0,25 mM de IPTG; *poço 5 e 6*: culturas induzidas com 0,5 mM de IPTG. Em *, banda correspondente a NcCAP recombinante. NI = cultura não induzida com IPTG; I = cultura induzida com IPTG; Tris = cultura sonicada em tampão Tris-HCI 100 mM; Ureia = cultura sonicada em ureia 8 M. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

Para obtenção da proteína recombinante purificada com objetivo de imunização de camundongos e obtenção do anticorpo policional através de soro anti-NcCAP, NcCAP recombinante expressa em pET32a(+) foi solubilizada em ureia 8 M e purificada em resina de Ni⁺² (figura 52, poço 3).



Figura 52. **Purificação em resina de níquel da proteína associada à ciclase de Neospora caninum** (NcCAP) recombinante. Gel de acrilamida 12,5% corado com Coomassie G-250. Proteína NcCAP recombinante expressa em pET32a(+) a 18°C por 18 horas, com 1 mM de IPTG, e purificada a partir de extrato em ureia 8 M. *Poço 1*: extrato total de *E. coli* BL21 em ureia 8 M pH 8,0; *poço 2*: *flow through*. Extrato total após passagem pela resina de níquel; *poço 3*: proteína recombinante purificada eluída em ureia 8 M pH 4,5. Resultado da reunião das alíquotas eluídas. Em #, proteína NcADF recombinante. E.T. = extrato total. F.T. = *flow through*. P = proteína recombinante eluída. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.2.2.1 Identificação de NcCAP recombinante

A banda da proteína NcCAP expressa em pET32a(+) e purificada em resina NTA-Ni foi recortada do gel de acrilamida da figura 52 (poço 3) em triplicata e enviada para identificação por espectrometria de massas. Os resultados de MS/MS foram analisados pelo programa Mascot com buscas no banco de dados NCBI e ToxoDB. Os peptídeos identificados a partir de amostras de NcCAP com buscas em ambos os bancos de dados estão listados na tabela 15. Em duas das amostras das triplicatas (bandas 1 e 2), foi identificado peptídeo correspondente à cauda de histidina conferida pelo plasmídeo pET32a(+). A terceira amostra (banda 3) apresentou como resultado o *hit* de um peptídeo pertencente a proteína associada a ciclase (CAP – acesso em NCBI: gi|401411135) de *N. caninum*, identificada através de busca no banco de dados NCBI. Apesar da da diferença entre o peso molecular predito e a proteína expressa visualizada em SDS-PAGE, a identidade de NcCAP recombinante foi confirmada.

Tabela 15. Peptídeos identificados por espectrometria de massas (MS/MS) das bandas de SDS-PAGE contendo proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP) recombinante. A mesma banda foi dividida e analisada em três amostras diferentes. Em negrito, peptídeos com identificação esperada. Grifados, peptídeos correspondentes à cauda de histidina.

| Banda | | Peptídeo | Busca ToxoDB (Identificação e acesso) | Busca NCBI (Identificação e acesso) | Score |
|---------|---|--------------------------------|---|---|-------|
| NcCAP-r | | M.GSS <u>HHHHHH</u> SSGLVPR.G | - | gi 12248795 (hsp70 – <i>T.</i> <i>gondii</i>) | 85 |
| | 1 | R.QYAEDYER.F | NCLIV_044370 (conserved hypothetical protein – <i>N.</i> <i>caninum</i>) | - | 20 |
| | | M.GSS <u>HHHHHH</u> SSGLVPR.G | - | gi 12248795 (hsp70 – <i>T.</i> <i>gondii</i>) | 98 |
| | 2 | R.GLANAVESR.V | NCLIV_021870 (unspecified product – <i>N.</i> <i>caninum</i>) | | 25 |
| | 3 | K.TDQEDGDWTEVPIPEQF HHHIK.N | - | gi 401411135 (putative adenylyl cyclase associated protein-CAP) | 126 |

4.2.3 Detecção e localização de NcCAP

A proteína recombinante NcCAP, expressa em pET32a(+), foi utilizada em imunizações de camundongos para obtenção de soro contendo anticorpo policional anti-NcCAP. A opção pela forma expressa em pET32a(+), em detrimento da forma expressa em pET28a(+), ocorreu pela maior quantidade de proteína expressa através daquele plasmídeo. O soro anti-NcCAP foi utilizado como união de igual volume de soros de todos os animais imunizados com NcCAP recombinante.

4.2.3.1 Detecção de NcCAP recombinante e endógena

Para caracterização do soro anti-NcCAP e detecção de NcCAP endógena e recombinantes, foram realizados *western blots* a partir de extrato total de *N. caninum* e de NcCAP recombinantes purificadas, respectivamente. Nas condições utilizadas, duas formas das proteínas recombinantes expressas foram detectadas pelo soro anti-NcCAP como bandas de ~35 de pET28_NcCAP (figura 53, A) e ~50 kDa de pET32_NcCAP (figura 53, B). No extrato total de *N. caninum*, o mesmo soro detectou bandas de ~20 e ~25 kDa (figura 53, C). A banda com peso molecular mais próximo

do predito para NcCAP endógena (22,7 kDa sem os 17 aminoácidos N-terminais anotados no banco de dados) é a de ~20 kDa (figura 53, C). O soro anti-NcCAP também foi utilizado em *western blot* a partir de extrato total de células Vero; não sendo detectadas bandas (não mostrado).



Figura 53. Detecção de proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP). *Western blot* utilizando com soro anti-NcCAP e anticorpo secundário 1:10.000. Filme autorradiográfico a partir de transferência de conteúdo de SDS-PAGE para membrana de PVDF. A) SDS-PAGE 12,5%. NcCAP recombinante expressa em pET28a(+). Soro anti-NcADF 1:100.000. B) SDS-PAGE 12,5%. NcCAP recombinante expressa em pET32a(+). Soro anti-NcCAP 1:100.000. C) SDS-PAGE 15%. Extrato total de *N. caninum* em tampão de amostra. Soro anti-NcCAP 1:15.000. Em *, provável altura de NcCAP. Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.2.3.2 Eletroforese 2-D

Para observação do perfil bidimensional e identificação de NcCAP endógena, foi utilizado extrato total de *N. caninum* em SDS-PAGE 2-D. Duas *strips* focalizadas com extrato total de taquizoítas de *N. caninum* foram corridas em paralelo em SDS-PAGE; um dos géis foi corado com Coomassie G-250, enquanto que o outro foi submetido a *western blot*, com uso de soro anti-NcCAP 1:15.000. Como resultado do *western blot*, nove *spots* reagiram com o soro anti-NcCAP: dois de peso molecular de ~37 kDa,

quatro apresentando peso molecular de ~30 kDa e três com ~23 kDa (figura 54, B). Os pls das proteínas representadas por esses *spots* variaram de 4,1 a 7,8, sendo pl de 5,7 a 6,4 nos *spots* com ~23 kDa, 4,1 a 7,8 o pl dos *spots* com peso de ~30 kDa e 5,7 e 5,9 o pl dos *spots* com ~37 kDa. O pl foi calculado com base no gráfico da figura 32C. O pl predito para NcCAP é 7,5.

Os *spots* identificados pelo soro anti-NcCAP por *western blot* foram localizados no gel corado, conforme mostrado na figura 54A.



Figura 54. Detecção de proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP) endógena por padrão bidimensional. SDS-PAGE 12,5% e *strip* 3-11 não linear (NL) de 7 cm. Extrato total de *N. caninum* e tampão de amostra contendo >5 x 10⁷ taquizoítas foi submetido à SDS-PAGE. A) SDS-PAGE 2-D. Gel corado com Coomassie G-250. B) *Western blot.* Filme autorradiográfico. Imunolocalização com soro anti-NcCAP 1:15.000 e anticorpo secundário anti-camundongo 1:10.000. Nas setas, os *spots* identificados por *western blot.* Peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.2.3.2.1 Identificação dos spots

Todos os *spots* detectados pelo soro anti-NcCAP em *western blot* foram colocalizados em SDS-PAGE 2-D (figura 54, A), excisados e submetidos a espectrometria de massas. Os resultados de MS/MS foram buscados no programa Mascot em bancos de dados ToxoDB e NCBI. Todavia, não foram encontradas identificações para os *spots* analisados.

4.2.3.3 Imunolocalização de NcCAP

Para localização de NcCAP endógena, foi realizada imunofluorescência em taquizoítas de *N. caninum* recém-purificados. A marcação com anti-NcCAP pôde ser observada em dois padrões: de maneira difusa no citoplasma (figura 55, A, setas amarelas) ou mais evidente na região periférica da célula (figura 55, A e B, setas brancas).



A)



B)



* Dilução de anti-NcCAP 1:100 ** Diluição de anti-NcCAP 1:200

Figura 55. Imunolocalização da proteína associada a ciclase de *Neospora caninum* (NcCAP) em taquizoítas de *N. caninum*. Microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* purificados, imobilizados e marcados com soro anti-NcCAP. A) Marcação com soro anti-NcCAP diluído 1:100, visualizada com Alexa Fluor 488 e o núcleo, com iodeto de propídeo (IP). B) marcação com soro anti-NcCAP diluído 1:200. Imagens de campo claro, marcação com iodeto de propídeo, marcação de anti-NcCAP visualizada com Alexa-Fluor 488 e sobreposição de imagens fluorescente e sobreposição completa. Escala indicando 5 µm. Setas brancas indicando marcação periférica. Setas amarelas indicando acentuada marcação periférica.

4.3 Caracterização do soro anti- NcAct201-310

O soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ consiste na tentativa de obtenção de um soro capaz de reconhecer actina endógena de *N. caninum*. NcAct₂₀₁₋₃₁₀ é um fragmento recombinante de actina de *N. caninum* que compreende os aminoácidos de posição 201 a 310 dessa proteína. Esse fragmento foi expresso e o processo está descrito na Dissertação de Mestrado (BARONI, 2012).

Após imunização dos camundongos, os soros obtidos a partir de exsanguinação desses animais foram utilizados em *western blot*, onde não foi possível reconhecer actina endógena de *N. caninum* em extrato total deste organismo utilizando duas diluições do soro (figura 56, A, poços 1 e 2). Entretanto, as duas bandas referentes a actina (BARONI, 2012) foram reconhecidas a partir do mesmo extrato em controle positivo utilizando anticorpo comercial anti- β -actina C4 (figura 56, A, poço 3, na seta). O mesmo aconteceu em extrato de células Vero: actina não foi reconhecida pelo soro em duas diluições (figura 56, B, poços 1 e 2), entretanto o anticorpo anti- β -actina C4 reconheceu actina endógena de célula Vero (figura 56, B, poço 3, na seta).





Figura 56. **Detecção de actina endógena em extrato total de Neospora caninum.** Filme autorradiográfico. *Western blot* de antígenos de extrato total de *N. caninum* ou de células Vero em reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ ou anticorpo comercial anti- β -actina C4. **A)** Extrato total de *N. caninum. Poço 1*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 2*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:2.000. Na seta, bandas referentes a actina, detectadas com anticorpo anti- β -actina C4. **B)** Extrato total de células Vero. *Poço 1*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 2*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 2*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 3*: reação com anticorpo anti- β -actina C4. **B)** Extrato total de células Vero. *Poço 1*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 2*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 3*: reação com anticorpo anti- β -actina C4. **B)** Extrato total de células Vero. *Poço 1*: reação com anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 2*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 3*: reação com anticorpo anti- β -actina C4 diluído 1:2.000. Na seta, banda referente a actina, marcada com anticorpo comercial anti- β -actina C4. E.T.= Extrato total. À esquerda, marcador de peso molecular em kDa.

Para avaliar a soroconversão dos animais após imunização com proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀, foi realizado ELISA a partir de extrato total de *N. caninum* ou proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀ como antígenos imobilizados na placa. Quando analisados os resultados obtidos a partir da imobilização de proteínas do extrato total, obtido em tampão desnaturante, foi possível observar que o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ não reconheceu proteínas endógenas de *N. caninum* nas diluições testadas (1:100, 1:250, 1:500 ou 1:1.000). Entretanto, o soro anti-extrato total reconheceu proteínas desse parasita, sendo a reação inversamente proporcional à diluição do soro (figura 57, A e B). Por outro lado, ao checar se os animais haviam soroconvertido em relação à proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀, foi observada uma forte reação do soro anti-

NcAct₂₀₁₋₃₁₀, enquanto que o soro anti-extrato total não reagiu com a proteína imobilizada (figura 57, C e D).

Em ambos os antígenos imobilizados (proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀ ou extrato total de *N. caninum*), foram testadas duas concentrações de anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase. Nas duas concentrações foi possível observar reação, sendo, portanto, a menor diluição suficientemente sensível para o ensaio (figura 57).

A partir dos resultados, foi possível perceber que apesar de não ter havido reação do soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ com a proteína endógena em condições desnaturantes (no extrato total de *N. caninum*; figura 57, A e B) houve a soroconversão dos animais imunizados com a proteína recombinante, uma vez que o mesmo soro reagiu com a proteína recombinante imunizada (figura 57, C e D).



Figura 57. Avaliação de soroconversão de animais imunizados com a proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀. Utilizados 50 ng/poço de extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante (A e B) ou 5 ng/poço de proteína recombinante (C e D), submetidos a concentrações crescentes dos soros (1:1000, 1:500, 1:250 ou 1:100) dos animais imunizados. Soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀: soro proveniente de animais imunizados com a proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀. Soro anti-*N. caninum*: proveniente de animais imunizados com taquizoítas de *N. caninum*. Soro anti-ureia: proveniente de animais imunizados com taquizoítas de *N. caninum*. Soro anti-ureia: proveniente de animais imunizados com solução ureia 8M. A) e C) Anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1:10000. Asterisco (*) indica p<0,05 em relação ao soro anti-ureia.

4.3.1 Reconhecimento de actina desnaturada ou nativa por anti-NcAct201-310

Com o objetivo de verificar a capacidade do soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ em reconhecer actina endógena de *N. caninum* em formas nativa ou desnaturada, foi realizado ELISA onde foram imobilizados taquizoítas de *N. caninum* ou células Vero íntegros, além de extratos dessas mesmas células em tampão desnaturante.

Ao observar os resultados, foi possível notar que houve uma afinidade maior do soro pelas proteínas de células íntegras (Nc nativo ou Vero nativo), quando comparada a proteínas provenientes de extrato desnaturante (Nc ureia ou Vero ureia) (figura 58). De maneira geral, tanto nas amostras tratadas com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀, quanto com controles, a diferença de absorbância entre resultados de análise de proteínas de células íntegras e proteínas do extrato desnaturantes foram significativas (p<0,05), com exceção da diferença entre amostras Vero nativo e Vero ureia tratadas com anticorpo anti-β-actina C4. Além disso, foi possível concluir que o soro não reagiu especificamente com NcAct, reconhecendo também actina de células Vero (figura 58).

Essa diferença no valor das absorbâncias poderia ter sido motivada pela maior afinidade do anticorpo secundário pelas células do que pelas proteínas do extrato, uma vez que a diferença de valores de absorbância entre as proteínas imobilizadas a partir de extrato desnaturante ou células íntegras também apareceu quando utilizado somente o anticorpo secundário, sem o tratamento prévio com soro, foi feito (figura 58, secundário). Entretanto, quando descontados os valores do controle tratado somente com anticorpo secundário, as diferenças na absorbância entre proteínas do extrato e células inteiras (tanto *N. caninum*, quanto células Vero) ainda é significativo (p<0,05) em anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500 e nos controles negativo e positivo.

No controle utilizando anticorpo anti-β-actina C4, após descontar os valores de absorbância do controle somente com anticorpo secundário, as análises passaram a ser não significativas (não mostrado). Isso poderia indicar que a concentração utilizada desse soro, mesmo sendo suficiente para detecção de actina por *western blot* (BARONI, 2012), não é suficiente para detecção de actina em ELISA.



Figura 58. Avaliação de afinidade por actina endógena de *Neospora caninum* nativa ou desnaturada por soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀. ELISA onde foram utilizados extratos totais de *N. caninum* ou células Vero em tampão desnaturante e taquizoítas de *N. caninum* ou células Vero íntegros imobilizadas nos poços, submetidos a crescentes concentrações de soros anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ (1:500, 1:1000 ou 1:2000), soro anti-*N. caninum* (controle positivo) ou anticorpo anti- β -actina C4. Assim como anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1:10000. Nc ureia = extrato total de *N. caninum* em ureia 8 M; Vero ureia = extrato total de células Vero em ureia 8 M; Nc nativo = taquizoítas de *N. caninum* íntegros; Vero nativo = células Vero íntegras. Anti-NcAct 1:500 ou anti-NcAct 1:1000 ou anti-NcAct 1:1000 ou anti-NcAct 1:2000 = soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ em diluições 1:500, 1:1000 ou 1:2000, respectivamente; anti-*N. caninum* diluído 1:500; C4 1:2000 = anticorpo anti- β -actina C4 diluído 1:2000; secundário = ausência de anticorpo primário. Asterisco (*) indica p<0,05 entre Nc ureia e Nc nativo. 1,4 e 1,8 referem-se aos valores de absorbância que se encontram fora da escala do eixo y.

Com o objetivo de avaliar a capacidade de anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ de reconhecer actina endógena em sua forma nativa, foi realizado *western blot* a partir de PAGE nativo. Para isso, o extrato total de *N. caninum* em tampão não-desnaturante foi submetido a eletroforese em dois géis nativos; um deles teve seu conteúdo transferido para membrana de PVDF, que foi utilizada em *western blot*, enquanto que o outro gel foi corado com Coomassie-G-250.

A partir do *western blot* foi possível observar que o sinal obtido, tanto com o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ quanto com o anticorpo anti-β-actina C4 (figura 59, A, poços 1 a 5, seta), encontra-se na região inicial da corrida (figura 59, A, poços 1 a 5, traço). Em paralelo, ao analisar o gel corado, observou-se uma grande quantidade de proteína acumulada no início do gel (figura 59, B, seta). Entretanto, apesar de actina não ter

sido separada no gel nativo, ela foi detectada pelo soro controle, com capacidade conhecida de reconhecer actina de *N. caninum* (BARONI, 2012), no aglomerado proteico formado no início da corrida. Na mesma região, o soro analisado foi capaz de fazer o reconhecimento de proteínas de maneira dependente da diluição (figura 59, A, poços 1 a 4, seta). Mas o experimento demonstrou que o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi capaz de reconhecer proteínas em condições não-desnaturantes.



Figura 59. Detecção de actina endógena de *Neospora caninum* (NcAct) em condições nativas. *Western blot* de antígenos de extrato total de *N. caninum* em tampão não desnaturante em reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ ou anticorpo comercial anti- β -actina e gel de acrilamida corado. A) Filme autorradiográfico a partir de transferência de conteúdo de gel de acrilamida 10% nativo para membrana de PVDF. *Poço 1*: reação com soro anti- NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500; *poço 2*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:1000; *poço 3*: reação com soro anti- NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:2000; *poço 4*: reação com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:2000; *poço 5*: reação com anticorpo anti- β -actina C4 diluído 1:2000. Na seta, altura do sinal obtido. Traço negro indica início da corrida. B) Gel de acrilamida 10% não desnaturante corado com Coomassie G-250. Eletroforese em gel de acrilamida realizada em paralelo ao gel utilizado no *western blot*, contendo o mesmo extrato. Na seta, grande quantidade de proteína acumulada no início do gel. E.T. = extrato total de *N. caninum*.

Em complementação ao ELISA, foi realizado um *dot blot* com o objetivo de verificar e comparar a capacidade do soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ em reconhecer actina em condições nativas ou de desnaturação. O *dot blot* aqui descrito foi realizado tanto em membrana de PVDF, quanto em nitrocelulose, com finalidade também de comparação da eficiência de ambas as membranas para sua utilização nessa técnica.

Nas duas membranas, foram aplicadas gotas com o mesmo volume de extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante e o mesmo volume em tampão não-

desnaturante. Ao comparar os resultados, foi possível observar que o sinal obtido após revelação do filme autorradiográfico foi mais robusto a partir da membrana de nitrocelulose, não sendo possível apontar visualmente uma diferença efetiva de sinal quando comparadas as diferentes concentrações de soro às quais as gotas de mesmo tipo de tampão foram submetidas (figura 60, A). Quando comparadas as gotas provenientes dos diferentes extratos, também não foi possível apontar uma grande diferença visual no sinal (figura 60, A), mostrando que, nas condições utilizadas, o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ pôde reconhecer as proteínas tanto do extrato total em tampão desnaturante, quanto não-desnaturante.

Em membrana de PVDF, observou-se um decaimento do sinal proporcional à diluição do soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀, mais evidente no extrato total em tampão desnaturante do que no não-desnaturante (figura 60, B). O controle com anticorpo anti-β-actina C4 mostrou um sinal fraco em extrato e tampão não desnaturante e sem sinal detectado em tampão desnaturante (figura 60, B). A partir da membrana de PVDF, também foi possível o reconhecimento de proteínas desnaturadas de não-desnaturadas, com sinais mais fortes em gotas submetidas às maiores concentrações de soro (figura 60, B; 1:500 e 1:1000), quando comparado com membrana de nitrocelulose.



Figura 60. **Detecção de actina endógena em extrato total de** *Neospora caninum.* Dot blot de antígenos de extrato total de *N. caninum* (E.T.) em tampão desnaturante ou não-desnaturante revelado com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ ou anticorpo anti- β -actina C4; anticorpo secundário diluído 1:10000. Filme autorradiográfico obtido a partir da revelação de membrana de nitrocelulose ou PVDF. **A)** Membrana nitrocelulose com extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante ou não desnaturante. Soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500, 1:1000, 1:2000 ou 1:4000 e anticorpo anti- β -actina C4 diluído 1:2000. **B)** Membrana PVDF com extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante ou não desnaturante. Soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:500, 1:1000, 1:2000 ou 1:4000 e anticorpo anti anti- β -actina C4 diluído 1:2000. E.T. não desnaturante = extrato total de *N. caninum* em tampão não desnaturante. E.T. desnaturante = extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante.

4.3.1.1 Imunolocalização

Para localização de actina de *N. caninum* pelo soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ em taquizoíta de *N. caninum*, foi realizada imunofluorescência por microscopia confocal. A figura 61 (em A e B) mostra dois campos fotografados com marcação de soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀. Foi possível observar o campo claro, a visualização de Alexa-Fluor 488 e a sobreposição de ambos. A amostra também foi marcada com iodeto de propídeo, para visualização do núcleo, entretanto não foi possível observar emissão de luz proveniente dessa marcação a partir da absorção do comprimento de onda apropriado.

Alguns taquizoítas apresentavam marcação citoplasmática difusa e alguns com a região nuclear marcada ou não (figura 61, A e B, setas amarelas), enquanto que

outros apresentavam uma marcação na região periférica e na região, possivelmente, nuclear (figura 61, A e B, setas brancas).

A) Campo claro Anti-NcAct201-310/Alexa 488 Sobreposição Sobreposiç

B)



Figura 61. Imunolocalização de actina de *Neospora caninum* (NcAct) em taquizoítas de *N. caninum*. Microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* recém purificados, imobilizados e marcados com soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ diluído 1:5000. A marcação foi visualizada com Alexa Fluor 488. A) e B) Imagens de campo claro, marcação de anti-NcAct₂₀₁₋₃₀₁ visualizada com Alexa-Fluor 488 e sobreposição de imagens. Campos diferentes de um mesmo poço. Escala indicando 5 μm. Nas setas brancas, taquizoítas com marcação indicativa de núcleo e região periférica. Nas setas amarelas, taquizoítas com marcação na região citoplasmática.



5. DISCUSSÃO

5.1 Fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF)

Neste trabalho, fator de despolimerização de actina de Neospora caninum (NcADF) foi submetida a caracterização in silico, molecular e bioquímica. Fator de despolimerização de actina (ADF) é uma proteína pertencente à família das ADF/cofilinas, que são proteínas que se ligam a actina (ABPs) ubiquamente encontradas em eucariotos (LAPPALAINEN et al., 1998). Desse modo, apesar da identidade de 89% entre NcADF e TgADF e a proximidade evolutiva entre T. gondii e N. caninum (ambos são Coccídios), as conclusões obtidas a partir da caracterização de TgADF não deveriam ser imediatamente extrapoladas para NcADF antes de uma avaliação desta proteína. N. caninum e T. gondii apresentam divergências e talvez a mais óbvia seja a preferência de ambos por diferentes hospedeiros definitivos e intermediários. Recentemente, foi mostrado que N. caninum tem uma menor capacidade de multiplicação do que T. gondii em altas temperaturas, representando a dificuldade de isolamento de N. caninum de aves (REZENDE-GONDIM et al., 2017). Diferenças morfológicas entre ambos também foram observadas em ultraestruturas de taquizoítas, bradizoítas e cistos teciduais (SPEER et al., 1999). Outra discrepância entre os dois parasitas foram observadas em nosso laboratório como padrões distintos de detecção de actinas por anticorpo anti-β-actina C4, sendo detectadas, por western blot, duas bandas de actina em N. caninum (BARONI, 2012), enquanto que apenas uma é detectada em T. gondii (WHITELAW et al., 2017). A caracterização de ADF também em N. caninum permitiu avaliar a conservação das características e funções dessas proteínas ao longo do filo Apicomplexa. Além disso, ADF/cofilinas são proteínas que contribuem para a dinâmica de actina, descrita como central para o processo de invasão de parasitas apicomplexas (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; DREWRY; SIBLEY, 2015), assim como por outras funções nesses organismos (PERIZ et al., 2016).

A caracterização de NcADF foi possível após a seleção, por buscas em ToxoDB, de um gene, de acesso NCLIV_012510. Esse acesso havia sido identificado em nosso laboratório em extrato secretado (ESA) de *N. caninum* (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013). Apesar da denominação "proteína hipotética" no banco de dados, a indicação de homologia com proteínas da família ADF/cofilina de outros organismos era um indicativo da identidade da proteína codificada por esse gene. Análises *in silico*

permitiram confirmar a identidade dessa proteína pela identificação do domínio ADF-H, característico de ADF/cofilinas (POUKKULA et al., 2011), na estrutura dessa "proteína hipotética". A proteína de acesso NCLIV_012510 também apresentou somente um domínio ADF-H, indicação de que a "proteína hipotética" é, na verdade, um ADF.

Para confirmação da identidade da proteína de acesso NCLIV_012510 e avaliação da identidade e similaridade dessa proteína com ADF/cofilinas, ela foi também alinhada a ADF/cofilinas de várias espécies. A partir do alinhamento múltiplo, NCLIV_012510 apresentou alta identidade (89%) com TgADF e relativamente baixa identidade com ADF/cofilinas de outras espécies; em torno de 30% (tabela 3). É importante observar que esse valor de identidade de NcADF e TgADF foi obtido a partir de alinhamento com sequência de mesmo acesso utilizado nos trabalhos de caracterização in silico de TgADF (AAC47717; ALLEN et al., 1997; MEHTA; SIBLEY, 2010). O alinhamento feito para análise das seguências utilizadas na modelagem molecular de NcADF utilizou a sequência proteica de TgADF obtida a partir do acesso PDB 2L72 (YADAV et al., 2011). Ambos os acessos foram obtidos a partir da linhagem de T. gondii RH, porém apresentam divergência entre si em aminoácidos de posição 82 e 85, o que explica as diferenças de valores de identidade/similaridade entre TgADF e NcADF observado nos dois alinhamentos aqui realizados. As proteínas analisadas neste trabalho apresentam identidade de 30% entre si, aproximadamente, com exceção de NcADF e TgADF, assim como ADF de Homo sapiens e destrina de Bos taurus. Apesar de não apresentarem identidades altas, as ADF/cofilinas compartilham uma estrutura terciária conservada do domínio ADF-H, com regiões de importância para interação com outras proteínas como actina-G e actina-F (HILD et al., 2014; POUKKULA et al., 2011). Sítios de ligação com actina localizado na região N-terminal, caracterizados por mutação pontual em cofilina de Saccharomyces cerevisiae (figura 12; LAPPALAINEN et al., 1997), permanecem conservados na "proteína hipotética". Em especial, a SER3 (correspondente a serina 3 em ADF/cofilinas de organismos apicomplexas, humanos e boi; serina 4 em S. cerevisiae e Schizosaccharomyces pombe; serina 2 em Acanthamoeba castelanii; serina 6 em Arabidopsis thaliana) está presente na proteína aqui caracterizada. Esse resíduo é conhecido pela atividade de fosforilação de ADF/cofilinas (AGNEW et al., 1995) em Xenopus (TANAKA et al., 2005), humanos (MEBERG et al., 1998), plantas (ALLWOOD et al., 2001) e A. castelanii (BLANCHOIN et al., 2000). A fosforilação de ADF/cofilina em SER3 mostrou-se um importante fator regulatório que impede a ligação da proteína com actina-G e actina-F (BERNSTEIN; BAMBURG, 2010). Em *T. gondii*, a substituição de SER3 por GLU3 resultou em completa perda de atividade de ADF, indicando que esse sítio regulatório permanece ativo em ADF de organismos apicomplexas (MEHTA; SIBLEY, 2010).

Apesar da presença do sítio N-terminal na "proteína hipotética", o sítio Cterminal, responsável pela interação com actina-F (LAPPALAINEN et al., 1997), está ausente em ADF de organismos apicomplexas e a proteína aqui analisada, com exceção de PfADF2. Em um experimento de mutagênese *in vitro*, Mehta e Sibley (2010) adicionaram o sítio de ligação a actina-F C-terminal de cofilina de *S. pombe* em TgADF. Isso resultou em aumento de duas vezes na quantidade TgADF mutado sedimentado com actina-F (apenas relatado e não mostrado no trabalho) e diminuição do desmonte de filamentos. Esta observação sugere a importância do sítio C-terminal na interação com actina-F.

Uma análise mais detalhada dos sítios de interação com actina preditos em *S. cerevisiae* (GUAN et al., 2002; LAPPALAINEN et al., 1997) mostra que, em acordo com Mehta e Sibley (2010), os sítios de interação com actina-G permanecem, de maneira geral, conservados em ADF de apicomplexas, enquanto que aqueles preditos para interação com actina-F estão ausentes.

A sequência primária predita de NcADF foi utilizada para construção de sua estrutura terciária por modelagem molecular baseada em homologia com outras ADF/cofilinas. Esta representa uma ferramenta eficaz para a predição da estrutura terciária de proteínas pertencentes a famílias, e foi utilizada anteriormente para predição de ADF de *E. tenella* (XU et al., 2008), *T. gondii* (MEHTA; SIBLEY, 2010; SINGH et al., 2011) e *Plasmodium* (SINGH et al., 2011). Para a predição estrutural, foram utilizadas duas metodologias: a predição de *folding* de NcADF por molde único e por múltiplos moldes. A estrutura predita através de múltiplos moldes mostrou-se a mais energeticamente estável e foi submetida a refinamento, tornando-se favorável do ponto de vista das análises de validação energética. A sequência terciária de NcADF manteve-se estruturalmente similar a todos os moldes com valores relativamente pequenos de RMSD (figura 62). Como esperado, a estrutura terciária de NcADF foi mais similar a TgADF, com RMSD de 1,309 Å (figura 62), em consonância com a maior similaridade apresentada entre suas sequências primárias.

A partir do alinhamento estrutural, foi possível observar de maneira específica e direta o F-*loop* mais pronunciado em AcActoforina e AtADF1 (figura 62, A e B) e ausente nos ADF de apicomplexas utilizadas na modelagem (figura 62, B e C), assim como em NcADF. O F-*loop* foi caracterizado em ADF/cofilinas como uma região exclusiva de ligação com actina-F (LAPPALAINEN et al., 1997; POPE et al., 2000) e sua ausência em ADF de apicomplexas foi relacionada a consequências funcionais dessa proteína (MEHTA; SIBLEY, 2010; SCHÜLER et al., 2005a).





Figura 62. Alinhamento estrutural entre estruturas-molde de ADF/cofilinas e estrutura terciária predita de fator de despolimerização de actina de *Neospora caninum* (NcADF). As estruturas utilizadas como molde para construção de estrutura terciária de NcADF por modelagem molecular baseada em homologia foram alinhadas com NcADF (magenta) e os valores de RMSD foram calculados através do *software* Pymol. A) NcADF alinhada a actoforina de *Acanathamoeba castelanii* (acesso PDB 1AHQ; azul escuro). B) NcADF alinhada a ADF1 de *Arabdopsis thaliana* (acesso 1F7S; amarelo). C) NcADF alinhada a ADF de *Toxoplasma gondii* (acesso 2L72; azul claro). D) NcADF alinhada a ADF1 de *Plasmodium falciparum* (acesso 3Q2B; verde). As regiões C-terminal e N-terminal estão identificadas nas figuras, assim como os respectivos valores de RMSD. F-*loop* de AcActoforina e AtADF1 mostrado em A e B.

O soro policional obtido foi utilizado para detecção das proteínas recombinantes e endógena a partir de técnicas de ELISA, western blot 1-D e 2-D e imunofluorescência por microscopia confocal. O soro anti-NcADF gerado foi capaz de reconhecer ambas as formas de NcADF recombinante (expressa em pET28a(+) e pET32a(+)). Ademais, apesar do soro ter sido gerado a partir de pET32_NcADF desnaturada, este mostrou-se específico para detecção de pET28_NcADF nativa de maneira significativa, quando comparado com o soro controle anti-NcCAP, também gerado a partir de proteína recombinante desnaturada expressa em pET32a(+) (item 4.2). Apesar da não total especificidade encontrada para a detecção de NcADF - pois ambos os soros testados apresentaram reação cruzada, em algum nível, com ambas as proteínas recombinantes expressas neste trabalho – nenhum ensaio precisou ser realizado utilizando as proteínas recombinantes NcADF e NcCAP ao mesmo tempo. A especificidade de anti-NcADF foi suficiente, em ensaios funcionais utilizando proteínas purificadas, para a detecção específica de NcADF e não de actina de coelho. Foi levantada a hipótese de que as reações cruzadas observadas para detecção das proteínas recombinantes pelos soros gerados neste trabalho (anti-NcADF e anti-NcCAP) ocorreu pela presença de anticorpos capazes de reconhecer a cauda 6X histidina expressa pelos plasmídeos utilizados para expressão. Para evitar essa nãoespecificidade, os soros poderiam ter sido devidamente purificados contra proteínas recombinantes sem cauda de histidina. Porém, o pequeno volume de soro obtido após exsanguinação de camundongos inviabilizaria esse procedimento, pela possibilidade de perdas de amostra. Assim, foi feita a opção pela continuidade do uso do soro nãopurificado.

O soro anti-NcADF foi utilizado também para detecção de NcADF endógena a partir de extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Em *western blot* 1-D e 2-D foram encontrados padrões semelhantes, com pequena divergência nas bandas e *spots* de maior peso molecular. Porém uma proteína de peso molecular de aproximadamente 15 kDa foi detectada em ambas as técnicas. Essa proteína apresenta peso molecular próximo ao predito (12,9 kDa) e pl de 6, também próximo ao esperado de 6,9. Os *spots* provenientes de SDS-PAGE 2-D foram analisados por espectrometria de massas e aquele de menor peso molecular (~15 kDa) foi identificado como NcADF, confirmando a detecção de NcADF endógena por soro anti-NcADF. A detecção de TgADF por soro gerado em coelho em extrato de taquizoítas de *T. gondii* revelou banda correspondente ao peso molecular esperado (ALLEN et al., 1997) e uma

DISCUSSÃO

análise geral do proteoma de *T. gondii* detectou dois *spots* com pl pouco menores do que 7 como correspondentes a ADF (XIA et al., 2008).

A localização de NcADF em taquizoítas extracelulares a partir do soro anti-NcADF mostrou um padrão similar ao encontrado na imunolocalização de TgADF usando anti-TgADF produzido em coelho e purificado (ALLEN et al., 1997). Ambas as proteínas foram localizadas de maneira difusa no citoplasma, com sinal menos intenso nos polos dos taquizoítas.

Outra ferramenta para caracterização de NcADF foi a produção da proteína recombinante solúvel. Entretanto, para obtenção de uma proteína recombinante pura o suficiente para ser utilizada em ensaios bioquímicos em presença de actina de coelho, a purificação de NcADF expressa em pET28a(+) precisou ser otimizada. Para purificação nativa, a forma recombinante de NcADF expressa em pET28a(+) foi escolhida, uma vez que a região complementar codificada por pET28a(+) é menor que em pET32a(+); este plasmídeo expressa, além da cauda de 6X histidina, uma região de ~15 kDa, que corresponde a cauda de tioredoxina (Trx-Tag) N-terminal. Essa grande cauda expressa por pET32a(+) poderia, portanto, causar interferências não desejadas nos ensaios funcionais. A otimização de expressão solúvel de pET28 NcADF exigiu maior tempo e dedicação do que inicialmente planejado para obtenção de uma proteína de quantidade, qualidade e pureza aceitáveis para a realização dos ensaios de caracterização bioquímica e funcional. Desse modo, todas as etapas foram otimizadas, como: temperatura de expressão, meio de cultura, tampão compatível para solubilização de quantidade e qualidade suficientes de NcADF recombinante e condições de purificação que permitissem a obtenção completamente solúvel da proteína purificada, sem precipitação (para revisão de abordagens de otimização de expressão, ver PAPANEOPHYTOU; KONROPIDIS, 2014). NcADF pET28 solúvel associada a cauda 6X histidina foi utilizada com sucesso em ensaios bioquímicos para caracterização da função dessa proteína na dinâmica de actina, realizados na Universidade de Edimburgo, sob supervisão do Dr. Sutherland K. Maciver. A utilização de ADF/cofilinas recombinantes associadas a cauda de histidina em ensaios bioquímicos é frequente (ALLEN et al., 1997; DAI et al., 2013; MEHTA; SIBLEY, 2010; OUELLET et al., 2008; TAMMANA et al., 2008) e, aparentemente, essa cauda não interferiu na função de ADF recombinante nesses ensaios.

ADF/cofilinas são conhecidas pela sua função de regulação de actina (HILD et al., 2014). Para os ensaios bioquímicos, o papel de NcADF recombinante foi avaliado na dinâmica de actina liofilizada de coelho. A caracterização de NcADF utilizando também actina de *N. caninum* seria ideal para uma avaliação mais sistemática da proteína aqui estudada, uma vez que actina de organismos apicomplexas apresentam características não convencionais, quando comparada com outros organismos (SCHÜLER et al., 2005b; PERIZ et al., 2016; SKILLMAN et al., 2013; VAHOKOSKI et al., 2014). Contudo, a caraterização em sistema homólogo não foi aqui realizada pelo baixo rendimento para ensaios que demandam grande quantidade. O uso de actina proveniente de musculo esquelético de coelho tornou-se padrão para a caracterização de ADF/cofilinas em geral e o seu emprego para caracterização de NcADF permite uma avaliação comparativa mais eficiente entre diferentes proteínas dessa família.

Os ensaios bioquímicos mostraram que NcADF é capaz de atuar no desmonte de actina de coelho por três processos: despolimerização, sequestro de monômeros e quebra de filamentos.

5.1.1 Despolimerização

ADF/cofilinas são conhecidas por causar quebra de filamentos e/ou despolimerização, ou seja, aumento da taxa de desacoplamento de monômeros pela extremidade "menos" do filamento (CARLIER et al., 1997; HILD et al., 2014). A capacidade de despolimerização de filamentos foi avaliada pelo ensaio de cinética de despolimerização e mostrou que tanto em condições favoráveis (concentração de actina abaixo da concentração crítica e baixas concentrações de sais), quanto em condições desfavoráveis à despolimerização (concentração mais alta de actina e alta concentração de sais), NcADF foi capaz de aumentar a constante de velocidade. Esses resultados confirmam que NcADF tem capacidade de despolimerização de filamentos de actina.

Quando o experimento foi conduzido com 1 µM de actina e altas concentrações de sais, foi possível observar que, quando presente, NcADF causou uma redução inicial brusca da fluorescência de PI-actina, esse efeito foi mais intenso em concentração de 10 µM. Essa redução havia sido observada em actoforina (MACIVER et al., 1998), cofilina de levedura (MOSELEY et al., 2006) e ADF1 de *A. thaliana* (CARLIER et al., 1997) e sua causa foi atribuída, mesmo sem maiores investigações,

DISCUSSÃO

à ligação de ADF/cofilina a filamentos de actina (MACIVER et al., 1998; MOSELEY et al., 2006). Como a atuação de ADF de organismos apicomplexas diretamente na despolimerização de actina ainda não havia sido investigada, não foram encontrados relatos desse efeito causado por ADF desses parasitas. Visando reduzir esse efeito de redução inicial brusca de fluorescência, o experimento foi repetido, porém, com concentração de actina abaixo da concentração crítica (0,1 µM) e com baixas concentrações de sais. Essa mudança de condições inibiu o referido efeito.

Mesmo com o efeito de redução inicial da fluorescência, a presença de NcADF em concentrações maiores que 2,5 µM e em condições de estabilização ou 0,1 µM em condições de despolimerização aumentou a constante de velocidade (kobs). Essa constante é função da queda exponencial da fluorescência com o passar do tempo e o aumento de kobs indicou favorecimento de despolimerização de actina em presença de NcADF de maneira dependente da concentração. Não foi possível estabelecer, a partir desses experimentos, se o aumento de kobs aconteceu por desacoplamento de monômeros da extremidade "menos" dos filamentos de actina ou em função de quebra dos filamentos; apesar de evidências de quebra serem observadas em outros ensaios (ver adiante). É provável que seja uma combinação dos dois fenômenos. Entretanto, é possível estabelecer que a despolimerização, nessas observações, não ocorreu por sequestro de monômeros. Moseley et al. (2006) mostraram que, em presença de latrunculina, substância que sequestra monômeros de actina, a despolimerização foi similar ao controle contendo somente actina, indicando que o efeito de queda exponencial da fluorescência observado naquela ocasião foi decorrente de despolimerização ou de quebra de filamentos.

5.1.2 Sequestro de monômeros

Quatro mecanismos são conhecidos por regularem a atividade de ADF/cofilinas. Fosforilação (AGNEW et al., 1995; BLANCHOIN et al., 2000), oxidação (KLAMT et al., 2009; KLEMKE et al., 2008), ligação a fosfoinositídeos (PIP₂; ZHAO et al., 2010) e alteração de pH (BERNSTEIN et al., 2000; HAWKINS et al., 1993). Aqui, foi mostrada a independência de pH na capacidade de NcADF de desmonte de filamentos e associação dependente de pH com actina-F pelo ensaio de cossedimentação. A não dependência de pH para o desmonte de filamentos era, de alguma forma, esperada, pois a sensibilidade ao pH é mais pronunciada em vertebrados superiores (HILD et
DISCUSSÃO

al., 2014). Apesar da pequena quantidade de NcADF quantificado no pellet em pH mais baixo, NcADF foi capaz de associar-se fracamente com actina-F; porém, esta associação com F-actina não foi determinante para o desmonte dos filamentos. Esse comportamento sugere outro mecanismo necessário para o desmonte, que não necessariamente a associação direta entre actina-F e ADF, levando à quebra de filamentos. É provável que os monômeros de actina estejam sendo sequestrado por NcADF, causando despolimerização por desacoplamento de monômeros pela extremidade menos. Essa atividade é conhecida em ADF/cofilinas de apicomplexas (MEHTA; SIBLEY, 2010; SCHÜLER et al., 2005a), e de alguns outros eucariotos (CHEN et al., 2004). Além da possiblidade de sequestro de monômeros observada no ensaio de cossedimentação, através da avaliação da cinética de actina também foi possível notar essa característica em NcADF. Quando a cinética de actina foi avaliada em presença 10 µM de NcADF houve diminuição da taxa de polimerização de actina (figura 38, E). Compostos e proteínas responsáveis pelo sequestro de monômeros de actina apresentam essa característica quando avaliadas durante a polimerização de actina como twinfilinas de Drosophila, camundongo e levedura (HELFER et al., 2006), timosinas β10 e β4 de mamíferos (YU et al., 1993) e latrunculina A (COUÉ et al., 1987).

Quando NcADF esteve presente em concentrações mais baixas, na avaliação de cinética de actina, a taxa de polimerização de actina aumentou com relação à reação controle contendo somente actina. Esse comportamento de ADF/cofilinas é atribuído, normalmente, à quebra de filamentos, o que gera mais extremidades aptas polimerização (ICHETOVKIN disponíveis para et al., 2002). Porém. е Andrianantoandro e Pollard (2006) mostraram que o aumento na taxa de polimerização por ADF/cofilinas poderia ser causado por promoção da nucleação dos filamentos por essas proteínas, quando presentes em altas concentrações. Essa hipótese seria compatível com o comportamento de NcADF e TgADF (MEHTA; SIBLEY, 2010) nessas condições. Embora o aumento da taxa de polimerização de actina de coelho seja detectado em concentrações mais baixas de NcADF e TgADF, quando o ensaio de cinética de polimerização foi realizado com TgADF usando actina de T. gondii recombinante (TgACT), todas as concentrações de TgADF testadas causaram diminuição da taxa de polimerização de actina de T. gondii, mesmo em concentrações extremamente baixas como 25 nM (MEHTA; SIBLEY, 2010).

As hipóteses levantadas pelos autores daquele trabalho para explicar essa diferença na polimerização de actinas de coelho e homóloga atribuía a causa desse comportamento à maior afinidade entre TgADF e TgACT ou que a polimerização de TgACT seria mais lenta e sensível à inibição (MEHTA; SIBLEY, 2010). Actina de mamíferos apresenta polimerização limitada, termodinamicamente, pela nucleação, ou seja, pela formação inicial de dímeros e trímeros. Após a formação de trímeros, a elongação ocorre rapidamente de maneira a depender da concentração de monômeros disponíveis (BLANCHOIN et al., 2014).

Actina de organismos apicomplexas apresenta uma dinâmica não convencional (SAHOO et al., 2006; SKILLMAN et al., 2013). Skillman et al. (2013) mostraram que TgACT não apresenta nucleação como fator limitante de polimerização, propondo um modelo de polimerização isodésmica. Considerando o modelo de Andrianantoandro e Pollard (2006), de que a contribuição principal de cofilinas humana e de *S. pombe* para aumentar a taxa de polimerização espontânea de actina é a promoção da nucleação, propõe-se aqui a hipótese de que o aumento na taxa de polimerização de actina de coelho, quando presentes em concentrações menores de NcADF ou TgADF, pode ocorrer devido à capacidade conservada dessas proteínas em nuclear actinas de mamíferos.

A atividade de nucleação não ocorreria para actina homóloga, pois esta não apresentaria nucleação como fator limitante de polimerização, prevalecendo o sequestro de monômeros e consequente diminuição da taxa de polimerização. A atividade de sequestro de monômeros seria visível e prevaleceria sobre a nucleação somente quando estas proteínas estão presentes em concentrações mais altas no meio. Essas diferenças de atividade dependente de concentração poderiam estar relacionadas a variadas afinidades a sítios de ligação específicos em actina-G. Como, estruturalmente, actina de organismos apicomplexas e actina de mamíferos apresentam diferenças (VAHOKOSKI et al., 2014), seriam necessárias análises voltadas especificamente para avaliação de afinidade de NcADF ou TgADF por sítios de ligação em actina-G heteróloga e homóloga para fundamentar ou não essa hipótese.

A diminuição da fluorescência de PI-actina (ou seja, diminuição da quantidade de filamentos) no estado estacionário em presença de NcADF é mais um indicativo de sequestro de monômeros. NcADF presente na solução sequestra actina-G de coelho, diminuindo a disponibilidade dessas subunidades para a polimerização. O estado estacionário é atingido quando as taxas de polimerização e despolimerização de actina estão em equilíbrio e, em presença de NcADF, o número de filamentos de actina diminui, uma vez que a disponibilidade de monômeros pode estar comprometida devido à ligação com NcADF. A mesma característica foi observada com TgADF (MEHTA; SIBLEY, 2010), actoforina (MACIVER et al., 1991), ADF1 de *A. thaliana* (HAWKINS et al., 1993). Em contraste, um excesso de duas vezes a molaridade de PfADF1, comparada com a de actina, não ocasionou alterações na fluorescência em estado estacionário (SCHÜLER et al., 2005a).

A ligação direta entre NcADF e Mg-ATP-actina-G foi demonstrada através de ensaios de ligação com ou sem o uso de agentes formadores de ligação cruzada. O ensaio bidimensional, baseado em Maciver e Weeds (1994), mostrou uma região no gel onde, aparentemente, NcADF e actina de coelho migraram juntos, indicando interação, mesmo que pequena, entre eles. Não foram encontrados trabalhos que tenham realizado esse ensaio para ADF de apicomplexas. Para confirmar a presença de interação entre essas proteínas, formaldeído e EDC foram utilizados para observação de interação. O EDC é um composto tradicionalmente utilizado para visualização de ligações transientes entre proteínas e seu uso para visualização de ligação entre ADF/cofilinas e actina é bem estabelecido (MACIVER et al., 1994; PFANNSTIEL et al., 2001; WONG et al., 2014). Com relação ao uso de formaldeído com esse objetivo, não foram encontrados relatos na literatura. Na presença de ambos os agentes foi observada fraca interação entre NcADF e actina-G, através da formação de uma banda de tamanho compatível com o peso molecular somado de ambas as proteínas (~60 kDa). Essa banda formada não poderia indicar um dímero de actina, pois o dímero teria, pelo menos, 84 kDa, resultando da soma dos pesos moleculares de dois monômeros de actina (~42 kDa cada). Quando 4% de formaldeído foi utilizado, NcADF pôde ser detectada através do uso de soro anti-NcADF na banda de 60 kDa.

A ligação entre actoforina e actina-G foi determinada como sendo uma interação equimolar (MACIVER; WEEDS, 1994). A afinidade por actina-G também foi observada, de maneira direta, em PfADF1 (SCHÜLER et al., 2005a) e também com ADF e cofilina de frango (CHEN et al., 2004). Indiretamente, através de avaliação de troca de nucleotídeos, a ligação entre TgADF e ATP-actina-G foi observada, uma vez que TgADF inibe a troca de nucleotídeos de actina-G (MEHTA; SIBLEY, 2010).

5.1.3 Quebra de filamentos de actina

Além do desmonte de actina-F, cuja causa foi atribuída ao sequestro de monômeros de actina por NcADF e despolimerização, também pôde ser observada quebra (denominada *severing* em ingês) de filamentos e associação, mesmo que discreta, de NcADF a actina-F. ADF/cofilinas canônicas interagem com actina-F e causam, em baixas concentrações, o desmonte dos filamentos por quebra ou despolimerização (ANDRIANANTOANDRO; POLLARD, 2006; ONO, 2007).

Sítios conhecidos de interação com actina-F descritos em ADF/cofilinas estão ausentes em NcADF e em ADF de outros organismos apicomplexas (com exceção de PfADF2). Essa característica pode, portanto, ser determinante para a relativa baixa interação detectada entre essas ADF e actina-F (MEHTA; SIBLEY, 2010; WONG et al., 2011). Aqui, foram mostradas evidências tanto de interação entre NcADF e actina-F de coelho, como de quebra de filamentos. Em 2011, Wong et al. mostraram que o resíduo LYS72 de PfADF1, correspondente ao LYS68 em NcADF, único resíduo básico exposto ao solvente pertencente ao diminuído F-loop de organismos apicomplexas, é essencial para a quebra de filamentos por PfADF1 in vitro. Em T. gondii, é conhecido que o knockdown de TgADF causa protrusão da região apical e acúmulo de actina nos polos de taquizoítas extracelulares, assim como alterações na motilidade (MEHTA; SIBLEY, 2011). A restauração do knockdown com TgADF mutado com substituição de LYS68 por ALA68 apresentou um fenótipo igual ao do taquizoíta selvagem e restaurou funcionalmente características de motilidade, mostrando que in vivo, a substituição desse sítio não altera funções dependentes da dinâmica de actina (HAASE et al., 2015). Analisando os resultados de PfADF1 mutado in vitro (WONG et al., 2011) e TgADF mutado in vivo (HAASE et al., 2015), não é possível determinar um consenso sobre a importância do sítio LYS72 (Plasmodium) e LYS68 (N. caninum e T. gondii) na quebra de filamentos em organismos do filo Apicomplexa. Interessantemente, Wong et al. (2014) detectou sítios de ligação de PfADF1 com filamentos de actina, denominado sítios de ligação a actina-F 2 (os sítios de ligação a actina-F 1 são aqueles citados anteriormente), através de análise por espectrometria de massas de interação de PfADF2 com actina de coelho com uso de agentes formadores de ligações cruzada (figura 63, A). Os sítios GLU81, LYS100 e ASP117/120 foram encontrados em PfADF1 como responsáveis por interação com

DISCUSSÃO_

actina-F. Dos sítios de ligação a actina-F 2 descritos em PfADF1, somente LYS100 e ASP117 são conservados em NcADF, correspondentes aos resíduos LYS113 e ASP96, respectivamente (figura 63, B, em verde). A ligação entre NcADF e actina-F encontrada neste trabalho poderia ocorrer através do sítio LYS68 (base do pequeno F-*loop*) e também pelos dois sítios de ligação a actina-F 2 conservados em NcADF. Porém, em uma análise de mutagênese, os resíduos LYS100 e ASP120 foram substituídos por alanina, o que resultou em perda da capacidade de PfADF1 mutada em desmontar os filamentos de actina e, por extensão, de ligar-se a actina-F (WONG et al., 2014). Tais resultados indicaram a importância da função conjunta dos sítios mapeados para ligação e desmonte de actina-F. Apesar de glutamato e aspartato serem aminoácidos similares (GLU81 de PfADF1 e ADF76 de NcADF), seriam necessárias avaliações experimentais para determinar se, mesmo com as diferenças de aminoácidos observados entre PfADF1 e NcADF, o sítio de ligação a actina-F 2 estaria presente em ADF de *N. caninum*.



Figura 63. Sítios de ligação de actina-F 2 em fator de despolimerização de actina 1 de *Plasmodium falciparum* (PfADF1). Representação dos sítios de ligação de actina-2 identificados em PfADF1 por uso de agentes formadores de ligações cruzadas, seguido de análise por espectrometria de massas (WONG et al., 2014). A) Os resíduos de PfADF1 identificados como ligantes de actina são: resíduo GLU81 (peptídeo 81-86, vermelho), LYS100 (peptídeo 96-101, azul escuro) e ASP117/120 (peptídeo 101-122, amarelo) Estes resíduos ligam-se aos resíduos LYS328 (peptídeo 327-335, amarelo), GLU99/100 (peptídeo 96-113, azul escuro), LYS328 (peptídeo 327-335, amarelo), respectivamente. Fonte da imagem: WONG et al., 2014. B) Alinhamento entre sequencias proteicas de PfADF1 e NcADF. Na seta vermelha, resíduo GLU81; na seta azul escura, LYS100; nas setas amarelas, resíduos ASP117/120. Nos retângulos verdes, resíduos LYS113 e ASP96 de NcADF, conservados entre ambas as sequências de ADF. Em * roxos, sítios mutados por alanina por WONG et al., 2014.

Com discutido anteriormente, a capacidade de NcADF de desmontar os filamentos de actina não depende do pH *in vitro*. Porém, a interação entre NcADF e actina-F foi observada somente em pH 6,5 enquanto que TgADF ligou-se em maior quantidade a actina-F em pH acídico (MEHTA; SIBLEY, 2010). De maneira geral, ADF/cofilinas têm sua interação com actina-F regulada pelo pH (AIZAWA et al., 1995; HAWKINS et al., 1993; YONEZAWA et al., 1985), com algumas exceções, como actoforina, que interação ADF/cofilina-actina sensível ao pH ainda não tem um mecanismo elucidado e pode ser explicada por três hipóteses: (A) pode ser ocasionada por resíduos tituláveis na superfície das proteínas; (B) a estrutura terciária de ADF/cofilina pode sofrer alterações de acordo com o pH; (C) mudanças de conformação na superfície de actina moduladas pelo pH (BLONDIN et al., 2002).

DISCUSSÃO

Considerando as hipóteses listadas acima, Blondin et al. (2002) detectaram uma mudança de conformação pH-dependente no subdomínio 1 de actina que poderia explicar a sensibilidade ao pH da interação entre ADF e actina.

A observação da ligação de NcADF a actina-F, mesmo que discreta e apenas em pH baixo, mas existente, foi acompanhada de desmonte de filamento de actina. Evidências indiretas de quebra de filamentos por NcADF também foram inicialmente observadas. Uma delas é o aumento da fluorescência seguido de diminuição, o efeito de ultrapassagem (*overshoot*), observado no ensaio de cinética de polimerização de actina (figura 64). Dentre ensaios com ADF/cofilinas, o efeito de ultrapassagem foi observado em presença de actoforina (COOPER et al., 1986; MACIVER et al., 1991), ADF1 de *A. thaliana* (CARLIER et al., 1997; SCHÜLER et al., 2005a), cofilina de levedura (MOON et al., 1993) e depactina de estrela-do-mar (MABUCHI, 1983). Esse efeito foi associado a quebra de filamentos por actoforina (MACIVER et al., 1991).



Figura 64. **Representação do efeito de ultrapassagem ou overshoot.** O overshoot pode ser observado em ensaios de cinética de polimerização de pireno-actina (PI-actina) e representa um aumento na fluorescência seguido de diminuição, formando um pico. Fonte: adaptado de BROOKS; CARLSSON, 2008.

O efeito de ultrapassagem observado em presença de 6 e 10 µM de NcADF foi revertido quando fosfato inorgânico foi adicionado a reação contendo 10 µM de NcADF. Fosfato inorgânico (Pi) interage com actina-F, gerando uma forma intermediária ADP-Pi-actina, a qual estabiliza filamentos (CARLIER et al., 1991; NOMURA et al., 1975). Maciver et al. (1991) demonstraram que a adição de tampão

fosfato à reação inibe a ligação entre actoforina e actina, assim como inibe a quebra de filamentos por essa proteína. Além disso, tampão fosfato causa redução da taxa de despolimerização de actina em presença de actoforina (BLANCHOIN; POLLARD, 1999; MACIVER; WEEDS, 1994). É provável que esses efeitos sejam causados pela competição de actoforina e Pi pela ligação em ADP-actina-F (BLANCHOIN; POLLARD, 1999). Além do efeito em actoforina, também foi observado que a presença de Pi reduz a taxa de ligação de cofilina de levedura a actina-F (MUHLRAD et al., 2006). Desse modo, a total inibição do efeito de ultrapassagem por NcADF, observado durante a polimerização de actina, pode ter sido causado pela estabilização de filamentos em presença de Pi e impedimento da ligação de NcADF a actina-F, prevenindo a quebra de actina-F por NcADF. Esse resultado seria, portanto, uma evidência indireta de interação entre NcADF e filamentos de actina, assim como da atuação de NcADF na quebra de actina-F. Ademais, a inibição da quebra de filamentos por Pi pode indicar que NcADF apresenta maior afinidade por ADP-actina do que por ADP-Pi-actina ou ATP-actina.

Para avaliar mais especificamente a capacidade de quebra de actina-F por NcADF, foi realizada análise por viscosimetria de baixo cisalhamento. Foi observada redução de quase 90% da viscosidade da solução em presença de alta concentração de NcADF (10 µM). Comparativamente, é uma atividade de quebra pequena, considerando que apenas 1 µM de actoforina e 8 µM de ADF humana causaram a mesma redução de viscosidade (MACIVER et al., 1998). A baixa atividade relativa de quebra de filamentos também foi descrita em TgADF, por observação direta e comparativa a cofilina de S. pombe (MEHTA; SIBLEY, 2010). Essa fraca atividade de quebra de filamentos por TgADF foi atribuída, por Mehta e Sibley (2010), ao fato de actina-F ser transiente e atividades de quebra acentuadas poderiam impedir uma certa estabilidade dos filamentos pelo tempo em que seriam necessários para os processos celulares. PfADF1 mostrou atividade de quebra de filamentos de actina de coelho comparável à quebra por cofilina de S. pombe e cofilina 1 humana (WONG et al., 2011). Recentemente, foram detectados pela primeira vez filamentos de actina in vivo em T. gondii, formando uma rede de actina que conecta, após replicação dos parasitas, as regiões posteriores de células filhas, com expansão da rede para todo o vacúolo parasitóforo, assim como uma rede de actina entre os vacúolos (PERIZ et al., 2016). Filamentos de actina haviam sido observados in vivo, anteriormente, também em Theileria annulata (KÜHNI-BOGHENBOR et al., 2012). O papel de actina em outros processos além da motilidade por deslizamento, como replicação (HAASE et al., 2015; PERIZ et al., 2016) e motilidade de grânulos densos (HEASLIP et al., 2016) também pode estar sujeito à regulação por ADF. Esse mecanismo conservado, porém discreto, de interação com actina-F presente em ADF/cofilinas de organismos apicomplexas (MEHTA; SIBLEY, 2010; WONG et al., 2014) pode ter um papel importante na regulação de filamentos de actina observados durante a replicação (Periz et al, 2016). A importância de actina nos organismos desse filo tem sido atribuída ao longo do tempo quase que exclusivamente a invasão e motilidade por deslizamento. Em vista disso, a investigação da atividade de ADF ficou restrita à atribuição de função regulatória apenas nesse mecanismo. Com outros processos celulares envolvendo actina sendo descritos recentemente, a investigação das funções de ADF torna-se mais abrangente.

A caracterização de NcADF desenvolvida aqui permitiu uma contribuição para a investigação do papel de mais uma peça no quebra-cabeças que é a compreensão dos fatores regulatórios na dinâmica de actina. Esses fatores estão, por consequência, envolvidos em processos celulares críticos como motilidade celular, citocinese, fagocitose, replicação e endo/exocitose em eucariotos e ainda estão longe de serem completamente elucidados. Especialmente em organismos do filo Apicomplexa, essa regulação de actina, que é conhecida por sua dinâmica não convencional (SAHOO et al., 2006; SCHÜLER et al., 2005b; SKILLMAN et al., 2013; VAHOKOSKI et al., 2014), ainda apresenta incontáveis lacunas a serem preenchidas. A observação recente de filamentos de actina in vivo em T. gondii e o envolvimento desses filamentos em processos distintos de invasão (PERIZ et al., 2016) abriu novas possibilidades de investigação de ABPs e de fatores regulatórios de dinâmica de actina, de maneira geral, em outros processos celulares importantes para a sobrevivência de parasitas do filo Apicomplexa. Em N. caninum, especificamente, as investigações nesse sentido ainda são mínimas, e, apesar das discussões serem direcionadas para processos com grande probabilidade de conservação com mecanismos elucidados de T. gondii, não é possível afirmar, ao certo, o quanto esses mecanismos permanecem completamente conservados entre N. caninum, T. gondii e os outros organismos que compartilham o filo Apicomplexa.

5.2 Proteína associada a ciclase de N. caninum (NcCAP)

Proteínas associadas a ciclase (CAP) são importantes proteínas reconhecidas por seu papel na regulação da dinâmica de actina, assim como outros processos celulares (ONO, 2013). Essas proteínas, assim como ADF, fazem parte do restrito arsenal de ABPs identificadas em organismos apicomplexas (BAUM et al., 2006). Entretanto, há poucos trabalhos na literatura que investigam o papel dessa proteína em organismos desse filo, ficando restritos a CAP de Plasmodium e Cryptosporidium parvum (HLISCS et al., 2010; MAKKONEN et al., 2013). Nesses organismos foi mostrado que CAP, apesar de ser truncada com relação a CAPs de outros eucariotos (ver discussão adiante), mantém a função reguladora de dinâmica de actina, conservada em todos os organismos eucariotos em que essa proteína foi estudada. De maneira geral, CAPs atuam como proteínas que se ligam a actina (ABPs) com funções de sequestro de monômeros de actina, inibição da troca de nucleotídeos de actina-G, assim como interação com actina-F, causando sua despolimerização e até quebra de filamentos (ONO, 2013). Desse modo, é provável que CAP de N. caninum (NcCAP) participe, juntamente com actina e outras ABPs, da manutenção de processos-chave para a sobrevivência e proliferação de N. caninum nas células hospedeiras como invasão, replicação e egresso, além de outros possíveis processos envolvendo dinâmica de actina. A compreensão do papel exercido por NcCAP nos processos celulares de N. caninum pode, assim como NcADF, contribuir para a elucidação de mecanismos, permitindo o desenvolvimento de estratégias de combate à infecção por esse parasita.

Para este trabalho, um gene, de acesso NCLIV_054140, cujo produto expresso apresentou potencial para corresponder a NcCAP, foi selecionado em banco de dados para caracterização. Esse acesso também foi identificado em ESA de *N. caninum* (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013). A proteína expressa por esse gene foi submetida a caracterização *in silico* e molecular, após a geração de anticorpos policionais a partir do soro de camundongos imunizados com a proteína NcCAP recombinante.

O acesso identificado neste trabalho teve seu produto de expressão analisado quanto a presença de domínios e identidade/similaridade com CAPs de outros organismos apicomplexas e Srv2 de *Saccharomyces cerevisiae*. A presença de domínio CAP-C entre os aminoácidos 6 e 221 é um forte indicativo de que a proteína analisada seja uma CAP. De maneira geral, CAPs possuem diversos domínios e

DISCUSSÃO

regiões de importância, dentre eles destacam-se a região N-terminal, região Cterminal (CAP-C), o domínio WH2 e região rica em prolina (ONO, 2013). Todavia, organismos apicomplexas e outros protozoários apresentam somente a região Cterminal (CAP-C), que é responsável pela ligação com actina-G (BAUM et al., 2006; HLISCS et al., 2010, figura 65). Além do domínio CAP-C, 35% idêntico à mesma região de Srv2, uma região compreendida por aminoácidos N-terminais de CAPs de apicomplexas, incluindo NcCAP, alinhou-se ao domínio WH2 e à região de transição subsequente de Srv2. A identidade do alinhamento foi insignificante, indicando que esses aminoácidos de CAPs de apicomplexas não correspondem ao referido domínio. Essa observação divergiu de resultados de alinhamento mostrados anteriormente para CAPs de Plasmodium, Toxoplasma e C. parvum com Srv2 (HLISCS et al., 2015), onde essa região de identidade insignificante pelo domínio de homologia a WH2 ocorreu apenas para CpCAP. Essa diferença pode ter sido ocasionada pelo uso de diferentes algoritmos de alinhamento, porém, Hlics et al. (2010) não especificaram qual o método de alinhamento utilizado naquela ocasião. Apesar das divergências, NcCAP apresentou resíduos conservados com CAPs de outros organismos apicomplexas, assim como com Srv2. Desse modo, a identificação do domínio CAP-C conservado e a identidade com outras CAPs indicam que o acesso NCLIV 054140 é uma CAP de N. caninum.

A sequência primária de NcCAP fornecida pelo banco de dados apresenta uma região N-terminal de 17 aminoácidos que não mostra identidade com nenhuma sequência com a qual foi alinhada. Esses 17 aminoácidos encontram-se localizados antes de uma MET18, que apresenta identidade com a MET1 de TgCAP. Portanto, é possível que essa região não faça parte do produto de expressão do gene referente ao acesso NCLIV_054140.



Figura 65. **Domínios de Srv2/CAP.** Representação esquemática dos domínios de CAP canônicas (CAP) e de protozoários (CAP-C) e suas funções de ligação com outras proteínas como adenilato ciclase, profinilina, Abl, ABP1 e actina (adaptado de ONO et al., 2013).

NcCAP foi clonada e expressa em E. coli BL21(DE3) através de dois plasmídeos, pET32a(+) e pET28a(+); a expressão de NcCAP por pET32a(+) foi confirmada por espectrometria de massas. Todavia, não foi possível, nas condições testadas, obter essa proteína recombinante na forma solúvel, mesmo utilizando o plasmídeo pET32a(+). Esse plasmídeo expressa uma cauda de tioredoxina (de 109 aminoácidos) fusionada à proteína-alvo, com objetivo de aumentar a expressão fora de corpos de inclusão, devido à alta estabilidade e solubilidade características de tioredoxina (LaVALLIE et al., 1993), além de suas características de facilitadoras de folding de proteínas (BERNDT et al., 2008). Outras condições conhecidas por diminuir a expressão de proteínas recombinantes em corpos de inclusão foram testadas, como: baixas concentrações de IPTG e baixas temperaturas de indução. Apesar disso, não foi possível obter NcCAP na forma solúvel neste trabalho, impossibilitando sua avaliação bioquímica sobre a dinâmica de actina de coelho, como foi feito com NcADF. Essa mesma dificuldade também foi relatada durante a tentativa de expressão solúvel de PfCAP (HLICS et al., 2010), apesar dessa mesma proteína ter sido expressa na forma solúvel posteriormente (MAKKONEN et al., 2013). NcCAP pôde ser expressa em nosso laboratório de maneira solúvel fusionada a uma cauda N-terminal de 8 kDa de peptídeo solúvel através de um plasmídeo híbrido (pET28_1080; patente depositada), desenvolvido em nosso grupo de pesquisas pelo Dr. Luiz Miguel Pereira; a expressão está mostrada na dissertação de mestrado de Bruno Bonamichi Bueno, (BUENO, 2016). Entretanto, a expressão de NcCAP solúvel nessas condições não foi possível durante o estágio sanduíche realizado na Universidade de Edimburgo, onde foi feita a purificação solúvel e caracterização bioquímica de NcADF. O plasmídeo pET28_1080 recombinante foi transportado para Edimburgo e sua transformação foi alcançada, embora dificuldades similares às relatadas para NcADF (item 4.1.2.1) tenham sido encontradas no processo. Porém, sua expressão não foi obtida naquela oportunidade.

Como foi expressa, visualmente, em maior quantidade em pET32a(+) do que em pET28a(+), animais foram imunizados com NcCAP_pET32 e o soro resultante foi utilizado na caracterização molecular dessa proteína endógena em taquizoítas de N. caninum. O soro mostrou-se específico para detecção de proteínas em N. caninum, uma vez que não detectou proteínas em extrato total de céluas Vero através de western blot (dados não mostrados). O soro anti-NcCAP foi capaz de detectar ambas as formas recombinantes de NcCAP expressas neste trabalho por western blot, além da detecção de ~25 e ~20 kDa a partir de extrato total de N. caninum. Adicionalmente, através de western blot 2-D foram detectados spots com aproximadamente 23, 30 e 36 kDa. Os pesos moleculares das detecções em western blot 1-D e 2-D foram próximos, apesar da pequena divergência. Essa diferença de valores poder ter acontecido por diferentes velocidades de migração das amostras nos dois experimentos. Os spots detectados com peso molecular de ~36 kDa também foram detectados por western blot 1-D quando o soro foi testado em concentrações mais altas (resultado não mostrado) e a detecção em western blot 2-D pode ter acontecido, pois aqui a amostra estava presente no gel em maior concentração. Os spots correspondentes à detecção em western blot 2-D foram analisados por espectrometria de massas. Entretanto, as buscas não mostraram identificação com proteínas dos bancos de dados utilizados. Os estudos realizados com CAPs de apicomplexas voltaram-se à caracterização bioquímica, cristalização e transfecção ou nocaute in vivo (HLISCS et al, 2010; MAKKONEN et al., 2013) e não foram encontradas, portanto, avaliações moleculares envolvendo anticorpos específicos para comparação com resultados de western blot uni ou bidimensional para organismos desse filo.

161

Entretanto, uma caracterização com abordagem proteômica de avaliação de proteínas globais de *T. gondii* identificou um *spot* em SDS-PAGE 2-D correspondente a CAP dessa espécie com pl menor que 7 e peso molecular não especificado no estudo (COHEN et al., 2002). Em outra análise proteômica mais abrangente de taquizoítas de *T. gondii*, CAP foi identificada em cinco *spots*, porém não foram especificados pl ou peso molecular de todos eles (XIA et al., 2008). Nesse mesmo estudo, CAP foi identificada também em gel unidimensional em região do gel correspondente a aproximadamente 20 kDa.

A imunolocalização de NcCAP endógena em taquizoítas extracelulares de *N. caninum* mostrou, em alguns taquizoítas, um padrão similar ao da imunolocalização de actina (NcAct; apêndice G), com predominância nas regiões periféricas. A localização de NcAct em taquizoítas de *N. caninum* foi mostrada na dissertação de mestrado (BARONI, 2012). A aparente colocalização com NcAct indica forte atuação de NcCAP nos processos envolvendo dinâmica de actina *in vivo* de *N. caninum*. A localização de CAP na região periférica da célula foi observada em *Dictyostelium discoideum* (NOEGEL et al., 1999; YU et al., 1999), enquanto que em monócitos humanos, CAP1 foi identificada associada a membrana plasmática (LEE et al., 2014). A colocalização de CAP com actina foi observada em *S. cerevisiae* (FREEMAN et al., 1996), células de mamíferos (BERTLING et al., 2004) e em hifa e tubo germinativo de *Magnaporthe oryzae* (ZHOU et al., 2012). Em organismos apicomplexas não foram encontrados trabalhos que tenham realizado a localização *in vivo* de CAP.

Embora não tenha sido possível a caracterização bioquímica e funcional de NcCAP, por motivos discutidos acima, a caracterização molecular e *in silico* permitiram contribuir com uma visão geral da proteína em taquizoítas de *N. caninum*.

5.3 Caracterização do soro anti-NcAct201-310

Neste trabalho, também foi gerado o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ a partir da proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀, que corresponde à região compreendida entre os aminoácidos 201 e 310 de actina de *N. caninum*. A impossibilidade de expressão, em sistema procariótico, de NcAct recombinante completa, levou à expressão de uma região com menor identidade entre NcAct e actina de células Vero. Essa proteína foi expressa durante o mestrado (BARONI, 2012) com o objetivo de gerar um soro específico contra actina de *N. caninum*, uma vez que o anticorpo monoclonal anti-β-

actina C4, que foi capaz de detectar NcAct, também apresenta uma capacidade universal de reconhecer actina de diversas células, inclusive das células Vero. Essa característica impossibilitaria a localização de NcAct em taquizoítas intracelulares, por exemplo.

Actina é uma proteína abundantemente expressa em células eucarióticas de maneira geral e com função determinante em processos celulares. Organismos apicomplexas possuem actinas mais primitivas e divergentes caracterizadas até então (VAHOKOSKI et al., 2014) e que apresentam propriedades diferentes de actinas dos demais eucariotos, como abundância preponderante da forma monomérica *in vivo*, filamentos instáveis (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; WETZEL et al., 2003), polimerização isodésmica (SKILLMAN et al., 2013), hidrólise de ATP na forma monomérica e polimerização instantânea também em presença de ADP (VAHOKOSKI et al., 2014). Em *N. caninum*, foi mostrado que actina possui nove isoformas, identificadas por SDS-PAGE 2-D e espectrometria de massas, diferentemente de células Vero, que possuem apenas três (BARONI, 2012). Em *T. gondii*, diferentes isoformas de actina foram identificadas anteriormente em estudos de avaliação geral do proteoma (XIA et al., 2008), porém, não foram encontrados trabalhos específicos que investigassem mais detalhadamente essas isoformas.

Inicialmente, a tentativa de caracterização do soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀, através de *western blot* a partir de extratos totais de *N. caninum* e de células Vero, mostrou uma incapacidade do soro em questão em reconhecer actina dessas células, naquelas condições. Todavia, o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ reconheceu proteínas que ficaram na região superior de PAGE nativa, da mesma maneira que o anticorpo anti-β-actina C4. É interessante comparar esse resultado com aquele obtido no ensaio bidimensional de ligação de NcADF e actina de coelho (item 4.1.4.5). Naquela oportunidade, foi possível observar que parte da actina aplicada em PAGE nativa ficou retida na região superior do gel. Apesar das condições utilizadas nos ensaios serem bastante diferentes – aqui, foi utilizado extrato total de *N. caninum* em PAGE de 10%, e no ensaio bidimensional, uma mistura de actina de coelho e NcADF em PAGE de 8,5% – o comportamento de actina de coelho purificada poderia indicar um comportamento similar de NcAct endógena. Esse paralelo poderia demonstrar uma evidência de que o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ é sim capaz de reconhecer NcAct endógena.

Em conjunto, os resultados mostraram que o soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀, apesar de não específico para reconhecimento de proteína apenas de *N. caninum*, apresentou

DISCUSSÃO

uma capacidade maior de reconhecer proteínas, possivelmente NcAct, na forma nativa. Interessantemente, os anticorpos gerados contra uma região de proteína linearizada não foram capazes de reconhecer a proteína completa em sua conformação linear. Uma possível explicação é que o fragmento de NcADF sofreu montagem (folding) parcial no tampão com adjuvante durante a imunização, tornando alguns epítopos acessíveis ao sistema imunológico somente formados em proteína com uma conformação específica. Essa explicação resultaria em impossibilidade de detecção da proteína recombinante desnaturada pelo soro. Todavia, a proteína recombinante apresenta cauda 6 X histidina e a deteccão da proteína recombinante pelo soro poderia estar ocorrendo por detecção de epítopos da cauda e não do fragmento em si. Para avaliar a localização do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ na estrutura terciária de actina, foi utilizada a estrutura terciária elucidada de actina I de P. falciparum (PfAct I; acesso PDB 4CBU), cuja sequência primária é 93% idêntica a NcAct (figura 66). O acesso 4CBU (VAHOKOSKI et al., 2014) foi obtido por cristalização de PfAct I (cadeia A; figura 66, verde e vermelho) ligada a gelsolina (cadeia G; figura 66, cinza). A região correspondente aos aminoácidos 201-310 foi destacada em vermelho tanto na representação como *cartoon* (figura 66, A), guanto da superfície da proteína (figura 66, B). A região 201-310 compreende tanto aminoácidos expostos ao solvente, quanto aminoácidos internos à estrutura. Uma conformação similar a essa que o fragmento assume na figura 66 pode ser responsável pela formação de epítopos identificados pelos anticorpos presentes no soro anti- NcAct₂₀₁₋₃₁₀.

O único resultado que mostrou capacidade similar do soro em reconhecer proteínas desnaturadas e nativas foi o *dot blot*, com diferenças de resultados observados entre as membranas de nitrocelulose e PVDF. Essa diferença pode ser decorrente das diferentes características físicoquimicas das composições das membranas, uma vez que a membrana de PVDF é mais hidrofóbica que a nitrocelulose, podendo ocorrer perda de proteínas daquela membrana durante as lavagens, ocasionando, consequentemente, um sinal mais fraco após a revelação.



Figura 66. Estrutura terciária de actina I de *Plasmodium falciparum* (PfAct I) com destaque para **região compreendendo aminoácidos 201-310.** Estrutura terciária de PfAct I, **vermelho** e **verde**, ligada a gelsolina de camundongo, **cinza** (acesso PDB 4CBU). A região compreendida pelos aminoácidos 201-310 está destacada em **vermelho**. **A**) Representação da estrutura em *cartoon*. Os números 1-4 indicam a localização dos subdomínios de actina. **B**) Representação da superfície da estrutura. As estruturas estão mostradas com giro de 180º entre si em relação ao eixo y.

Não foi possível determinar, através dos resultados apresentados neste trabalho, a especificidade do soro quanto à detecção exclusiva de actina. Entretanto, a imunolocalização promoveu marcação da região periférica dos taquizoítas, de acordo com os resultados encontrados anteriormente com soro anti- β -actina C4. Resultados de imunofluorescência por microscopia confocal utilizando soro anti- β -actina C4 mostraram que actina de taquizoítas de *N. caninum* localizam-se na região periférica da célula (BARONI, 2012; apêndice G). A marcação da região nuclear pode indicar uma afinidade do soro anti-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ por actina nuclear, que pode ser importante para a divisão celular (KAPOOR; SHEN, 2014).

5.4 Considerações finais

5.4.1 NcADF

 a) O acesso NCLIV_012510 (ToxoDB) corresponde a uma ADF/cofilina de Neospora caninum (NcADF), com presença de domínio ADF-H e ausência de sítios de ligação conservados de ligação a actina-F;

 b) A estrutura terciária de NcADF apresenta conformação similar a ADF/cofilinas canônicas, com 5 folhas-beta e 3 alfa-hélices;

 c) NcADF recombinante é expressa na forma solúvel tanto em pET32a(+), quanto em pET28a(+) a 18°C ou temperatura ambiente (~22°C) por 18 horas, com indução de 0,2 mM de IPTG, mantendo-se solúvel em tampão com pH 7,0 após purificação;

d) O soro anti-NcADF:

Reconhece NcADF recombinante desnaturada expressa em pET32a(+),
assim como NcADF recombinante nativa expressa em pET28a(+);

Detecta, por western blot, três bandas de ~25, ~20 e ~14 kDa e oito spots
de ~15, 25 e 35 kDa a partir de extrato total de *N. caninum*

 Localiza NcADF difusa pelo citoplasma, porém com menos intensidade nas regiões polares de taquizoítas extracelulares de *N. caninum;*

e) NcADF endógena corresponde a proteína de ~15 kDa e pl de aproximadamente 6;

f) NcADF recombinante solúvel:

 causa pequeno desmonte de actina-F (filamentosa) de coelho de maneira independente de pH;

apresenta baixa afinidade por actina-F de coelho, ligando-se a ela somente em pH mais baixo;

- apresenta maior afinidade por filamentos de ADP-actina;

DISCUSSÃO

 aumenta a taxa inicial de polimerização de PI-actina de coelho quando presente em concentrações de 1,5, 3 ou 6 µM;

 diminui a taxa inicial de polimerização de PI-actina de coelho quando presente em concentração de 10 µM;

 apresenta dependência positiva de K_{obs} de actina de coelho com relação a concentração;

 diminui a viscosidade relativa de actina de coelho de maneira dependente de concentração;

 aumenta a concentração crítica (Cc) de PI-actina de coelho e diminui fluorescência de PI-actina no estado estacionário;

– liga-se a actina-G de coelho.

Portanto,

– NcADF recombinante despolimeriza filamentos de actina de coelho;

NcADF recombinante sequestra monômeros de actina de coelho;

– NcADF recombinante quebra filamentos de actina de coelho.

5.4.2 NcCAP

a) O acesso NCLIV_054140 (ToxoDB) corresponde a proteína associada a ciclase de *N. caninum* (NcCAP), com presença do domínio CAP-C;

b) NcCAP recombinante é expressa em corpos de inclusão através dos plasmídeos pET28a(+) e pET32a(+) em condições 37°C por 3 horas com 1 mM de IPTG e 18°C por 18 horas com 1 mM de IPTG, respectivamente;

c) O soro anti-NcCAP:

Detecta as duas formas de NcCAP recombinante, expressas em pET28a(+) e pET32a(+);

Detecta, por *western blot*, duas bandas de aproximadamente 20 e 25 kDa em extrato total de *N. caninum* e 9 *spots* de ~23, 30 e 35 kDa, com pls entre 4,1 e 7,8;

 Localiza NcCAP de forma difusa ou com predomínio na região periférica do citoplasma de taquizoítas de *N. caninum*;

5.4.3 NcAct201-310

O soro anti-NcAct201-310:

- a) Não é capaz de detectar actina de *N. caninum* ou de cálulas Vero por *western blot* a partir de extrato total de *N. caninum* em tampão desnaturante;
- b) É capaz de detectar a proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀;
- c) Detecta proteínas endógenas não-desnaturadas de N. caninum;
- d) É capaz de reconhecer proteínas desnaturadas de N. caninum;
- e) Localiza proteínas preferencialmente na região periférica no citoplasma e em região, possivelmente, nuclear.





6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para o entendimento das ABPs em *N. caninum* e, como consequência, no filo Apicomplexa. A caracterização molecular permitiu a identificação e localização de NcADF e NcCAP em taquizoítas de *N. caninum*, ampliando o conhecimento sobre essas proteínas *in vivo* e *in vitro*. Mecanismos de funcionamento de NcADF na dinâmica de actina foram desvendados: NcADF atua, principalmente, no sequestro de monômeros de actina e quebra de filamentos. Desse modo, a compreensão de características e funções de proteínas importantes para regulação de actina como NcADF e NcCAP pode colaborar, futuramente, para a elucidação de mecanismos-chave para a sobrevivência e disseminação dos parasitas pelo seu hospedeiro.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; OBINATA, T.; MINAMIDE, L. S.; BAMBURG, J. R. *Xenopus laevis* actindepolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development. **Journal of Cell Biology**, v. 132, n. 5, p. 871-885, 1996.

AGNEW, B. J.; MINAMIDE, L. S.; BAMBURG, J. R. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 29, p. 17582-17287, 1995.

AIZAWA, H.; SUTOH, K.; TSUBUKI, S.; KAWASHIMA, S.; ISHII, A.; YAHARA, I. Identification, characterization, and intracellular distribution of cofilin in *Dictyostelium discoideum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10923-10932, 1995.

ALEXANDER, D. L.; ARASTU-KAPUR, S.; DUBREMETZ, J. F.; BOOTHROYD, J. C. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 7, p. 1169-1173, 2006.

ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v.1, n. 2, Epub, 2005.

ALLEN, M. L.; DOBROWOLSKI, J. M.; MULLER, H.; SIBLEY, D.; MANSOUR, T. E. Cloning and characterization of actin depolymerizing factor form *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 88, p. 43-52, 1997.

ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. **Research Veterinary in Science**, v. 100, p. 169-175, 2015.

ANDENMATTEN, N.; EGARTER, S.; JACKSON, A. J.; JULLIEN N.; HERMAN, J. P.; MEISSNER M. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. **Nature Methods**, v. 10, n. 2, p. 125-127, 2013.

ANDRIANANTOANDRO, E.; POLLARD, T. D. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. **Molecular Cell**, v. 24, n.1, p. 13-23, 2006.

ASADA, M.; GOTO, Y.; YAHATA, K.; YOLOYAMA, N.; KAWAI, S.; INOUE, N.; KANEKO, O.; KAWAZU, S. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35227, 2012.

BAKER, N. A.; SEPT, D.; JOSEPH, S.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **PNAS**, v. 98, p. 10037-10041 2001.

BALCER, H. I.; GOODMAN, A. L.; RODAL, A. A.; SMITH E.; KUGLER, J.; HEUSER, J. E.; GOODE, B. L. Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. **Current Biology**, v. 13, n. 24, p. 2159-2169, 2003.

BAMBURG, J. R.; HARRIS, H. E.; WEEDS, A. G. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. **FEBS Letters**, v. 121, n. 1, p. 178-18, 1980.

BARONI, L. Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *Neospora caninum*. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas Á Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. BAUM, J.; RICHARD, D.; HEALER, J.; RUG, M.; KRNAJSKI, Z.; GILBERGER, T. W.; GREEN, J. L.; HOLDER, A. A.; COWMAN, A. F. Regulation of apicomplexan actin-based motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 621-628, 2006.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA), v. 1783, n. 4, p. 645-650, 2008.

BERNSTEIN, B. W.; BAMBURG, J. R. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends* in *Cell Biology*, v. 20, n. 4, p. 187-195, 2010.

BERNSTEIN, B. W.; PAINTER, W. B.; CHEN, H.; MINAMIDE, L. S.; ABE, H.; BAMBURG, J. R. Intracellular pH modulation of ADF/Cofilin proteins. **Cell motility and the Cytoskeleton**, v. 47, p. 319-336, 2000.

BERTLING, E.; HOTULAINEN, P.; MATTILA, P. K.; MATILAINEN, T;. SALMINEN, M.; LAPPALAINEN, P. Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 5, p. 2324-2334, 2004.

BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cell Microbiology**, v. 13, n.6, p. 797-805, 2011.

BESTEIRO, S.; MICHELIN, A.; PONCET, J.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, e1000309, 2009.

BICHET, M.; JOLY, C.; HENNI, A.; GUILBERT, T.; XÉMARD, M.; TAFANI, V.; LAGAL, V.; CHARRAS, G.; TARDIEUX, I. The toxoplasma-host cell junction is anchored to the cell cortex to sustain parasite invasive force. **BMC Biomol**, v. 12, n. 773, 2014.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 1, n. 8, p. 1513-1523, 1979.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd**. v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984

BLADER, I. J.; COLEMAN, B. I.; CHEN, C. T.; GUBBELS, M. J. Lytic Cycle of *Toxoplasma* gondii: 15 Years Later. **Annual Review Microbiology**, v. 69, p. 463-485, 2015.

BLANCHOIN, L.; BOUJEMAA-PATERSKI, R.; SYKES, C.; PLASTINO, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 235-263, 2014.

BLANCHOIN, L.; MICHELOT, A. Actin cytoskeleton: a team effort during actin assembly. Current Biology, v. 22, n. 16, R643-5, 2012.

BLANCHOIN, L.; POLLARD T. D. Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 39, p. 25106-25111, 1999.

BLANCHOIN, L.; ROBINSON, R. C.; CHOE, S.; POLLARD, T. D. Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, n. 2, p. 203-211, 2000.

BLONDIN, L.; SAPOUNTZI, V.; MACIVER, S. K.; LAGARRIGUE, E.; BENYAMIN, Y.; ROUSTAN, C. A structural basis for the pH-dependence of cofilin. F-actin interactions. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4194-4201, 2002.

BORRALHO, T.; CHANG, Y.; JAIN, P. A.; LALANI, M.; PARGHI, K. Effect of electroporation versus Hanahan protocols on the transformation of *Escherichia coli* HB101 with chromosomal DNA from *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* B23, and *Bacillus subtilis* WB746 and the plasmid p328.5, including an analysis of competent *Escherichia coli* HB101 cellular freeze tolerance. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 194-200, 2002.

BOSCH, J.; BUSCAGLIA, C. A.; KRUMM, B.; INGASON, B. P.; LUCAS, R.; ROACH, C.; CARDOZO, T.; NUSSENZWEIG, V.; HOL, W. G. Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. PNAS, v. 104, n. 17, p. 7015-7020, 2007.

BRIEHER, W. M.; KUEH, H. Y.; BALLIF, B. A.; MITCHISON, T. J. Rapid actin monomerinsensitive depolymerization of Listeria actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. **Journal** of Cell Biology, v. 23, n. 2, p. 315-324, 2006.

BROOKS, F. J.; CARLSSON, A. E. Actin polymerization overshoots and ATP hydrolysis as assayed by pyrene fluorescence. **Biophysical Journal**, v. 95, p. 1050-1062, 2008.

BROSSIER, F.; JEWETT, T. J.; SIBLEY, L. D.; URBAN, S. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4146-4151, 2005.

BUBB, M. R.; SENDEROWICZ, A. M.; SAUSAVILLE, E. A.; DUNCAN, K. L.; KORN, E. D. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 21, p. 14869-14871, 1994.

BUBB, M. R.; SPECTOR, I.; BEYER, B. B.; FOSEN, K. M. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5163-5170, 2000.

BUENO, B. B. Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum*. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

BURTNICK, L. D^{.;} UROSEV, D.; IROBI, E.; NARAYAN, K.; ROBINSON, R. C. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. **EMBO J**, v. 23, n. 14, p. 2713-2722, 2004.

CARLIER, M. F.; LAURENT, V.; SANTOLINI, J.; MELKI, R.; DIDRY, D.; XIA, GX.; HONG, Y.; CHUA, N. H.; PANTALONI, D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. **Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 6, p. 1307-1322, 1997.

CARLIER, M. F.; Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. **Current Opinion in Cell Biology**, v 3, n. 1, p. 12-7, 1991.

CARLIER, M. F.; PERNIER, J.; MONTAVILLE, P.; SHEKHAR, S.; KÜHN, S. Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. **Cellular and Molecular Life Sciencies**, v. 72, n. 16, p. 3051-3067, 2015.

CARLSSON, A. E. Actin dynamics: from nanoscale to microscale. Annual Review in **Biophysics**, v. 39, p. 91-110, 2010.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, n. 2, p. 114-123, 1997.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Receptor-ligand interaction and invasion: microneme proteins in apicomplexans. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 33-45, 2008.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83-89, 2007.

CHAUDHRY, F.; BREITSPRECHER, D.; LITTLE, K.; SHAROV, G.; SOKOLOVA, O.; GOODE, B. L. Srv2/cyclase-associated protein forms hexameric shurikens that directly catalyze actin filament severing by cofilin. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 1, p. 31-41, 2013.

CHAUDHRY, F.; GUÉRIN, C.; VON WITSCH, M.; BLANCHOIN, L.; STAIGER, C. J. Identification of Arabidopsis cyclase-associated protein 1 as the first nucleotide exchange factor for plant actin. **Moloecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 8, p. 3002-3014, 2007.

CHAUDHRY, F.; LITTLE, K.; TALARICO, L.; QUINTERO-MONZON, O.; GOODE, B. L. A central role for the WH2 domain of Srv2/CAP in recharging actin monomers to drive actin turnover in vitro and in vivo. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 67, n. 2, p. 120-133, 2010.

CHEN, H.; BERNSTEIN, B. W.; SNEIDER, J. M.; BOYLE, J. A.; MINAMIDE, L. S.; BAMBURG, J. R. In vitro activity differences between proteins of the ADF/cofilin family define two distinct subgroups. **Biochemistry**, v. 43, n. 22, p. 7127-7142, 2004.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. L.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica**, v. D66, p. 12-21, 2010.

CHHETRI, G.; KALITA, P.; TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in Escherichia coli. **MethodsX**, v. 2, p. 385-391, 2015.

CHIN, S. M.; JANSEN, S.; GOODE, B. L. TIRF microscopy analysis of human Cof1, Cof2, and ADF effects on actin filament severing and turnover. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 8, p. 1604-1616, 2016.

COHEN, A. M.; RUMPEL, K.; COOMBS, G. H.; WASTLING, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. International Journal of Parasitology, v. 32, n. 1, p. 39-51, 2002.

COOPER, G. M. Structure and Organization of Actin Filaments. In: SUNDERLAND, M. A. The Cell: A Molecular Approach. Sinauer Associates. 2nd edition; 2000. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9908/.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 4, p. 1473-1478, 1987.

COOPER, J. A.; BLUM, J. D.; WILLIAMS, R. C. JR.; POLLARD, T. D. Purification and characterization of actophorin, a new 15,000-dalton actin binding protein form *Acanthamoeba castelanii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 477-485, 1986.

COUÉ, M.; BRENNER, S. L.; SPECTOR, I.; KORN, E. D. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. **FEBS Letters**, v. 213, n. 2, p; 316-318, 1987.

DAI, K.; LIAO, S.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; TU, X. Structural and functional insight into ADF/cofilin from *Trypanosoma brucei*. **PLOS ONE**, v. 8, e53639, 2003.

DE HOSTOS, E. L.; BRADTKE, B.; LOTTSPEICH, F.; GERISCH, G. Coactosin, a 17 kDa Factin binding protein from *Dictyostelium discoideum*. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, *v. 26, n. 3, p. 181-191,* 1993. DELORME-WALKER, V.; ABRIVARD, M.; LAGAL, V.; ANDERSON, K.; PERAZZI, A.; GONZALEZ, V.; PAGE, C.; CHAUVE,T J.; OCHOA, W.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; TARDIEUX, I. Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics facilitating *Toxoplasma* invasion. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 4333-4342, 2012.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 99-104, 2002.

DOBROWOLSKI, J. M.; NIESMAN, I. R.; SIBLEY, L. D. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 37, n. 3, p. 253-262, 1997.

DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 933-939, 1996.

DOI, Y.; SHINZAWA, N.; FUKUMOTO, S.; OKANO, H.; KANUKA, H. ADF2 is required for transformation of the ookinete and sporozoite in malaria parasite development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 4, p. 668-672, 2010.

DOLINSKY, T. J.; NIELSEN, J. E.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W665-W667, 2004.

DOMINGUEZ, R.; HOLMES, K. C. Actin structure and function. Annual Review of Biophysics, v. 40, p. 169-186, 2011.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-38, 2015.

DOS REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V.; TSUBAKIHARA, M.; BERRY, D. A.; NOSWORTHY, NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 433-473, 2003.

DREWRY, L. L.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* Actin Is Required for Efficient Host Cell Invasion. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00557, 2015.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; BARR, B.; BARTA, J.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.; BOWMAN, D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.; HOWE, D.; JENKINS, M.; KOBAYASGU, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.; MATTSSON, J.; MCALLISTER, M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.; SPEER, C.; TREES, A.; UGGLA, A.; UPTON, S.; WILLIAMS, D.; LINDSAY. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. Journal of Comparative Pathology, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.

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, 1988.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.; MARTINS, J.; KWOK, O.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (Canis lupus) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 382-387, 2011.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals - The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cell Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 841-848, 2006.

DZIERSZINSKI, F.; MORTUAIRE, M.; CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. **Molecular Biology**, v.37(3), p.574-582, 2000.

EDWARDS, K. A.; MONTAGUE, R. A.; SHEPARD, S.; EDGAR, B. A.; ERIKSON, R. L.; KIEHART, D. P. Identification of *Drosophila* cytoskeletal proteins by induction of abnormal cell shape in fission yeast. **PNAS**, v. 91, n. 10, p. 4589-4593, 1994.

EGARTER, S.; ANDENMATTEN, N.; JACKSON, A. J.; WHITELAW, J. A.; PALL, G.; BLACK, J. A.; FERGUSON, D. J.; TARDIEUX, I.; MOGILNER, A.; MEISSNER, M. The *Toxoplasma* Acto-MyoA motor complex is important but not essential for gliding motility and host cell invasion. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91819, 2014.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396-404, 1997.

ESWAR, N, WEBB, B, MARTI-RENOM, M. A., MADHUSUDHAN, M.S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Protein Science**, v. Chapter 2, p. Unit 2.9, 2007.

FEDOR-CHAIKEN, M.; DESCHENES, R. J.; BROACH, J. R. SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. **Cell**, v. 61, n. 2, p. 329-340, 1990.

FIRAT-KARALAR, E. N.; WELCH, M. D. New mechanisms and functions of actin nucleation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 4-13, 2011.

FREEMAN, N. L.; CHEN, Z.; HORENSTEIN, J.; WEBER, A.; FIELD, J. An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the Saccharomyces cerevisiae cyclase-associated protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5680-5685, 1995.

FREEMAN, N. L.; LILA, T.; MINTZER, K. A.; CHEN, Z.; PAHK, A. J.; REN, R.; DRUBIN, D. G.; FIELD, J. A conserved proline-rich region of the Saccharomyces cerevisiae cyclaseassociated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 2, p. 548-546, 1996.

FRÉNAL, K.; POLONAIS, V.; MARG, J. B.; STRATMANN, R.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATIFAVRE, D. functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 4, p. 343-357, 2010.

FRÉNAL, K.; SOLDATI-FAVRE, D. Plasticity and redundancy in proteins important for Toxoplasma invasion. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. e1005069, 2015.

FRÉNAL, K.; SOLDATI-FAVRE, D. Role of the parasite and host cytoskeleton in apicomplexa parasitism. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 6, p. 602-611, 2009.

GAJRIA, B.; BAHL, A.; BRESTELLI, J.; DOMEER, J.; FISCHER, S.; GAO, X.; HEIGES, M.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; MACKEY, A. J.; PINNEY, D. F.; ROOS, D. S.; STOECKERT, C. J.; WANG, H.; BRUNK, B. P. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl 1, p. D553-D556, 2008.

GASKINS, E.; GILK, S.; DEVORE, N.; MANN, T.; WARD, G.; BECKERS, C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Biology**, v. 165, n. 3, p. 383-393, 2004.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocol Handbook**. In: John M. Walker, Ed. Human Press, 2005, p. 571-607.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 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, n. 2, p. 159-161, 2004.

GUAN, J. Q.; VOROBIEV, S.; ALMO, S. C.; CHANCE, M. R. Mapping the G-actin binding surface of cofilin using synchrotron protein footprinting. **Biochemistry**, v. 41, n. 18, p. 5765-5775, 2002.

GUPTA, C. M.; THIYAGARAJAN, S.; SAHASRABUDDHE, A. A. Unconventional actins and actin-binding proteins in human protozoan parasites. **International Journal of Parasitology**, v. 45, n. 7, p. 435-447, 2015.

HAASE, S.; ZIMMERMANN, D.; OLSHINA, M. A.; WILKINSON, M.; FISHER, F.; TAN, Y. H.; STEWART, R. J.; TONKIN, C. J.; WONG, W.; KOVAR, D. R.; BAUM, J. Disassembly activity of actin-depolymerizing factor (ADF) is associated with distinct cellular processes in apicomplexan parasites. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 17, p. 3001-3012, 2015.

HÅKANSSON, S.; MORISAKI, H.; HEUSER, J.; SIBLEY, L. D. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 11, p. 3539-3547, 1999.

HARTWIG, J. H.; STOSSEL, T. P. Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5696-5705, 1975.

HARVEY, K. L.; YAP, A.; GILSON, P. R.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Insights and controversies into the role of the key apicomplexan invasion ligand, Apical Membrane Antigen 1. International Journal of Parasitology, v. 44, n. 12, p. 853-857, 2014.

HATANAKA, H.; OGURA, K.; MORIYAMA, K.; ICHIKAWA, S.; YAHARA, I.; INAGAKI, F. Tertiary Structure of Destrin and Structural Similarity. **Cell**, v. 85, p. 1047-1055, 1996.

HAWKINS, M.; POPE, B.; MACIVER, S.K.; WEEDS, A. G. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. **Biochemistry** v. 32, p. 9985-9993, 1993.

HEASLIP, A. T.; NELSON, S. R.; WARSHAW, D. M. Dense granule trafficking in *Toxoplasma gondii* requires a unique class 27 myosin and actin filaments. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 13, p. 2080-2089, 2016.

HEINTZELMAN, M. B. Gliding motility in apicomplexan parasites. Seminars in Cell and Developmental Biology, v. 46, p. 135-142, 2015.

HEINTZELMAN, M. B.; SCHWARTZMAN, J. D. Myosin diversity in Apicomplexa. Journal of **Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 429-432, 2001.

HELFER, E.; NEVALAINEN, E. M.; NAUMANEN, P.; ROMERO, S.; DIDRY, D.; PANTALONI, D.; LAPPALAINEN, P.; CARLIER M. F. Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 6, p. 1184-1195, 2006.

HERM-GÖTZ, A.; WEISS, S, STRATMANN, R.; FUJITA-BECKER, S.; RUFF, C.; MEYHÖFER, E.; SOLDATI, T.; MANSTEIN, D. J.; GEEVES, M. A.; SOLDATI, D. *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. **The EMBO** Journal, v. 21, n. 9, p. 2149-2158, 2002.

HILD, G.; KALMÁR, L.; KARDOS, R.; NYITRAI, M.; BUGYI, B. The other side of the coin: functional and structural versatility of ADF/cofilins. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 5-6, p. 238-25, 2014.

HLISCS, M.; SATTLER, J. M.; TEMPEL, W.; ARTZ, J. D.; DONG, A.; HUI R.; MATUSCHEWSKI, K.; SCHÜLER, H. Structure and function of a G-actin sequestering protein with a vital role in malaria oocyst development inside the mosquito vector. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11572-11583, 2010.

HORCAJO, P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; HEMPHILL, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 12, p. 709-723, 2016.

ICHETOVKIN, I.; HAN, J.; PANG, K. M.; KNECHT, D. A.; CONDEELIS, J. S. Actin filaments are severed by both native and recombinant *Dictyostelium* cofilin but to different extents. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 45, n. 4, p. 293-306, 2000.

IROBI, E.; AGUDA A. H.; LARSSON, M.; GUERIN, C.; YIN, H. L.; BURTNICK, L. D.; BLANCHOIN, L.; ROBINSON, R. C. Structural basis of actin sequestration by thymosin-beta4: implications for WH2 proteins. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 18, p. 3599-3608, 2004.

JACOT, D.; TOSETTI, N.; PIRES, I.; STOCK, J.; GRAINDORGE, A.; HUNG, Y. F.; HAN, H.; TEWARI, R.; KURSULA, I.; SOLDATI-FAVRE, D. An apicomplexan actin-binding protein serves as a connector and lipid sensor to coordinate motility and invasion. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 6, p. 731-743, 2016.

JANSEN, S.; COLLINS, A.; GOLDEN, L.; SOKOLOVA, O.; GOODE, B. L. Structure and mechanism of mouse cyclase-associated protein (CAP1) in regulating actin dynamics. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30732-30742, 2014.

JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 631-636, 2002.

JEWETT, T. J.; SIBLEY, L. D. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. **Molecular Cell**, v. 11, n. 4, p. 885-894, 2003.

JOHNSON, T. M.; RAJFUR, Z.; JACOBSON, K.; BECKERS, C. J. Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 8, p. 3039-3046, 2007.

KANELLOS, G.; FRAME, M. C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. **Journal** of Cell Science, v. 129, n. 17, p. 3211-3218, 2016.

KAPOOR, P.; SHEN, X. Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 4, p. 238-246, 2014.

KERKHOFF, E. Cellular functions of the spir actin-nucleation factors. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 477-483, 2006.

KING, C. A. Cell motility of sporozoan protozoa. **Parasitology Today**, v. 4, n. 11, p. 315-319,1988.

KING, C. A. Cell surface interaction of the protozoan Gregarina with concanavalin A beads - implications for models of gregarine gliding. **Cell Biology International Reports**, v. 5, n. 3, p. 297-305, 1981.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

KLAMT, F.; ZDANOV, S.; LEVINE, R. L.; PARISER, A.; ZHANG, Y.; ZHANG, B.; YU, L. R.; VEENSTRA, T. D.; SHACTER, E. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. 1241-1246, 2009.

KLEMKE, M.; WABNITZ, G. H.; FUNKE, F.; FUNK, B.; KIRCHGESSNER, H.; SAMSTAG, Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 404-413, 2008.

KLUGER, R.; ALAGIC, A. Chemical cross-linking and protein-protein interactions-a review with illustrative protocols. **Bioorganic Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 451-472, 2004.

KOCH, M.; BAUM, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. **Cell Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 319-329, 2016.

KOUYAMA, T.; MIHASHI, K. Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. **European Journal of Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 33-38, 1981.

KÜBLER, E.; RIEZMAN, H. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 7, p. 2855-2862, 1993.

KÜHNI-BOGHENBOR, K.; MA, M.; LEMGRUBER, L.; CYRKLAFF, M.; FRISCHKNECHT, F.; GASCHEN, V.; STOFFEL, M.; BAUMGARTNER, M. Actin-mediated plasma membrane plasticity of the intracellular parasite *Theileria annulata*. **Cell Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1867-1879, 2012.

LAPPALAINEN, P. Actin-binding proteins: the long road to understanding the dynamic landscape of cellular actin networks. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 16, p. 2519-2522, 2016.

LAPPALAINEN, P.; FEDOROV, E. V.; FEDOROV, A. A.; ALMO, S. C.; DRUBIN, D. G. Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 18, p. 5520-5530, 1997.

LAPPALAINEN, P.; KESSELS, M. M.; COPE, M. J.; DRUBIN, D. G. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 8, p. 1951-1959, 1998.

LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M.W., SMITH, D. K., JONES, D.T., HUTCHINSON, E. G., MORRIS, A. L., NAYLOR, D., Moss, D., THORNTON, J. M. Manual Procheck v.3.0: programs to check the stereochemical quality of protein structures. Australia, 1994.

LAVALLIE, E. R.; DIBLASIO, E. A.; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; MCCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 2, p. 187-193, 1993.

LEE, S.; LEE, H. C.; KWON, Y. W.; LEE, S. E.; CHO, Y.; KIM, J.; LEE, S.; KIM, J. Y.; LEE, J.; YANG, H. M.; MOOK-JUNG, I.; NAM, K. Y.; CHUNG, J.; LAZAR, M. A.; KIM, H. S. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 484-497, 2014.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

MABUCHI I. An actin-depolymerizing protein (depactin) from starfish oocytes: properties and interaction with actin. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 5 Pt 1, p. 1612-1621, 1983.

MACIVER, S. K.; HUSSEY, P. J. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. **Genome Biology**, v. 3(5), p. 3007.1–3007.12, 2002.

MACIVER, S. K.; POPE, B. J.; WHYTOCK, S.; WEEDS, A. G. The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 2, p. 388-397, 1998.

MACIVER, S.K., AND WEEDS, A.G. Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion. **FEBS letters**, v.347, p. 251-256, 1994.

MACIVER, S.K., ZOT, H. G, AND POLLARD, T.D. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Cell Biology**, v.115, p. 1611-1620, 1991.

MacLEAN-FLETCHER, S. D.; POLLARD, T. D. Viscometric analysis of the gelation of *Acanthamoeba* extracts and purification of two gelation factors. **Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 414-428, 1980.

MAEKAWA, S.; NISHIDA, E.; OHTA, Y.; SAKAI, H. Isolation of low molecular weight actinbinding proteins from porcine brain. **The Journal of Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 377-385, 1984.

MAKKONEN, M.; BERTLING, E.; CHEBOTAREVA, N. A.; BAUM, J.; LAPPALAINEN, P. Mammalian and malaria parasite cyclase-associated proteins catalyze nucleotide exchange on G-actin through a conserved mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 2, p. 984-994, 2013.

MATSUDAIRA, P. Modular organization of actin crosslinking proteins. **Trends in Biochemistry Science**, v.16, n. 3, p. 87-92, 1991.

MATTILA, P. K.; QUINTERO-MONZON, O.; KUGLER, J.; MOSELEY, J. B.; ALMO, S. C.; LAPPALAINEN, P.; GOODE, B. L. A high-affinity interaction with ADP-actin monomers

underlies the mechanism and in vivo function of Srv2/cyclase-associated protein. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 11, p. 5158-5171, 2004.

MATUSCHEWSKI, K.; SCHÜLER, H. Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. **Subcellular Biochemistry**, v. 47, p. 110-120, 2008.

McALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A. & MCGUIRE, A. M. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v. 28, n. 9, p. 1473-1479, 1998.

McCANN, C. M.; McALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F.; SMITH, R. F.; CRIPPS, P. J.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J.; TREES, A. J. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **International Journal of Parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1631-1639, 2007.

McCULLOUGH, B. R.; GRINTSEVICH, E. E.; CHEN, C. K.; KANG, H.; HUTCHISON, A. L.; HENN, A.; CAO, W.; SUAREZ, C.; MARTIEL, J. L.; BLANCHOIN, L.; REISLER, E.; DE LA CRUZ, E. M. Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 1, p. 151-159, 2011.

McGOUGH, A.; POPE, B.; CHIU, W.; WEEDS, A. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. **Journal of Cell Biology**, v. 138, n. 4, p. 771-781, 1997.

MEBERG, P. J.; ONO, S.; MINAMIDE, L. S.; TAKAHASHI, M.; BAMBURG, J. R. Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 39, n. 2, p. 172-190, 1998.

MEHTA, S.; SIBLEY, L. D. Actin depolymerizing factor controls actin turnover and gliding motility in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 8, p. 1290-1299, 2011.

MEHTA, S.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* actin depolymerizing factor acts primarily to sequester G-actin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6835-6847, 2010.

MEISSNER, M.; FERGUSON, D. J.; FRISCHKNECHT, F. Invasion factors of apicomplexan parasites: essential or redundant? **Current Opinion Microbiology**, v.16, n. 4, p. 438-444, 2013.

MEISSNER, M.; SCHLÜTER, D.; SOLDATI, D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 837-840, 2002.

MOON, A. L.; JANMEY, P. A.; LOUI, K. A.; DRUBIN, D. G. Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. **Journal of Cell Biology**, v. 120, n. 2, p. 421-435, 1993.

MORIYAMA, K.; YAHARA, I. Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. Pt 8, 2002.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology** and **Molecular Biology Review**, v. 66, n. 1, p. 21-38, 2002.

MOSELEY, J. B.; OKADA, K.; BALCER, H. I.; KOVAR, D. R.; POLLARD, T. D.; GOODE, B. L. Twinfilin is an actin-filament-severing protein and promotes rapid turnover of actin structures *in vivo*. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. Pt 8, p. 1547-1557, 2006.

MUHLRAD, A.; PAVLOV, D.; PEYSER, Y. M.; REISLER, E. Inorganic phosphate regulates the binding of cofilin to actin filaments. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p. 1488-1496, 2006.

NADEAU, O. W.; CARLSON, G. M. Protein interactions captured by chemical cross-linking: one-step cross-linking with formaldehyde. **Cold Spring Harbor Protocols**, pdb.prot4634, 2007.

NEBL, T.; PRIETO, J. H.; KAPP, E.; SMITH, B. J.; WILLIAMS, M. J.; YATES, J. R 3RD.; COWMAN, A. F.; TONKIN, C. J. Quantitative in vivo analyses reveal calcium-dependent phosphorylation sites and identifies a novel component of the *Toxoplasma* invasion motor complex. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002222, 2011.

NEIDL, C.; ENGEL, J. Exchange of ADP, ATP and 1: N6-ethenoadenosine 5'-triphosphate at G-actin. Equilibrium and kinetics. **European Journal of Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 163-169, 1979.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS H.B. JR.; AND DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW.NEWS**, v. 4:14, 1997.

NISHIDA, Y.; SHIMA, F.; SEN, H.; TANAKA, Y.; YANAGIHARA, C.; YAMAWAKI-KATAOKA, Y.; KARIYA, K.; KATAOKA, T. Coiled-coil interaction of N-terminal 36 residues of cyclaseassociated protein with adenylyl cyclase is sufficient for its function in *Saccharomyces cerevisiae* ras pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 43, p. 28019-28024, 1998.

NOEGEL, A. A.; RIVERO, F.; ALBRECHT, R.; JANSSEN, K. P.; KÖHLER, J.; PARENT, C. A.; SCHLEICHER, M. Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. Pt19, p. 3195-3203, 1999.

NOMURA, K.; HAYAKAWA, K.; TATSUMI, H.; ONO, S. Actin-interacting protein 1 promotes disassembly of actin-depolymerizing factor/cofilin-bound actin filaments in a ph-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5146-5156, 2016.

NOMURA, K.; ONO, S. ATP-dependent regulation of actin monomer-filament equilibrium by cyclase-associated protein and ADF/cofilin. **Biochemical Journal**, v. 453, n. 2, p. 249-259, 2013.

NONOMURA. Y.; KATAYAMA. E.; EBASHI. S. Effect of phosphates on the structure of the actin filament. **Journal of Biochemistry**, v. 78, n. 5, 1101-1104, 1975.

ODA, T.; AIHARA, T.; WAKABAYASHI, K. Early nucleation events in the polymerization of actin, probed by time-resolved small-angle x-ray scattering. **Science Report**, v. 24, p. 6:34539, 2016.

ONO S. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. **International Review of Cytology**, v. 258, p. 1-82, 2007.

ONO, S. The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics - more than a monomer-sequestration factor. **Journal of Cell Science**, v.126(Pt 15), p.3249-58, 2013.

OPITZ, C.; SOLDATI, D. "The glideosome": a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 597-604, 2002.

OUELLET, F.; CARPENTIER, E.; COPE, M. J.; MONROY, A. F.; SARHAN F. Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 360-368, 2001.

PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. **Protein Expression Purification**, v. 94, p. 22-32, 2014.

PARÉ, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle associated calfhood mortality. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 60, p. 133-139, 1996.

PAUL, A. S.; POLLARD, T. D. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 66, n. 8, p. 606-617, 2009.

PAUNOLA, E.; MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. **FEBS Letters**, v. 513, n. 1, p. 92-97, 2002.

PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P. **Plasmídeo de ligação e expressão e seu processo de produção**. Patente: Privilégio de Inovação. BR1020130201162. 07 ago 2013. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

PERIZ, J.; WHITELAW, J.; HARDING, C.; LEMGRUBER, L.; GRAS, S.; REIMER, M.; INSALL, R.; MEISSNER, M. *Toxoplasma gondii* establishes an extensive filamentous network consisting of stable F-actin during replication. **bioRxiv** 066522.

PESSOA, G. A.; MARTINI, A. P.; TRENTIN, J. M.; DALCIN, V. C.; LEONARDI, C. E.; VOGEL, F. S.; DE SÁ FILHO, M. F.; RUBIN, M. I.; SILVA, C. A. Impact of spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 519-527, 2016.

PETERSEN, T. N.; von HEIJNE, S. B. G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.

PFANNSTIEL, J.; CYRKLAFF, M.; HABERMANN, A.; STOEVA, S.; GRIFFITHS, G.; SHOEMAN, R.; FAULSTICH, H. Human cofilin forms oligomers exhibiting actin bundling activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 49476-49484.

PIAGENTINI, M.; MOYA-ARAUJO, C. F.; PRESTES, N. C.; SARTOR, I. F. *Neospora caninum* infection dynamics in dairy cattle. **Parasitology Ressearch**, v. 111, n. 2, p. 717-721, 2012.

PIZARRO-CERDÁ, J.; CHOREV, D. S.; GEIGER, B.; COSSART, P. The diverse family of Arp2/3 complexes. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 93-100, 2017.

PLATTNER, F.; SOLDATI-FAVRE, D. hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 471-487, 2008.

POLLARD, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 8, n. 8, pii: a018226, 2016.

POLLARD, T. D. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. **Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 6 Pt 2, p. 2747-2754, 1986.

POLLARD, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 36, p. 451-477, 2007.
POLLARD, T. D.; BLANCHOIN, L.; MULLINS, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 29, p. 545-576, 2000.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-465, 2003.

POLLO-OLIVEIRA, L.; POST, H.; ACENCIO, M. L.; LEMKE, N.; VAN DEN TOORN, H.; TRAGANTE, V.; HECK, A. J.; ALTELAAR, A. F.; YATSUDA, A. P. Unravelling the *Neospora caninum* secretome through the secreted fraction (ESA) and quantification of the discharged tachyzoite using high-resolution mass spectrometry-based proteomics. **Parasitology and Vectors**, v. 6, n. 1, v. 335, 2013.

POPE, B. J.; GONSIOR, S. M.; YEOH, S.; McGOUGH, A.; WEEDS, A. G. Uncoupling actin filament fragmentation by cofilin from increased subunit turnover. **Journal of Molecular Biology**, v. 298, n. 4, p. 649-661, 2000.

POUKKULA, M.; KREMNEVA, E.; SERLACHIUS, M.; LAPPALAINEN, P. Actindepolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. **Cytoskeleton**, v. 68, p. 471-490, 2011.

POUPEL, O.; TARDIEUX, I. *Toxoplasma gondii* motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 9, p. 653-662, 1999.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNELL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, A.; SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. D290-301, 2012.

QUINTERO-MONZON, O.; JONASSON, E. M.; BERTLING, E.; TALARICO, L.; CHAUDHRY, F.; SIHVO, M.; LAPPALAINEN, P.; GOODE BL. Reconstitution and dissection of the 600-kDa Srv2/CAP complex: roles for oligomerization and cofilin-actin binding in driving actin turnover. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 16, p. 10923-10934, 2009.

QUIRK, S.; MACIVER, S. K.; AMPE, C.; DOBERSTEIN, S. K.; KAISER, D. A.; DAMME, J. V.; VANDEKERCKHOVE, J. S.; POLLARD, T. D. Primary structure of and studies on *Acanthamoeba* actophorin. **Biochemistry**, v. 32, p. 8525-8533, 1993.

RAO, J. N.; MADASU, Y.; DOMINGUEZ, R. Mechanism of actin filament pointed-end capping by tropomodulin. **Science**, v. 345, n. 6195, p. 463-467, 2014.

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L. F.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal of Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

REICHEL, M. P.; MCALLISTER, M. M.; POMROY, W. E.; CAMPERO, C.; ORTEGA-MORA, L. M.; ELLIS, J. T. Control options for *Neospora caninum*-is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1455-1470, 2014.

REID, A. J.; VERMONT, S. J.; COTTON, J. A.; HARRIS, D.; HILL-CAWTHORNE, G. A.; KÖNEN-WAISMAN, S.; LATHAM, S. M.; MOURIER, T.; NORTON R.; QUAIL, M. A.; SANDERS, M.; SHANMUGAM, D.; SOHAL, A.; WASMUTH, J. D.; BRUNK, B.; GRIGG, M. E.; HOWARD, J. C.; PARKINSON, J.; ROOS, D. S.; TREES, A. J.; BERRIMAN, M.; PAIN, A.; WASTLING, J. M. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002567, 2012.

REZENDE-GONDIM, M. M.; DA SILVA, A. V.; SCHARES, G.; GONDIM, L. F. In contrast to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* tachyzoites did not sustain multiplication in vitro at increased incubation temperatures. **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 19-24, 2017.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42 (Web Server issue), p. W302-304, 2014.

RUSSELL, D. G.; SINDEN, R. E. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. **Journal of Cell Science**, v. 50, n. 1, p. 345-359, 1981.

SAHOO, N.; BEATTY, W.; HEUSER, J.; SEPT, D. & SIBLEY, L. D. unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 2, p. 895-906, 2006.

SANTOS, J. M.; GRAINDORGE, A., SOLDATI-FAVRE, D. New insights into parasite rhomboid proteases. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 182, p. 27-36, 2012.

SCHLIWA, M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. **The Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 1, p. 79-91, 1982.

SCHMITZ, S.; GRAINGER, M.; HOWELL, S.; CALDER, L. J.; GAEB, M.; PINDER, J. C.; HOLDER, A. A. & VEIGEL, C. Malaria parasite actin filaments are very short. **Journal of Molecular Biology**, v. 349, n. 1, p. 113-125, 2005.

SCHÜLER, H.; MATUSCHEWSKI, K. Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. **Traffic**, v. 7, n. 11, p. 1433-1439, 2006.

SCHÜLER, H.; MUELLER, A. K.; MATUSCHEWSKI, K. A *Plasmodium* actin-depolymerizing factor that binds exclusively to actin monomers. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 9, p. 4013-4023, 2005a.

SCHÜLER, H.; MUELLER, A. K.; MATUSCHEWSKI, K. Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. **FEBS** Letters, v. 579, n. 3, p. 655-660, 2005b.

SEPT, D.; ELCOCK, A. H.; MCCAMMON, J. A. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1181-1189, 1999.

SEPT, D.; MCCAMMON, J. A. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. **Biophysics Journal**, v. 81, n. 2, p. 667-674, 2001.

SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, p. 2507-2524, 2006.

SIBLEY, L. D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 592-298, 2010.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.

SINGH, B. K.; SATTLER, J. M.; CHATTERJEE, M.; HUTTU, J.; SCHULER, H.; KURSULA, I. Crystal structures explain functional differences in the two actin depolymerization factors of the malaria parasite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 32, p. 28256-28264, 2011.

SKILLMAN, K. M.; DAHER W.; MA, C. I.; SOLDATI-FAVRE, D.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* profilin acts primarily to sequester G-actin while formins efficiently nucleate actin filament formation *in vitro*. **Biochemistry**, v. 51, n.12, p. 2486-95, 2012.

SKILLMAN, K. M.; DIRAVIYAM, K.; KHAN, A.; TANG, K.; SEPT, D.; SIBLEY, L. D. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in Apicomplexan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 7, e1002280, 2011.

SKILLMAN, K. M.; MA, C. I.; FREMONT, D. H.; DIRAVIYAM, K.; COOPER, J. A.; SEPT, D.; SIBLEY, L. D. The unusual dynamics of parasite actin result from isodesmic polymerization. **Nature Communications**, v. 4, p. 2285, 2013.

SMYTHE, W. A.; JOINER, K. A.; HOPPE, H. C. Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 452-464, 2008.

SOLDATI, D.; MEISSNER, M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 32-40, 2004.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; MCALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.

SRINIVASA, S.; DING, X.; KAST, J. Formaldehyde cross-linking and structural proteomics: bridging the gap. **Methods**, v. 89, p. 91-98, 2015.

SUAREZ, C.; ROLAND, J.; BOUJEMAA-PATERSKI, R.; KANG, H.; MCCULLOUGH, B. R.; REYMANN, A. C.; GUÉRIN, C.; MARTIEL, J. L.; DE LA CRUZ, E. M.; BLANCHOIN, L. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. **Current Biology**, v. 21, n. 10, p. 862-868, 2011.

TAMMANA, T. V. S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; MITRA, K.; BAJPAI, V. K.; BUPTA, C. M. Actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin, is essentially required in assembly of *Leishmania flagellum*. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 837-852, 2008.

TANAKA, K.; NISHIO, R.; HANEDA, K.; ABE, H. Functional involvement of Xenopus homologue of ADF/cofilin phosphatase, slingshot (XSSH), in the gastrulation movement. **Zoological Science**, v. 22, n. 9, p. 955-969, 2005.

TARDIEUX, I.; BAUM, J. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. **Journal of Cell Biology**, v. 214, n. 5, p. 507-515, 2016.

THOMAS, J. G.; BANEYX, F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 19, p. 11141-11147, 1996.

TILNEY, L. G. The role of actin in nonmuscle cell motility. **Society of General Physiologists** series, v. 30, p. 339-388, 1975.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2005.

TREES, A.; DAVISON, H.; INNES, E. & WASTLING, J. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1195-1200, 1999.

VAHOKOSKI, J.; BHARGAV, S. P.; DESFOSSES, A.; ANDREADAKI, M.; KUMPULA, E. P.; MARTINEZ, S. M.; IGNATEV, A.; LEPPER, S.; FRISCHKNECHT, F.; SIDÉN-KIAMOS, I.; SACHSE, C.; KURSULA, I. Structural differences explain diverse functions of *Plasmodium* actins. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. e1004091, 2014. VANDERBERG, J. P. Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. **The Journal of Protozoology**, v. 21, n. 4, p. 527-537, 1974.

WANG, J.; SUZUKI, N.; KATAOKA, T. The 70-kilodalton adenylyl cyclase-associated protein is not essential for interaction of Saccharomyces cerevisiae adenylyl cyclase with RAS proteins. **Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 4937-4945, 1992.

WANG, K.; ASH, J. F.; SINGER, S. J. Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. **PNAS**, v. 72, n. 11, p. 4483-4486, 1975.

WEGNER, A. Head to tail polymerization of actin. **Journal of Molecular Biology**, v. 108, n. 1, p. 139-150, 1976.

WEGNER, A.; ENGEL, J. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. **Biophysical Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 215-225, 1975.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, n. 2-3, p. 136-144, 2012.

WETZEL, D. M.; SCHMIDT, J.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; DUBEY, J. P. & SIBLEY, L. D. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5379-5387, 2005.

WETZEL, D.; HÅKANSSON, S.; HU, K.; ROOS, D. & SIBLEY, L. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 2, p. 396-406, 2003.

WHITELAW, J. A.; LATORRE-BARRAGAN, F.; GRAS, S.; PALL, G. S.; LEUNG, J. M.; HEASLIP, A.; EGARTER, S.; ANDENMATTEN, N.; NELSON, S. R.; WARSHAW, D. M.; WARD, G. E.; MEISSNER, M. Surface attachment, promoted by the actomyosin system of *Toxoplasma gondii* is important for efficient gliding motility and invasion. **BMC Biolog**, v. 15, n. 1, p. 1, 2017.

WINDER, S. J.; AYSCOUGH, K. R. Actin-binding proteins. Journal of Cell Science, v. 118, n. Pt 4, p. 651-654, 2005.

WONG, W.; SKAU, C. T.; MARAPANA, D. S.; HANSSEN, E.; TAYLOR, N. L.; RIGLAR, D. T.; ZUCCALA, E. S.; ANGRISANO, F.; LEWIS, H.; CATIMEL, B.; CLARKE, O. B.; KERSHAW, N. J.; PERUGINI, M. A.; KOVAR, D. R.; GULBIS, J. M.; BAUM, J. Minimal requirements for actin filament disassembly revealed by structural analysis of malaria parasite actin-depolymerizing factor 1. **PNAS**, v. 108, n. 24, p. 9869-9874, 2011.

WONG, W.; WEBB, A. I.; OLSHINA, M. A.; INFUSINI, G.; TAN, Y. H.; HANSSEN, E.; CATIMEL, B.; SUAREZ, C.; CONDRON, M.; ANGRISANO, F.; NEBI, T.; KOVAR, D. R.; BAUM, J. A mechanism for actin filament severing by malaria parasite actin depolymerizing factor 1 via a low affinity binding interface. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 7, p. 4043-4054, 2014.

XIA, D.; SANDERSON, S. J.; JONES, A. R.; PRIETO, J. H.; YATES, J. R.; BROMLEY, E.; TOMLEY, F. M.; LAL, K.; SINDEN, R. E.; BRUNK, B. P.; ROOS, D. S.; WASTLING, J. M. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, p. R116, 2008.

XU, D.; ZHANG, Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. **Biophysical Journal**, v. 101, p. 2525-2534, 2011.

XU, J. H.; QIN, Z. H.; LIAO, Y. S.; XIE, M. Q.; LI, A. X.; CAI, J. P. Characterization and expression of an actin-depolymerizing factor from *Eimeria tenella*. **Parasitology Research**, v. 103, p. 263-270, 2008.

XUE, B.; ROBINSON, R. C. Guardians of the actin monomer. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 10-11, p. 316-332, 2013.

YADAV, R.; PATHAK, P. P.; SHUKLA, V. K.; JAIN, A.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, S.; KRISHNA PULAVARTI, S. V.; MEHTA, S.; SIBLEY, L. D.; ARORA, A. Solution structure and dynamics of ADF from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Structural Biology**, v. 176, n. 1, p. 97-111, 2011.

YAMASHITA, A.; MAEDA, K.; MAÉDA, Y. Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. **EMBO Journal**, v. 22, n. 7, p. 1529-1538, 2003.

YONEZAWA, N.; NISHIDA, E.; SAKAI, H. pH control of actin polymerization by cofilin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 27, p. 14410-14412, 1985.

YU, F. X.; LIN, S. C.; MORRISON-BOGORAD, M.; ATKINSON, M. A.; YIN, H. L. Thymosin beta-10 and thymosin beta-4 are both actin monomer sequestering proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 1, p. 502-509, 1993.

YUSOF, A. M.; HU. N. J.; WLODAWER, A.; HOFMANN, A. Structural evidence for variable oligomerization of the N-terminal domain of cyclase-associated protein (CAP). **Proteins**, v. 58, n. 2, p. 255-262, 2005.

ZHAO H.; HAKALA M.; LAPPALAINEN P. ADF/cofilin binds phosphoinositides in a multivalent manner to act as a PIP(2)-density sensor. **Biophysics Journal**, v. 98, n. 10, p. 2327-2336, 2010.

ZHOU, X.; ZHANG, H.; LI, G.; SHAW, B.; XU, J. R. The Cyclase-associated protein Cap1 is important for proper regulation of infection-related morphogenesis in Magnaporthe oryzae. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002911, 2012.



APÊNDICES

Apêndice A. Tampões e soluções utilizados em metodologias de manipulação de material genético.

| | Tampão/solução | Composição | Material e Métodos* |
|---|---------------------------|--|--|
| 1 | Solução A | Tris-HCI 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM | - <u>3.4.9.2</u> (Extração sem kit comercial) |
| 2 | Tampão de lise | NaOH 200 mM e SDS 1% | - <u>3.4.9.2</u> (Extração sem kit comercial) |
| 3 | Solução K | CH₃COOK 5 M pH 5,5 | - <u>3.4.9.2</u> (Extração sem kit comercial) |
| 4 | Tampão TAE | Tris acetato 0,04 M; EDTA 1 mM pH 8,3 | - <u>3.4.10</u> (Eletroforese em gel de agarose) |
| 5 | Tampão Tris-HCl 100 mM | NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-Cl 100 mM | - <u>3.4.14.1.1</u> (Extração total) |
| 6 | Tampão de ligação | NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 40 mM | - <u>3.4.14.1.1</u> (Extração total) - <u>3.4.15.2.1</u> (Após verificação de solubilidade das proteínas recombinantes) |

*Item onde o tampão/solução é citado em Material e Métodos.

| | Tampão/solução | Composição | Material e Métodos* |
|----|------------------------------|--|--|
| 1 | Tampão Tris-HCl 100 mM | NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-Cl 100 mM | - <u>3.4.14.1.1</u> (Extração total) |
| 2 | Tampão de ligação | NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 40 mM | - <u>3.4.14.1.1</u> (Extração total) - <u>3.4.15.2.1</u> (Após verificação de solubilidade das proteínas recombinantes) |
| 3 | Ureia 8 M | NaH ₂ PO ₄ 100 mM; Tris 100 mM; ureia 8 M; pH 8,0 | - <u>3.4.14.1.1</u> (Extração total) |
| 4 | Tampão de solubilização 1 | NaH₂PO₄ 100 mM; NaCl 0,5 M | - <u>3.4.14.1.2.1</u> (Extração total) - <u>3.4.14.1.2.2</u> (Teste de solubilização em presença de etanol) |
| 5 | Tampão de solubilização 2 | Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; glicerol 10%; Triton X-100 0,1%; imidazol 20 mM; PMSF 1mM; benzoamidina 1 mM. | - <u>3.4.14.1.2.1</u> (Extração total) |
| 6 | Tampão P | Tris 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; glicerol 10%; Triton X-100 0,1%; imidazol 20 mM; PMSF 1mM; benzoamidina 1 mM. (ou cOmplete <i>mini protease</i> <i>inhibitor</i> , Roche, como inibidor de protease) | - <u>3.4.14.1.2.1</u> (Extração total) |
| 7 | Tampão de eluição | NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM | - <u>3.4.15.2.1</u> (Após verificação de solubilidade das proteínas recombinantes) |
| 8 | Tampão de lavagem | Tris 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM; glycerol 10%; Triton X-100 0,1%; Imidazol 50 mM | - <u>3.4.15.2.2</u> (Purificação de NcADF solúvel) |
| 9 | Tampão de eluição 2 | Tris 50 mM pH 7.0; NaCl 300 mM; glycerol 10 %; Triton X- 100 0.1 %; Imidazol 250 mM | - <u>3.4.15.2.2</u> (Purificação de NcADF solúvel) |
| 10 | Tampão de corrida | <i>Tris</i> 25 mM; <i>Glicina</i> 192 mM; <i>SDS</i> 0,1% | - <u>3.5.1</u> (Desnaturante – SDS-PAGE) |

Apêndice B. Tampões e soluções utilizados em metodologias de manipulação de proteínas.

| 11 | Tampão Laemmli 4X | Tris pH 6,8 250 mM; 10% SDS; 0,008% azul de bromofenol; 40% glicerol; 400 mM DTT | - <u>3.5.1</u> (Desnaturante – SDS-PAGE) |
|----|------------------------------|---|--|
| 12 | Coomassie G-250 | Azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich); 0,1%; (NH ₄) ₂ SO ₄ 17%; H ₃ PO ₄ 3%; metanol 34% | - <u>3.5.1</u> (Desnaturante – SDS-PAGE) |
| 13 | Tampão de fixação | H ₃ PO ₄ 3%; etanol 50% | - <u>3.5.1</u> (Desnaturante – SDS-PAGE) |
| 14 | Coomassie R-250 | Azul de Coomassie R-250 (BioRad), 0,1%; metanol 40%; ácido acético 10% | - <u>3.5.1</u> (Desnaturante – SDS-PAGE) |
| 15 | Solução de descoloração | CH ₃ COOH 10%; metanol 5% | - <u>3.5.1</u> (Desnaturante – SDS-PAGE) |
| 16 | Tampão de amostra | ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 4% | - <u>3.6</u> (Extratos totais de <i>N. caninum</i> e células Vero) - <u>3.9</u> (<i>Dot blot</i>) |
| 17 | Tampão de reidratação | Ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 4%; traços de azul de bromofenol; inibidor de protetase cOmplete mini, Roche | - <u>3.5.3.2</u> (Primeira dimensão ou focalização isoelétrica) |
| 18 | Tampão de equilíbrio | Tris 50 mM, ureia 6 M, glicerol 30 <mark>%</mark> e SDS 2 % | - <u>3.5.3.1</u> (Primeira dimensão ou focalização isoelétrica) |
| 19 | Tampão de selamento | Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 1%; agarose 0,5% e traços de azul de bromofenol | - <u>3.5.3.1</u> (Primeira dimensão ou focalização isoelétrica) - <u>3.12.10.2</u> (Gel bidimensional de ensaio de interação) |
| 20 | Tampão de transferência | Tris 0,25 M; glicina 0,2 M; SDS 0,001%; metanol 15% | - <u>3.8</u> (Western blot) |
| 21 | Solução de DB71 | <i>Direct Blue</i> 71 Aldrich 0,08% em 40% de metanol e 10% de ácido acético | - <u>3.8</u> (Western blot) |
| 22 | Solução de descoloração 2 | NaHCO ₃ 0,15 M; etanol 50% | - <u>3.8</u> (Western blot) |
| 23 | PBS-T | 0,5% de Tween-20, em PBS | - <u>3.8</u> (<i>Western blot</i>) - <u>3.10.1</u> (ELISA sobre células íntegras) |

| 24 | PBS-GT | gelatina suína, Sigma-Aldrich, 0,8% em PBS-T | - <u>3.8</u> (Western blot) |
|----|-----------------------------------|---|---|
| 25 | Tampão de ligação sem imidazol | 20 mM NaH2PO4; 0,5 M NaCl | - <u>3.9</u> (Dot blot) |
| 26 | Tampão de sensibilização | Na ₂ CO ₃ 0,06 M | - <u>3.10.1</u> (ELISA sobre células íntegras) |
| 27 | PBS-GT _E | Tween-20 0,5%; gelatina suína 0,5%, em PBS | - <u>3.10.1</u> (ELISA sobre células íntegras) |
| 28 | Solução de permeabilização | 0,2% de Triton-X-100, em PBS | - <u>3.11</u> (Imunofluorescência) |
| 29 | BSA-Glicina 10X | BSA (Sigma-Aldrich) 2%; glicina 2 mM, em PBS | - <u>3.11</u> (Imunofluorescência) |
| 30 | BSA-Glicina | BSA 0,2%; glicina 2 mM, em PBS | - <u>3.11</u> (Imunofluorescência) |
| 31 | Solução de NH₄HCO₃ | NH₄HCO₃ 25 mM pH 8,0 | - <u>3.12.2.1</u> (Descoloração de bandas) |
| 32 | Solução de extração | TFA 0,1%; ACN 50% | - <u>3.12.2.2</u> (Digestão com tripsina) |
| 33 | Tampão de armazenamento | Tris pH 7,0 20 mM; NaCl 30 mM; glicerol 5%; DTT 0,5 mM; NaN₃ 0,5 mM; PMSF 1 mM; benzoamidina 1mM | - <u>3.12.5</u> (Preparação de actina e NcADF) |

*Item onde o tampão/solução é citado em Material e Métodos.

| | Tampão/solução | Composição | Material e Métodos* |
|---|---------------------------|---|---|
| 1 | Tampão-G | Tris pH 8,0 5 mM; CaCl₂ 0,2 mM; ATP 0,2 mM; DTT 0,5 mM | - <u>3.12.6</u> (Ensaio de cossedimentação) - <u>3.12.7.2</u> (Despolimerização) - <u>3.12.9</u> (Estado estacionário) |
| 2 | Tampão-F 10X | KCI 500 mM; MgCl₂ 20 mM; ATP 1 mM | - <u>3.12.6</u> (Ensaio de cossedimentação) |
| 3 | Tampão de sedimentação | MgCl ₂ 2 mM; KCl 50 mM; ATP 0,2 mM; tamponamento com Tris pH 8,0 20 mM ou HEPES pH 6,5 20 mM | - <u>3.12.6</u> (Ensaio de cossedimentação) |
| 4 | ME 10X | MgCl₂ 500 mM; EGTA 2 mM | - <u>3.12.7.1</u> (Polimerização) |
| 5 | KMEI 10X | KCI 500 mM; MgCl₂ 10 mM; EGTA 10 mM; Imidazol pH 7,0 | - <u>3.12.7.1</u> (Polimerização) - <u>3.12.7.2</u> (Despolimerização) - <u>3.12.9</u> (Estado estacionário) |
| 6 | KMET 10X | KCI 500 mM; MgCl₂ 10 mM; EGTA 10 mM; Tris pH 8.0 100 mM | - <u>3.12.8</u> (Ensaio de queda de bola – Viscosimetria) |
| 7 | Tampão-G-Mg | Tris pH 8,0 5 mM; MgCl₂ 0,2 mM; ATP 0,2 mM; DTT 0,5 mM | - <u>3.12.10.1</u> (Gel nativo) - <u>3.12.10.2</u> (Gel bidimensional) |
| 8 | Tampão de interação | HEPES 50 mM, pH 8,2; NaCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; ATP 0,2 mM | - <u>3.12.10.3.1</u> (Formaldeído) - <u>3.12.10.3.2</u> (EDC) |

Apêndice C. Tampões e soluções utilizados em metodologias de caracterização bioquímica de NcADF.

*Item onde o tampão/solução é citado em Material e Métodos.

Apêndice D. Meios de cultura.

| | Meio de cultura | Composição | Material e Métodos* |
|---|--|---|--|
| 1 | Meio YNZ+ | NZ amina 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,5%; MgCl ₂ 12 mM; MgSO ₄ 12 mM; glucose 20 mM | - <u>3.4.13.1.1</u> (Transformação por eletroporação) |
| 2 | Meio LB (Luria- Bertani) | Triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,0 | <u>3.4.13.1</u> (Preparo de células eletrocompetentes) <u>3.4.14.1</u> (Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> BL21(DE3)) <u>3.4.14.1.2</u> (Testes de expressão e solubilidade de NcADF) |
| 3 | LB ágar | Triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; ágar 15 g/l; pH 7,0 | - <u>3.4.13.2.1</u> (Transformação química) |
| 4 | Meio TB (<i>Terrific</i> <i>Both</i>) | Triptona12 g/l; extrato de levedura 24 g/l; glicerol 4 ml/l; KH ₂ PO ₄ 0,17 M; K ₂ HPO ₄ 0,72 M | <u>3.4.14.1.2</u> (Testes de expressão e solubilidade de NcADF) <u>3.4.14.1.2.2</u> (Testes de expressão em presença de etanol) |
| 5 | Meio 2 X TY (<i>Triptone-Yeast</i> <i>extract</i>) | Triptona 16 g/l; extrato de levedura com 10 g/l; NaCl 5g/l; pH 7,0 | - <u>3.4.14.1.2</u> (Testes de expressão e solubilidade de NcADF) |

*Item onde o meio de cultura é citado em Material e Métodos.

Apêndice E. **Equações obtidas a partir dos resultados de estado estacionário.** As equações foram obtidas a partir das linhas de tendência plotadas ns gráficos da figura 42, A e B.

| Figura | Amostra | Equação |
|--------|--|-------------------------|
| | PI-actina (○): | y = 91,677 x - 4,463 |
| | PI-actina com tampão de estocagem (●): | y = 87,146 x - 2,6125 |
| | PI-actina com NcADF 1µM (▲): | y = 75,251 x - 8,086 |
| 42 A | PI-actina com NcADF 2 μM (Δ): | y = 68,955 x - 8,2145 |
| | PI-actina com NcADF 4 µM (◊): | y = 64,924 x - 23,002 |
| | Linha de fluorescência basal (): | y = 17,75364 |
| | | |
| | PI-actina monomérica (●): | y = 7,71176 x + 41,472 |
| 42 B | PI-actina com NcADF (Δ): | y = 85,814 x - 7,71176 |
| | PI-actina sem NcADF (○): | y = 89,75 x + 13,687 |
| | | |

Apêndice F. Alinhamento de sequências proteicas de proteínas associadas a ciclase (CAP) de organismos apicomplexas e estrutura secundária de CAP de *Cryptosporidium parvum*. Sequências alinhadas utilizando o método ClustalW. Alinhamento de estrutura secundária relizado em ESPript. As sequências alinhadas, pela ordem, são: CAP de *Eimeria tenella* (EtCAP, acesso NCBI: CDJ399095); CAP de *Plasmodium falciparum* (PfCAP, XP001350984); CAP de *Toxoplasma gondii* (TgCAP, XP002364249); CAP de *C. parvum* (CpCAP, acesso PDB: 2B0R); CAP de *Neospora caninum* (NcCAP, acesso ToxoDB: NCLIV_054140). Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos destacados em cinza representam similaridade. Os valores de identidade e similaridade das sequências com relação a NcCAP estão mostrados em seguida do alinhamento. Cp = estrutura secundária de CAP de *C. parvum*. Setas representam folhas-beta. Sublinhadas, sequência de 17 aminoácios de NcCAP antes da metionina.



Apêndice G. **Imunolocalização de actina de Neospora caninum (NcAct) em taquizoítas de Neospora caninum.** Microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* purificados, imobilizados e marcados com anticorpo anti-β-actina C4 diluído 1:200; visualização com Alexa Fluor 488. Escala indicando 5 μm.



* anti-β-actina C4 1:200



ANEXOS

Anexo 1. Cerificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1898.53.5), intitulado "Identificação e Caracterização de Proteínas que se Ligam à Actina (ABPs) no Apicomplexa *Neospora caninum*", de autoria de Luciana Baroni e de Ana Patrícia Yatsuda Natsui, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06. 05.2013.

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1898.53.5), entitled: "Identificação e Caracterização de Proteínas que se Ligam à Actina (ABPs) no Apicomplexa *Neospora caninum*", by **Luciana Baroni** and **Ana Patrícia Yatsuda Natsui,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, May, 6 2013.

Ribeirão Preto, 13 de maio de 2013.

Presidente da CEUA Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretaria da CEUA Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 - CEP 14040-900 - Ribeirão Preto - São Paulo Fone: (16) 3602 4469 - Fax: (16) 3633 7964