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 maquinaria 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-NcAct$_{201-310}$). 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 pI 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 coelho. Ensaios de cossedimentação, cinética de polimerização e 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 pI 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-NcAct$_{201-310}$ 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 phylum-specific 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 actin-binding proteins (ABPs) to strictly regulate actin dynamics and to form and maintain F-actin 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-NcAct$_{201\text{-}310}$) 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 (pI). 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 pI 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-NcAct$_{201\text{-}310}$ 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-NcAct$_{201-310}$). 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 F-*loop* 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 policlonales 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 (pI) 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 policlonales 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 pI 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 policlonales anti-NcAct$_{201-310}$ 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.

INTRODUÇÃO

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; DIJKSTRA et al., 2002, LINDSAY et al., 1999).

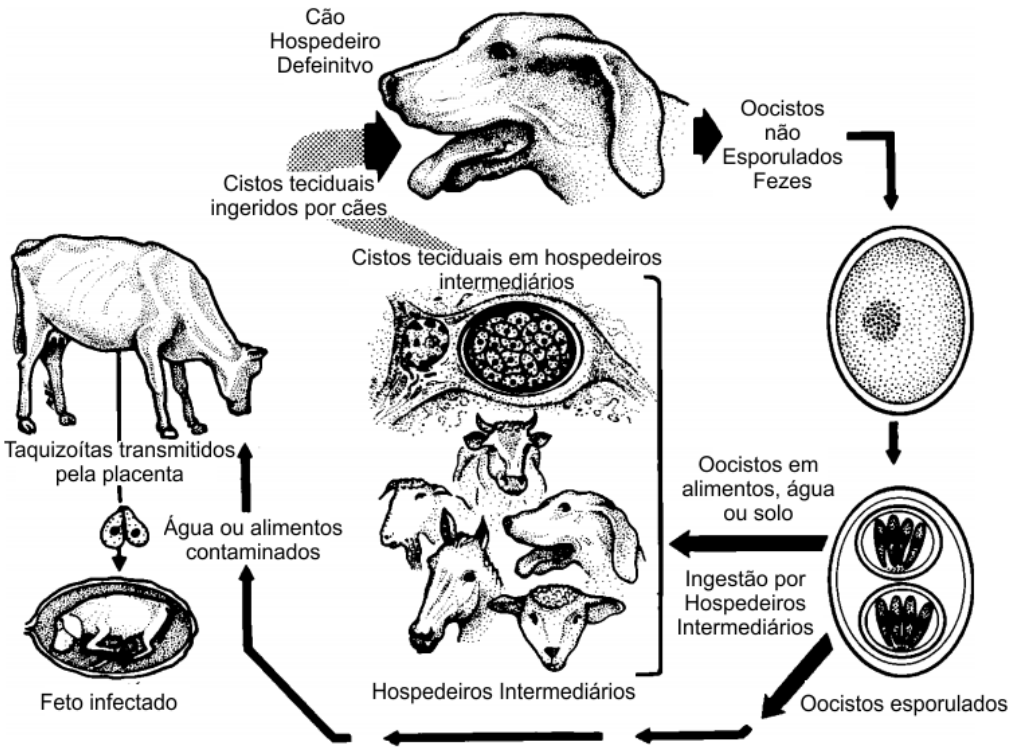

Figura 1. **Ciclo de vida de *Neospora caninum*.** Os hospedeiros intermediários adquirem a doença ao ingerir oocistos esporulados, enquanto que hospedeiros definitivos são infectados ao ingerir tecidos contaminados com cistos teciduais contendo bradizoítas. O parasita também pode ser transmitido por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

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 divide-se, 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).

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

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 (FRÈNAL; 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).

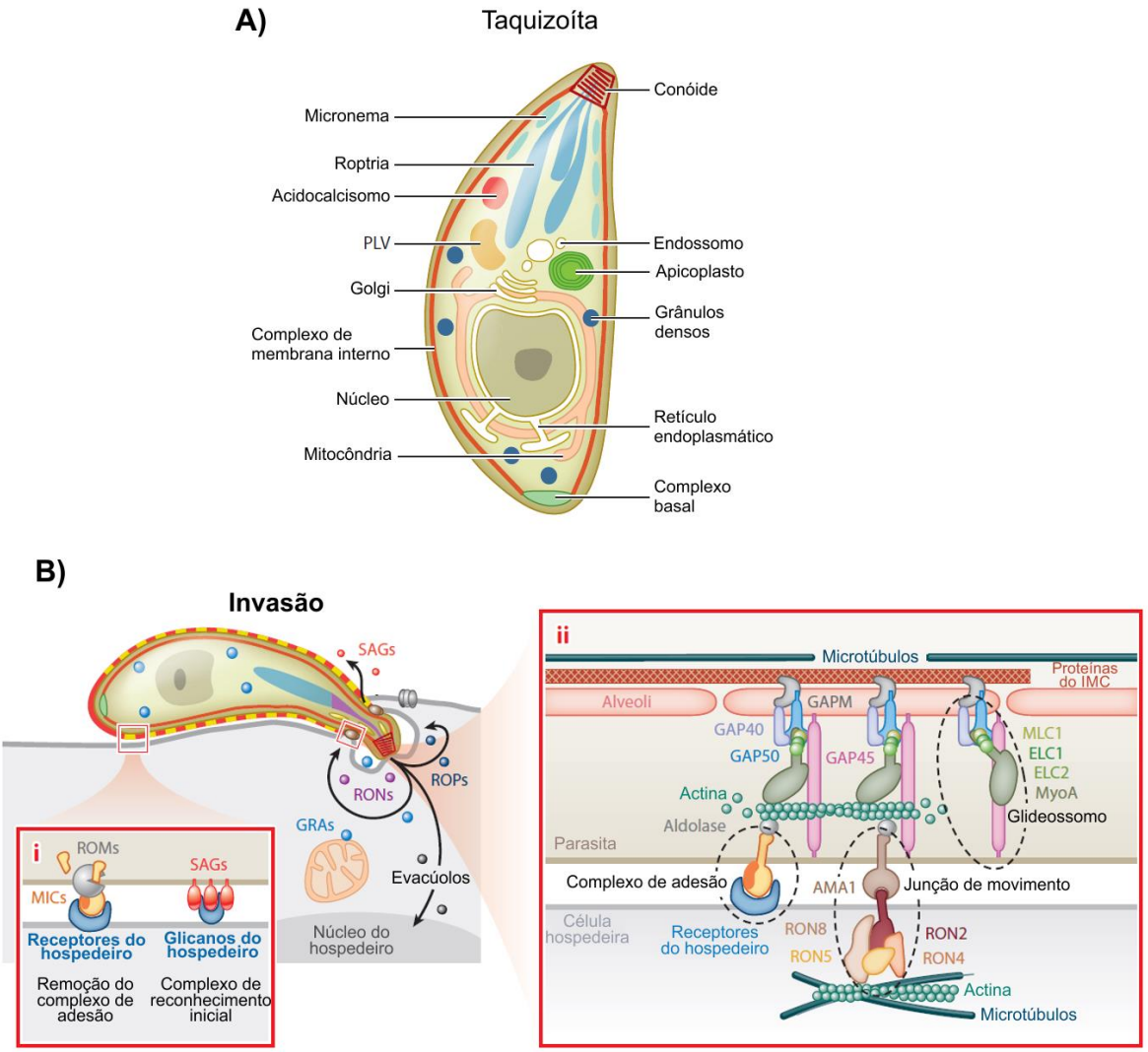

Figura 2. **Morfologia da forma taquizoíta e invasão da célula hospedeira. A)** Representação das principais estruturas e organelas responsáveis pela funcionalidade e morfologia características dos taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. **B)** Processo de invasão da célula hospedeira por taquizoíta de *T. 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).

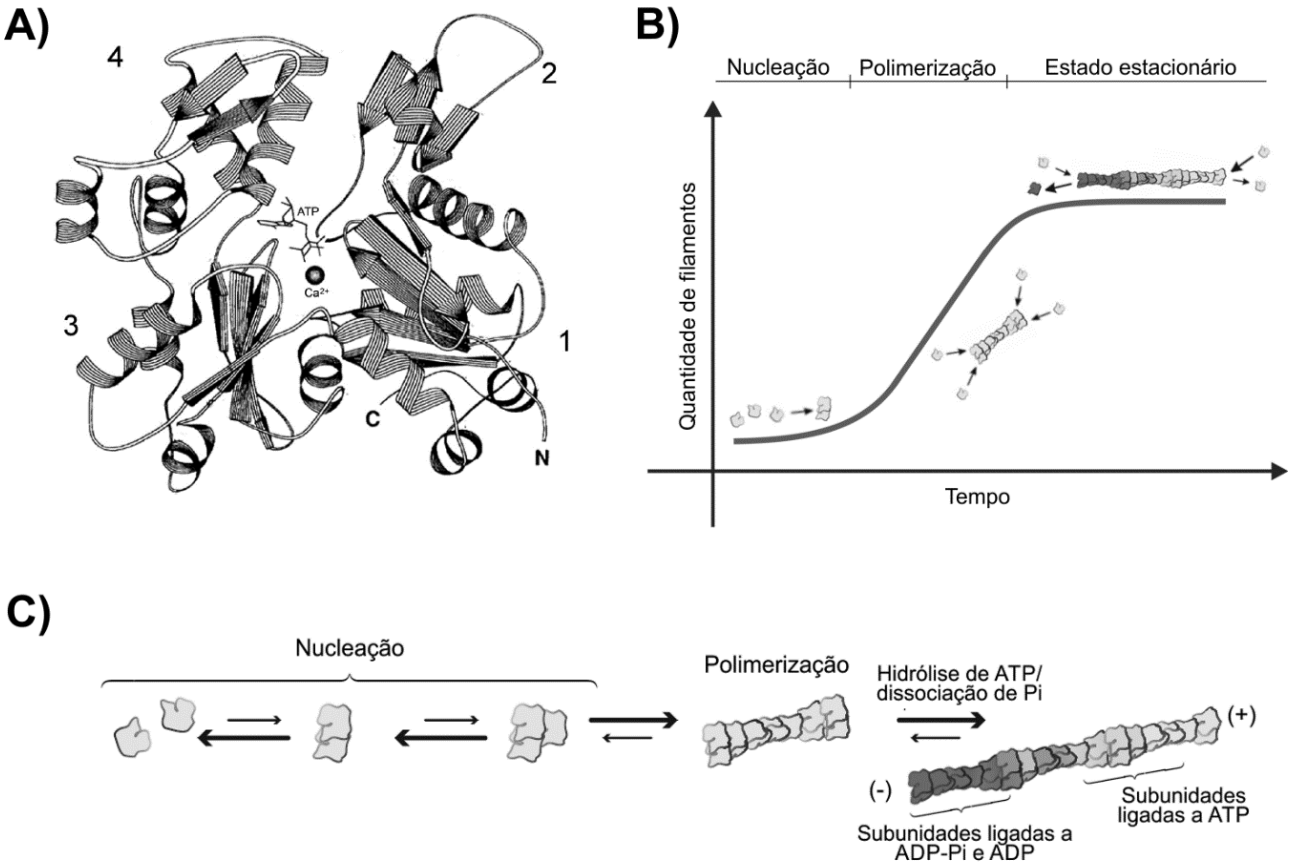

Figura 3. **Estrutura de actina e polimerização do filamento de actina. A)** Estrutura de actina mostrando seus subdomínios. Actina de coelho associada a DNase I bovina (acesso PDB 1ATN). Moléculas de ATP e Ca^{+2} na fenda superior. N = N-terminal; C = C-terminal. (Fonte: GUPTA et al., 2015). **B)** 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 ADP-actina-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 ATP-actina ou ADP-actina e de ATP/ADP-actina em ambas as extremidades dos filamentos

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

(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 consequência, impedindo a formação de filamentos.

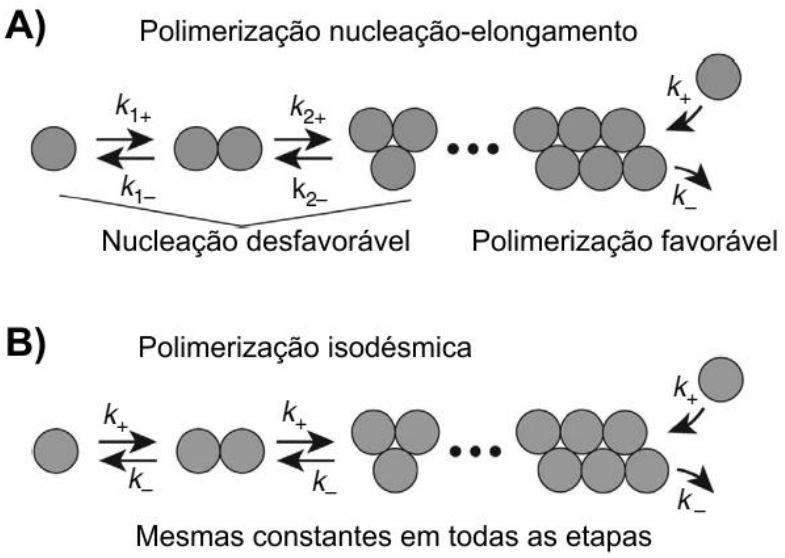

Figura 4. **Modelo proposto para polimerização de actina de *Toxoplasma gondii*. A)** Mecanismo de polimerização de actinas canônicas, no qual a etapa de nucleação é termodinamicamente desfavorável. Nessa etapa, as taxas de associação (k_{1+} e k_{2+}) são menores que as taxas de dissociação (k_{1-} e k_{2-}). **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 mostrou-se 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 pós-traducionais 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 nos processos celulares é rigorosamente regulada. A regulação da atividade 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

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 (PIP_2), 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 sequestro de actina-G, com evidência de quebra 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 N-terminal 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*.

CONCLUSÃO

5. 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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

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.

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.

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.

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 monomer-insensitive depolymerization of Listeria actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. **Journal of Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 315-324, 2006.

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.

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.; 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.

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.

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.

DE HOSTOS, E. L.; BRADTKE, B.; LOTTSPEICH, F.; GERISCH, G. Coactosin, a 17 kDa F-actin 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.

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.

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.

FRÈNAL, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.; 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.

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., 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.

MAEKAWA, S.; NISHIDA, E.; OHTA, Y.; SAKAI, H. Isolation of low molecular weight actin-binding 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.

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.

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.

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.

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.

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 cyclase-associated 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.

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.

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. 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.

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.

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.

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.

POUKKULA, M.; KREMNEVA, E.; SERLACHIUS, M.; LAPPALAINEN, P. Actin-depolymerizing 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.