UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum*

Bruno Bonamichi Bueno

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum*

Dissertação de Mestrado
apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

**Orientado: Bruno Bonamichi
Bueno**

**Orientadora: Profa. Dra. Ana
Patricia Yatsuda Natsui**

Ribeirão Preto

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Bueno Bonamichi, Bruno

Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum*. Ribeirão Preto, 2016.

90p. : Il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado 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. Expressão 3. *tags*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Bonamichi Bueno

Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum*

Dissertação de Mestrado
apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Ana
Patricia Yatsuda Natsui

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura

Prof.Dr.

Instituição:

Assinatura

À memória de David Robert Jones

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que me acompanharam durante a realização do mestrado, sem os quais ele não seria possível, em especial:

Aos meus pais Antonio Claret Bueno e Maria de Lourdes Bonamichi Bueno e minha irmã Flávia Bonamichi Bueno pela dedicação e apoio;

À Ana Cristina Jardim de Melo (Tina) pela compreensão, amor e incentivo em todos os momentos;

A Profa. Dra. Ana Patricia Yatsuda Natsui por ter me recebido em seu laboratório e ter confiado a mim a realização deste projeto;

Aos colegas Luiz Miguel Pereira e Luciana Baroni por dividirem comigo suas experiências de bancada de forma sempre muito generosa, pelos vetores, sequências e soros compartilhados;

Aos colegas Marcos Alexandre Bezerra, Isabel Cristina Vigato, Maraisa Palhão Verri e Letícia Pollo por me auxiliarem na realização dos ensaios, análises, culturas e leituras. Pela companhia, conversas, conselhos, trocas de experiência e aprendizado essenciais a este trabalho;

Ao Laboratório de Parasitologia Clínica da FCFRP-USP e ao Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP pela utilização dos seus equipamentos;

À Milenni Garcia Michels por ter me incentivado a realizar o mestrado desde o começo e por ter corrigido meu ponto de horas durante todo este tempo;

Ao Dr. Celso Raul Romero Ramos pela ajuda com as predições;

À Sandra Barioni Toma e a todos da Ourofino Saúde Animal pelo incentivo;

Aos meus parentes e amigos.

Muito obrigado !

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESÚMEN	v
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ciclo de vida e vias de transmissão do parasita <i>Neospora caninum</i>	2
1.2 O papel das proteínas micronêmicas (MIC) e proteínas associadas à adenil-ciclase (CAP) na motilidade e invasão celular de Apicomplexas	4
1.3 Opções de controle preventivo	7
1.4 Produção de proteínas recombinantes solúveis e uso de <i>tags</i>	8
1.5 O vetor pET28/NcMIC2-like1/1080	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Gerais	14
2.2 Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Alinhamento das sequências proteicas e predição das estruturas secundárias	15
3.2 Clonagem da NcCAP	16
3.2.1 Purificação dos plasmídeos	16
3.2.2 Tratamento com enzimas de restrição	17

3.2.3	Eletroforese em gel de agarose	17
3.2.4	Purificação das bandas do gel de agarose	18
3.2.5	Ligação do inserto ao vetor	18
3.2.6	Transformação em <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes	19
3.3	Expressão das proteínas recombinantes	19
3.4	Purificação das proteínas recombinantes	21
3.5	Eletroforese unidimensional	22
3.6	Coloração dos géis por coomassie blue G	22
3.7	Quantificação das proteínas recombinantes pelo método de Bradford	23
3.8	Detecção das proteínas recombinantes por ELISA	23
3.9	Avaliação das proteínas recombinantes solúveis e seus efeitos através de ensaio de invasão	25
3.9.1	Cultura de células VERO	25
3.9.2	Cultura e purificação de taquizoítas de <i>Neospora caninum</i> marcados com LacZ (NcLacZ)	25
3.9.3	Ensaio de invasão	26
3.9.4	Lise celular e ensaio de CPRG	27
3.10	Ensaio de adesão (<i>binding</i>)	27
3.11	Espectrometria de massas	29
3.11.1	Preparo das amostras	29
3.11.2	Identificação de proteínas por MS-MALDI	30
3.12	Análises estatísticas	31
4.	RESULTADOS	32
4.1	Alinhamento das sequências das proteínas homólogas e predição das estruturas secundárias	32
4.2	Clonagens de NcCAP e NcMIC2-like1	39
4.3	Expressão e purificação das proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcCAP/1081	42
4.4	Detecção das proteínas recombinantes por ELISA	45

4.4.1 Detecção de rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 pelo soro policlonal anti- rNcMIC2-like1	45
4.4.2 Detecção de rNcCAP/1081 e rNcCAP pelo soro policlonal anti- rNcCAP	46
4.5 Avaliação das proteínas recombinantes solúveis em ensaio de invasão	47
4.6 Ensaio de adesão (<i>binding</i>) entre as proteínas recombinantes solúveis (rNcMIC-like1/1081 e rNcCAP/1081) e extrato de <i>Neospora caninum</i>	48
4.6.1 Identificação das proteínas obtidas no ensaio de adesão por MS-MALDI	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

BUENO, B. B. **Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum***. 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O protozoário *Neospora caninum* é considerado um dos principais causadores de abortos infecciosos na pecuária de corte e de leite no mundo. No Brasil, a presença do parasita varia de acordo com a região do país e com o tipo de rebanho, com perdas maiores na agroindústria do leite que ultrapassam US\$ 50 milhões ao ano. A neosporose possui como principal manifestação clínica as perdas fetais ou abortamentos em bovinos, além de comprometimento neuronal esporádico em cães. Apesar da sua importância, a neosporose não possui atualmente tratamento eficaz e as opções de controle envolvem basicamente medidas de prevenção. As vacinas ainda são uma alternativa de desenvolvimento exploradas, sobretudo aquelas que utilizam antígenos recombinantes. Uma dificuldade ao se produzir proteínas recombinantes em sistemas de expressão heterólogos é a formação de corpúsculos de inclusão que são agregados de proteínas insolúveis. Estes agregados devem ser submetidos a processos dispendiosos para tornarem-se ativos, resultando num baixo rendimento da proteína final. Diversos recursos são utilizados para obtenção de proteínas solúveis, desde o emprego de diferentes técnicas de purificação, solubilização até o uso de *tags* de afinidade. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu e patenteou o vetor pET28/NcMIC2-like1/1081 que possui uma *tag* rica em ácido glutâmico acoplada, conhecida como Nc1081. Esta *tag* foi capaz de estimular a solubilidade da proteína micronêmica tipo 2 de *N. caninum* (NcMIC2-like1) fazendo com que a proteína recombinante (rNcMIC2-like1/1081) fosse expressa na forma solúvel. O presente trabalho procurou dar continuidade ao estudo com a rNcMIC2-like1/1080 e com a *tag* através da clonagem e expressão de uma outra proteína relacionada à invasão do parasita conhecida como proteína associada à adenil ciclase (NcCAP). A sequência codificadora da proteína foi clonada no vetor contendo a *tag* Nc1081, a proteína recombinante (rNcCAP/1081) foi expressa com um peso de 38 kDa na forma solúvel em tampão não desnaturante Tris-Cl. No teste de ELISA, as proteínas rNcMIC2-like1 e a rNcCAP acopladas ou não a *tag* foram detectadas com intensidade semelhante pelos respectivos soros policlonais anti-rNcMIC2-like1 e anti-rNcCAP, demonstrando que a presença da *tag* não influenciou no reconhecimento das proteínas. As proteínas recombinantes solúveis rNcMIC2-like1/1081 e rNcCAP/1081 ainda foram testadas através de ensaios *in vitro* de invasão e adesão. No ensaio de invasão, a forma solúvel de NcMIC2-like1 (rNcMIC2-like1/1081) na concentração de 5 µg/mL, aumentou a invasão das células VERO pelo parasita, enquanto sua forma insolúvel (rNcMIC2-like1) diminuiu a invasão. Já no teste de adesão (*binding*), foi possível identificar que a rNcMIC2-like1/1081 aderiu à proteína serina treonina fosfatase 2C, ao fator de alongamento alfa 1 e a proteína hipotética identificada

como NCLIV_029860, enquanto a rNcCAP/1081 aderiu à proteína hipotética NCLIV_041330. O presente trabalho permitiu o início de estudos das propriedades funcionais das proteínas NcMIC2-like1 e NcCAP que seriam inviáveis com suas formas recombinantes insolúveis, demonstrando a aplicabilidade do vetor com a *tag* 1081.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; proteínas recombinantes; expressão; proteína micronêmica tipo 2 de *N. caninum* (NcMIC2-like1); proteína associada à adenil ciclase de *N. caninum* (NcCAP); *tag* 1081; solubilização; invasão; adesão (*binding*).

ABSTRACT

BUENO, B. B. **Searching for soluble proteins of *Neospora caninum***. 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016

Neospora caninum parasite is considered as a major cause of infectious abortion in beef and milk cattle in the world. In Brazil, the presence of the parasite varies in dairy or beef herd and according to the region with greater losses in dairy industry that exceed \$ 50 million per year. Neosporosis has as main clinical manifestation fetal losses or abortion in cattle, in addition to sporadic neuronal impairment in dogs. Despite its importance, neosporosis has currently no effective treatment and control options rely primarily on preventive measures. Vaccines still represent an alternative explored by the veterinary industry, especially those employing recombinant antigens. The difficulties regarding production of recombinant proteins in heterologous expression systems are formation of inclusion bodies, which are insoluble protein aggregates. These aggregates have to undergo costly procedures to become active, resulting in low yield of final protein. Many techniques are used to obtain soluble proteins ranging from different purification or solubilizing techniques to the use of affinity tags. Our research group has developed and patented a vector pET28/NcMIC2-like1/1081 that has a rich glutamic acid tag attached, known as Nc1081. This tag is capable of stimulating the solubility of the recombinant micronemic protein type 2 like 1 of *N. caninum* (rNcMIC2-like1), expressing soluble rNcMIC2-like1/1081. This study aimed to continue the study with rNcMIC2-like1/1080 and the tag by cloning and expressing another protein related to parasite invasion known as cyclase-associated protein (NcCAP). The protein coding sequence was cloned into the vector containing the Nc1081 tag, recombinant protein (rNcCAP/1081) was expressed with a molecular weight of 38 kDa in soluble form in non-denaturing Tris-Cl. In the ELISA test, rNcMIC2-like1 protein and rNcCAP coupled or not with the tag were detected with similar intensities by the respective polyclonal anti-sera rNcMIC2-like1 and anti-rNcCAP, demonstrating that the tag did not decrease the recognition of the proteins. Soluble recombinant proteins rNcMIC2-like1/1081 and rNcCAP/1081 were also tested *in vitro* in invasion and binding tests. In the invasion assay, a soluble form of NcMIC2-like1 (rNcMIC2-like1/1081) at a concentration of 5 µg/mL increased the VERO cell invasion by the parasite, while its insoluble form (rNcMIC2-like1) decreased invasion. In the binding test, the rNcMIC2-like1/1081 bound to protein serine threonine phosphatase 2C, the elongation factor 1 alpha and the hypothetical protein identified as NCLIV_029860, while rNcCAP/1081 bound to the hypothetical protein NCLIV_041330. The current work allowed the initial functional studies of the NcMIC2-like1 and NcCAP proteins, otherwise unfeasible with their insoluble recombinant forms, demonstrating the applicability of the vector with the tag 1081.

Keywords: *Neospora caninum*; recombinant proteins; expression; micronemic protein type 2 like 1 of *N. caninum* (NcMIC2-like1); cyclase-associated protein of *N. caninum* (NcCAP); tag 1081; solubilization; invasion; binding

RESUMEN

BUENO, B. B. **Em busca de proteínas solúveis de *Neospora caninum***. 2016. 90f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016

El protozoo *Neospora caninum* es considerado una de las principales causas de aborto infeccioso en la ganadería de carne y leche en el mundo. En Brasil, la presencia del parásito varía según la región del país y el tipo de rebaño, con mayores pérdidas en la agroindustria lechera, que exceden los US\$ 50 millones por año. La neosporosis tiene como principal manifestación clínica la pérdida fetal o aborto en el ganado, además de deterioro neuronal esporádico en los perros. A pesar de su importancia, la neosporosis no cuenta en la actualidad con tratamientos eficaces y las opciones de control consisten principalmente en medidas preventivas. Las vacunas son una alternativa de desarrollo explorado, especialmente las que utilizan antígenos recombinantes. Una de las dificultades en la producción de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos de expresión es la formación de cuerpos de inclusión, que son agregados de proteínas insolubles. Es necesario someter estos agregados a procedimientos costosos para convertirlos en proteínas activas, lo que resulta en un bajo rendimiento de la proteína final. Se utilizan variados recursos para obtener las proteínas solubles, incluyendo el empleo de diferentes técnicas de purificación, solubilización, y la utilización de *tags* de afinidad. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado y patentado el vector pET28 /NcMIC2-like1/ 1081 que lleva adjunta una *tag* rica en ácido glutámico, conocida como Nc1081. Esta *tag* fue capaz de estimular la solubilidad de la proteína microneme tipo 2 de *N. caninum* (NcMIC2-like1), haciendo con que la proteína recombinante (rNcMIC2-like1 / 1081) fuera expresada en su forma soluble. Este estudio tuvo como objetivo continuar el estudio con rNcMIC2-like1 / 1080 y con la *tag* a través de la clonación y expresión de otra proteína relacionada con la invasión por el parásito, conocida como proteína asociada con la adenilato ciclasa (NcCAP). Se clonó la secuencia de codificación de la proteína en el vector que contiene la proteína recombinante con la *tag* Nc1081 (rNcCAP / 1081) y la proteína recombinante fue expresada con un peso de 38 kDa en forma soluble en un buffer no desnaturizante Tris-Cl. En la prueba ELISA, las proteínas rNcMIC2-like1 y rNcCAP, acopladas o no a la *tag* se detectaron con intensidad similar por los respectivos sueros policlonales anti-rNcMIC2-like1 y anti-rNcCAP, lo que demuestra que la presencia de la *tag* no influye en el reconocimiento de las proteínas. En seguida, las proteínas recombinantes solubles rNcMIC2-like1 / 1081 y rNcCAP / 1081 fueron sometidas a pruebas in vitro de invasión y adhesión. En el ensayo de invasión, la forma soluble de NcMIC2-like1 (rNcMIC2-like1 / 1081) en la concentración de 5 ug/ml aumentó la invasión de células VERO por el parásito, mientras que su forma insoluble (rNcMIC2-like1) disminuyó dicha invasión celular. En el ensayo de adhesión (*binding*), fue posible identificar que el rNcMIC2-like1 / 1081 se unió a la proteína serina treonina fosfatasa 2C, al factor de elongación 1 alfa y a la proteína hipotética identificada como NCLIV_029860, mientras rNcCAP / 1081

se unió a la proteína hipotética NCLIV_041330. Este trabajo permitió el inicio de estudios de las propiedades funcionales de las proteínas NcMIC2-like1 y NcCAP, que serían inviables en sus formas recombinantes insolubles, lo que demuestra la aplicabilidad del vector con la *tag* 1081.

Palabras clave: *Neospora caninum*; proteínas recombinantes; expresión; proteína microneme tipo 2 de *N. caninum* (NcMIC2-like1); proteína asociada con la adenilato ciclasa de *N. caninum* (NcCAP); *tag* 1081; solubilización; invasión; adhesión (binding).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do ciclo de invasão e Complexo Apical de um taquizoíta de um parasita do filo Apicomplexa

Figura 2 – Representação de uma parte do glideossomo de um parasita do filo Apicomplexa

Figura 3 – Representação do fragmento Nc1081, fragmento genômico de *Neospora caninum* testado como potencial tag de solubilização

Figura 4 – Indução, extração e purificação das proteínas recombinantes

Figura 5 – Alinhamento das sequências das proteínas micronêmicas homólogas e predição da estrutura secundária da MIC2-like1

Figura 6 – Alinhamento das sequências das proteínas associadas à adenil-ciclase homólogas e predição da estrutura secundária da CAP

Figura 7 – Representação da estrutura predita da tag Nc1081

Figura 8 – Digestão de pET28/NcMIC2-like1/1081 e pGEM/NcCAP para purificação e clonagens posteriores

Figura 9 – Digestão de pET28/NcMIC2-like1 e pET28/NcCAP com e sem tag após clonagem

Figura 10 - Extração total da proteína rNcMIC2-like1 com e sem tag Nc1081 em tampão Tris-Cl seguida de purificação em coluna de IMAC

Figura 11 - Teste de solubilidade da proteína rNcCAP/1081

Figura 12 - Extração total da proteína rNcCAP com e sem tag Nc1081 em tampão ureia 8M pH 8.0 seguida de purificação em coluna de IMAC

Figura 13 - Detecção de rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 pelo soro policlonal anti-NcMIC2-like1

Figura 14 - Detecção de rNcCAP/1081 e rNcCAP pelo soro policlonal anti-NcCAP

Figura 15 – Avaliação da invasão das células VERO pelos taquizoítas NcLacZ incubados com rNcMIC2-like1/1081 e rNcMi2-like1 através do ensaio de CPRG

Figura 16 – Ensaio de adesão (binding) entre as proteínas rNcMIC2-like 1 ou rNcCAP contendo a tag Nc1081 e os extratos de células VERO ou de taquizoítas de *N. caninum*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes tipos de *tags*

Tabela 2 – Proteínas identificadas no ensaio de adesão por espectrometria de massas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ F – Microfarads

μ g/mL – Microgramas por mililitro

μ L – Microlitro

ABP – Proteínas ligadoras de actina

ACN – Acetonitrila

ADP – Adenosina difosfato

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina bovina sérica acetilada

CaCl_2 – Cloreto de cálcio

CAP – Proteínas associadas à adenil-ciclase

c-Myc - Epítipo do produto do proto-oncogene humano

CO_2 – Dióxido de carbono

CPRG – Clorofenolred- β -D- galactopiranosídeo

CTRP – Proteína de circunsporozoíto

DTT – 1,4 - ditioneitol

DTT – Ditioneitol

EC – Endossomo

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ER – Retículo endoplasmático

EST - Marcadores de sequencias expressas

FATT – *Flag-acidic-target tag*

G – Gauge

g – Gravidade

GST – Glutathione-S-transferase

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

Hepes - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

His-*tag* – *tag* de poli-histidina

IMAC – Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

IMC – Complexo membrana interna

IPTG – Isopropiltiogalactosídeo

KCl – Cloreto de potássio

kV – Quilovolts

L – Litro

LB – Luria Bertani

M – Mol

MALDI-TOF - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz TOF – *Time of flight*

MBP – Proteína ligadora de maltose

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MIC – Proteínas micronêmicas

MIC2-like1 – Proteína micronêmica 2 tipo 1

mM – Milimol

MSD – Merck Sharp & Dhome

MTRAP – Proteína anônima relacionada à trombospondina específica de merozoíto

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico

NH₄HCO₃ – Bicarbonato de amônio

nM – Nanomol

°C – Graus Celsius

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salino

PBS-GT – Tampão fosfato salino com gelatina suína

PBS-T – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PDB – RCSB *Protein data Bank*

pH – Potencial hidrogeniônico

RON – Proteínas do pescoço da roptrias

ROP – Proteínas das roptrias

RPM - Rotações por minuto

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio

SOC – *Super optimal broth*

SRS – Proteínas de superfície associadas à SAG

SUMO – Proteínas modificadoras pequenas relacionadas à ubiquitina

TAE – Tampão Tris acetato

TFA - Ácido trifluoroacético

TLP – Proteína semelhante à TRAP

TMB – 3,3', 5,5' - tetrametilbanzidina

TRAP – Proteínas anônimas relacionadas à trombospondina

Tris – 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

TRX – Tireodoxina

TSR – Domínio trombospondina tipo 1

UV – Ultravioleta

VERO – Célula do rim do macaco verde africano

VWA – Domínio tipo A do fator de Von Willebrand

WH2 – Domínio central homólogo à Wiskott-Aldrich 2

Ω - Ohm

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença causada pelo parasita *Neospora caninum*, um protozoário da classe Coccidia pertencente ao filo Apicomplexa (DUBEY et al., 2002). O parasita é considerado um dos maiores causadores de abortos na pecuária de corte e de leite (DUBEY; SCHARES, 2011; DONAHOE et al., 2015) com prejuízos estimados em mais de US\$1 bilhão de dólares anuais entre os dez principais países criadores de gado no mundo (REICHEL et al., 2013).

No Brasil, a neosporose foi identificada pela primeira vez em 1996 em Campo Grande (BRAUTINGAM; HIETALA; GLASS, 1996) doze anos após a sua primeira descrição em cães de rua na Noruega (BJERKAS et al., 1984). O parasita acomete principalmente bovinos e cães e não é considerada uma zoonose apesar de algumas evidências sorológicas em indivíduos imunocomprometidos (McCANN et al., 2008; GANGNEUX; KLEIN, 2009; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; DONAHOE et al., 2015). A doença tem como principal manifestação clínica as perdas fetais ou abortamentos em bovinos, além de comprometimento neuronal esporádico em cães. (DUBEY; SCHARES; ORTEGA, 2007). Doenças como brucelose, leptospirose, campilobacteriose, rinotraqueítes, entre outras, também podem causar abortos em bovinos, fazendo com que a neosporose muitas vezes seja confundida com estas doenças (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

O parasita *N. caninum* encontra-se amplamente distribuído no mundo, podendo ser encontrado praticamente em qualquer lugar onde existam cães e ruminantes habitando simultaneamente (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; REICHEL et al., 2014). A neosporose bovina já foi relatada em todos os continentes exceto Antártida, podendo ocorrer de forma esporádica, endêmica ou com padrões epidêmicos na forma de surtos. O padrão epidêmico é tido como o mais preocupante, pois pode resultar em taxas de aborto superiores a 10% (DUBEY; SCHARES; ORTEGA, 2007; REICHEL et al., 2014). Na pecuária de leite isto representa um custo maior, pois a fêmea que sofre aborto deve ser substituída por outro animal no mesmo estágio de lactação. Diferente da pecuária de corte cujo custo é somente da substituição do animal abortado por outro (REICHEL et al., 2013).

No Brasil, a presença do parasita varia de acordo com a região do país, bem como com o tipo de rebanho. A soroprevalência de *N. caninum* foi avaliada entre 15% a 29% na região sul, sudeste e centro-oeste (RAGOZO et al., 2003) e 14% a 35% na região nordeste (GONDIM et al., 1999; MINERVINO et al., 2008). Nos rebanhos de corte, a soroprevalência foi de 14% (MARQUES et al., 2011) e 13% (MOURA et al., 2012), enquanto no rebanho de leite foi de 11% (VILAS-BOAS et al., 2015) e 44% (KLAUCK et al., 2016) chegando até 97% (GUEDES et al., 2008). As perdas econômicas por neosporose no Brasil são estimadas em US\$101 milhões na pecuária de corte e US\$51 milhões na pecuária de leite (REICHEL et al., 2013). Apesar das perdas na pecuária de corte serem maiores que na de leite, o impacto na cadeia produtiva leiteira é mais significativo uma vez que a base desta é sustentada por pequenos produtores pouco tecnificados, com baixa produtividade e consequentemente baixos rendimentos que os tornam altamente dependentes do sucesso reprodutivo dos seus rebanhos (NICOLINO et al., 2015). Em vista deste cenário, o abate das fêmeas soropositivas é inviável economicamente destacando, portanto, a importância de medidas preventivas como a aquisição de animais soronegativos, descarte correto dos animais abortados, impedir o contato dos cães com o rebanho, além de reduzir infecções concomitantes que poderiam comprometer a imunidade do animal (BARROS et al., 2010). Destas medidas, a mais problemática é evitar o contato dos cães, tanto domésticos como silvestres, já que os animais circulam livremente pelas pastagens e podem se alimentar dos restos de placentas presentes no campo.

1.1 Ciclo de vida e vias de transmissão do parasita *Neospora caninum*

O ciclo de vida do parasita *N. caninum* é heteroxênico e tem como hospedeiro definitivo os canídeos como cães (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (GONDIM et al., 2004), dingo (KING et al., 2010) e lobo cinza (DUBEY et al., 2011). Enquanto os bovinos principalmente, além de uma variedade de animais de sangue quente, são os hospedeiros intermediários (revisado em DUBEY; SCHARES; ORTEGA, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011).

Três estágios infectantes compõem o ciclo de vida do parasita: taquizoítas, bradizoítas e oocistos (DUBEY et al., 2003). Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo infectado e podem permanecer no meio ambiente por tempo indeterminado. Fora do hospedeiro, o oocisto sofre esporulação, podendo ser ingerido pelo hospedeiro intermediário quando este entra em contato com água ou alimentos contaminados. (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010). Após a ingestão do oocisto esporulado, esporozoítas são liberados e atravessam a parede do intestino do animal transformando-se em taquizoítas (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Os taquizoítas estão presentes na fase aguda da doença e são capazes de invadir uma variedade de células nucleadas, como macrófagos, células do tecido nervoso, endotélio vascular, hepatócitos (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Os taquizoítas multiplicam-se rapidamente dentro de uma estrutura conhecida como vacúolo parasitóforo até romper a célula hospedeira, liberando novos taquizoítas que podem infectar outras células (Figura 1A) (HEMPHILL et al., 1999). Após a rápida replicação, os taquizoítas convertem-se em bradizoítas capazes de formar cistos tipicamente encontrados no tecido muscular ou nervoso. Os cistos correspondem à fase crônica da doença e podem permanecer no hospedeiro por vários anos sem causar sintomas clínicos (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). O ciclo de vida do parasita se completa quando o hospedeiro definitivo ingere tecido contaminado contendo cistos, liberando novos oocistos no meio ambiente através das fezes (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

A transmissão do parasita pode ocorrer pela via horizontal ou vertical. A via vertical, também conhecida como transplacentária ou congênita, é a principal forma de transmissão da doença (REICHEL et al., 2014) com eficiência estimada entre 75 e 100% (REICHEL et al., 2013). Nem todo animal infectado irá abortar, contudo o animal infectado possui um risco maior, estimado em 1.7 a 7.4 vezes mais chances de abortar do que um animal não infectado (THURMOND; HIETALA 1997). Isso pode ocorrer principalmente entre o quinto e sétimo mês de prenhez, dependendo sobretudo da maturidade imunológica do feto quando infectado e da virulência da linhagem do parasita (DUBEY; SCHARES, 2011; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). Uma vez infectado, a neosporose pode persistir pelo resto da vida do animal, sendo reativada durante a prenhez, o que contribui para que ela seja transmitida de

geração para geração dentro do mesmo rebanho (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). A proporção de animais congenitamente infectados pode diminuir com o aumento do número de gestações, consequentemente com a idade do animal. Isso poderia ser explicado pela melhoria da imunidade da fêmea contra novas infecções causadas pelo parasita (DIJKSTRA et al., 2003). Contudo, estudos mais recentes não identificaram este tipo de associação, indicando que a relação entre o número de gestações e diminuição da transmissão vertical ainda não é um consenso (CARDOSO et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2014).

Figura 1 – Representação do ciclo de invasão e Complexo Apical de um taquizoíta de um parasita do filo Apicomplexa. A – Ciclo de invasão do parasita compreendido pela invasão da célula hospedeira, multiplicação, rompimento e saída do parasita egresso. B - Organelas que compõem o Complexo Apical são representadas em azul, micronemas, roptrias e grânulos densos. Abreviações: EC – Endossomo, ER – Reticulo endoplasmático, IMC – Complexo membrana interna. (Adaptado de Blader et al., 2015)

1.2 O papel das proteínas micronêmicas (MIC) e proteínas associadas à adenil-ciclase (CAP) na motilidade e invasão celular de Apicomplexas

N. caninum é um parasita intracelular obrigatório que utiliza um mecanismo de locomoção conservado em Apicomplexas conhecido como deslizamento, envolvido tanto na migração do parasita quanto na invasão da célula hospedeira (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008). Este mecanismo difere de outros organismos,

pois não utiliza cílios, flagelos ou pseudópodes e depende de um complexo macromolecular conhecido como glideossomo que é impulsionado por um motor composto por filamentos de actina e miosina (KEELEY; SOLDATI, 2004; SIBLEY, 2004).

Também contribuem para a locomoção e invasão do parasita as organelas que compõe o complexo apical, incluindo as micronemas e roptrias (Figura 1B). Após uma interação inicial de baixa afinidade mediada por proteínas de superfície, como as da família das Proteínas de Superfícies Relacionadas à SAG (SRS), o conteúdo dessas organelas é secretado com liberação das proteínas micronêmicas (MIC) e de roptrias (RON e ROP). Estas proteínas são liberadas de forma regulada na porção anterior do parasita, possibilitando a formação de um complexo estável com a membrana da célula do hospedeiro, conhecida como junção de movimento, que resultará na formação do vacúolo parasitóforo no qual o parasita irá se multiplicar (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; HEINTZELMAN, 2015).

As proteínas micronêmicas, além de permitirem uma interação com maior afinidade, também estão relacionadas com a ligação do motor actina-miosina com o sítio de adesão parasita-hospedeiro (HEINTZELMAN, 2015). Uma família de proteínas micronêmicas bem conservada em Apicomplexas é conhecida como Proteínas Anônimas Relacionadas à Trombospondina (TRAP). As TRAPs são proteínas transmembranas caracterizadas pela presença de um número variável de cópias de domínios adesivos como o domínio trombospondina tipo 1 (TSR) e/ou domínio I de integrina ou domínio tipo A do fator de von Willebrand (VWA) e uma cauda citoplasmática contendo um resíduo de triptofano (BAUM et al., 2006). Os domínios adesivos localizam-se na porção extracelular, na região N-terminal da proteína, e são responsáveis pela interação com os receptores localizados na superfície da célula do hospedeiro (BARTHOLDSON et al., 2012). Por sua vez, a cauda citoplasmática localiza-se na região C-terminal e se liga aos filamentos de actina no motor actina-miosina do parasita através de um tetrâmero de aldolase dependente de triptofano (Figura 2) (JEWETT; SIBLEY, 2003; BOSCH et al., 2006). As TRAPs já foram identificadas em *Plasmodium* spp. (TRAP, TLP, CTRP, MTRAP), em *Toxoplasma gondii* (TgMIC2), em *Cryptosporidium* spp. (TRAPC1), *Eimeria* spp. (Etp100), *Babesia* spp. (BpTRAP) e *Neospora caninum* (NcMIC2) (BOUCHER; BOSCH, 2015). Durante o mestrado do pesquisador Luis Miguel Pereira (PEREIRA

et al., 2011) um homólogo da TRAP ou MIC2 de *N. caninum* conhecido como MIC2-like1 foi clonado e caracterizado, as proteínas recombinantes foram expressas e seus respectivos anti-soros foram produzidos.

Figura 2 – Representação de uma parte do glideossomo de um parasita do filo Apicomplexa. A TRAP/MIC2 (azul) se liga ao motor actina-miosina (cadeias cinza/preta/magenta) através do tetrâmero de aldolase (amarelo/vermelho/verde/azul). A porção extracelular da TRAP/MIC2 se liga a um receptor na superfície da membrana da célula do hospedeiro, enquanto a cauda citoplasmática é conectada a aldolase. (Adaptado de Boucher; Bosch, 2015)

Outra família de proteínas conservada em Apicomplexas, assim como em eucariotos em geral, são as proteínas associadas à adenil-ciclase (CAP). As CAPs também estão relacionadas à motilidade e invasão do parasita, estando envolvidas com o ciclo de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina (BAUM et al., 2009). Sabe-se que a actina existe em duas formas, globular ou monomérica (actina G) e filamentosa (actina F). A transição entre as duas formas depende da hidrólise de ATP em ADP e é controlada pelas proteínas ligadoras de actina (ABP), dentre elas as CAPs (OSHIDA; WONG; BAUM, 2012). As CAPs são proteínas citoplasmáticas caracterizadas pela presença de um domínio alfa-hélice na região N-terminal da proteína, seguida de um domínio central homólogo a Wiskott-Aldrich 2 (WH2) flanqueado por prolina e uma folha-beta localizada na região C-terminal que é responsável pela ligação com a actina G (HUBBERRSTEY; MOTTILLO, 2002).

Contudo, em Apicomplexas as CAPs são estruturalmente menos complexas, em *Plasmodium* spp. as CAPs não possuem a região N-terminal sendo formada inteiramente de folhas-beta, enquanto que em *T. gondii* e *Cryptosporidium parvum* as CAPs possuem a região N-terminal mais curta (KUMPULA; KURSULA, 2015). As ABPs de *N. caninum* são alvos de estudo no doutorado de Luciana Baroni.

A presença das famílias de proteínas TRAP e CAP entre os parasitas do filo Apicomplexa e sua associação com a motilidade e invasão tornou-as atrativas como alvos para o desenvolvimento de drogas e vacinas. Para possibilitar o seu estudo em laboratório, estas proteínas são produzidas de forma recombinante utilizando expressão heteróloga em células de *Escherichia coli*.

1.3 Opções de controle preventivo

Apesar da importância da neosporose e seus impactos na saúde animal, sabe-se que as alternativas para o controle da doença são limitadas. A única opção comercialmente disponível para prevenção de abortos, a vacina Bovilis Neoguard® da MSD, foi retirada do mercado no mundo todo devido a sua baixa eficácia (WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012). O uso de agentes coccidiostáticos como o toltrazuril é eficaz contra os taquizoítas circulantes (KRITZER et al., 2002), porém não se mostrou economicamente viável devido ao período de carência elevado para carne e leite (REICHEL et al., 2014). Considerando a ausência de tratamentos e vacinas eficazes, as opções de controle são baseadas na redução da transmissão vertical e horizontal através de medidas de prevenção que incluem diagnosticar e abater os animais contaminados, diminuir o acesso dos canídeos (domésticos e silvestres) ao ambiente de criação dos bovinos, bem como descartar corretamente a carcaça dos animais abortados (DUBEY; SCHARES, 2011).

No Brasil, uma das grandes dificuldades em se prevenir a doença é devido ao tipo de criação predominante no país que é extensiva. Neste tipo de produção, o gado é criado à pasto ao invés de confinado, o que possibilita o contato dos animais com o ambiente contaminado, além do que em muitas propriedades deste tipo os cães (sejam silvestres ou domésticos) têm livre acesso aos bovinos (NICOLINO et

al., 2015). Diferente de países europeus que possuem programas oficiais de controle da neosporose e outros em que a doença é de notificação obrigatória (REICHEL et al., 2014), no Brasil muitos animais abortados sequer são testados. Como os casos de abortamento são muito comuns no ambiente extensivo, na maioria das vezes a neosporose é confundida com outras doenças não sendo incluída na rotina de exames laboratoriais nas propriedades (EMBRAPA, 2003).

A vacinação ainda é uma opção viável para prevenção dos abortos causados pela neosporose. O desenvolvimento de formulações utilizando o parasita *N. caninum* remonta há mais de 15 anos, com as primeiras formulações de vacinas vivas produzidas a partir de lisados de taquizoítas, culminando no desenvolvimento da vacina Bovilis Neoguard® (REICHEL et al., 2014). Entretanto, a vida útil curta das formulações de vacinas vivas, como é o caso da Toxovax® contra *T. gondii* (O'CONNELL; WILKINS; PUNGA, 1988), demonstra a necessidade de se buscar opções mais modernas capazes de contornar esta limitação. Outra abordagem possível é o uso de formulações contendo antígenos nativos como é o caso da vacina CoxAbic™ composta por antígenos purificados de gametócitos de *Eimeria máxima* (SHARMAN et al., 2010) e a vacina Novibac Piro™ (SCHETTERS; MOUBRI; COOKE, 2009) que contém antígenos solúveis de *Babesia canis* e *Babesia rossi*, ambas indisponíveis no Brasil. Atualmente não existe nenhuma vacina disponível contendo antígenos recombinantes de *N. caninum*, contudo a abordagem recombinante deve ser uma frente de desenvolvimento a ser explorada pela vantagem em termos de custo uma vez que são mais baratas de serem produzidas (REICHEL et al., 2015).

1.4 Produção de proteínas recombinantes solúveis e uso de tags

A expressão heteróloga permite a produção de proteínas recombinantes em grandes quantidades. Entretanto, proteínas expressas em células hospedeiras transformadas podem ocorrer na forma solúvel ou como corpúsculos de inclusão insolúveis, dependendo de fatores como o ambiente redutor da célula, nível de expressão, natureza da proteína expressa e presença de chaperonas (UPADHYAY

et al., 2012; SINGH et al., 2015). Os corpúsculos de inclusão são agregados de proteínas densos, elétron-refrátéis, desprovidos de atividade biológica e devem ser submetidos à processos de isolamento, solubilização, renaturação e purificação para tornarem-se biologicamente ativos (SINGH; PANDA, 2005). O isolamento pode ocorrer por rompimento mecânico ou químico das células, seguida de centrifugação e lavagens sucessivas (JUNGBAUER; KAAR, 2007). Os agregados proteicos podem ser solubilizados em altas concentrações de agentes desnaturantes como ureia, cloridrato de guanidina, sais de tiocianato ou detergentes como dodecil sulfato de sódio, cloreto de N-cetiltrimetil amônio e N-laurilsarcosina (SINGH et al., 2015). Agentes redutores adicionais como β -mercaptoetanol, ditioneitol ou cisteína são comumente adicionados para auxiliar na solubilização dos corpúsculos de inclusão, mantendo os resíduos de cisteína no estado reduzido, prevenindo a formação de ligações dissulfeto não desejáveis (FISCHER, 1994; BURGESS, 1996; SINGH et al., 2012). Agentes quelantes como ácido etilenodiamino tetra-acético também podem ser adicionados ao tampão de solubilização para prevenir a oxidação dos resíduos de cisteína. As proteínas solubilizadas são então renaturadas na sua conformação original através da remoção dos agentes redutores, na presença de aditivos que melhoram a produção das proteínas bioativas como o L-arginina, dimetil sulfoxido e polietilenoglicol (FISCHER, 1994;). Apesar dos processos de solubilização dos corpúsculos de inclusão serem amplamente utilizados, eles são muito dispendiosos e o rendimento da proteína ativa obtida é baixo, em torno de 15 a 25% do total de proteína expressa. Dessa forma, é mais vantajoso prevenir a formação dos agregados do que submetê-los aos processos de solubilização tradicionais.

Uma das formas de se obter proteínas solúveis é através do uso de fragmentos de peptídeos não imunogênicos acoplados à extremidade N ou C-terminal de uma proteína de interesse, conhecidas como caudas ou *tags* de afinidade (TERPE, 2012). As *tags* possuem funções variadas, como: i) auxiliar na purificação da proteína alvo, como as caudas de poli-histidina (*His-tag*), proteínas ligadoras de maltose (MBP) ou glutathione S-transferase (GST); ii) facilitar a detecção e caracterização da proteína de interesse, como as caudas que atuam como epítopos FLAG ou epítipo do produto do proto-oncogene humano (c-Myc); iii) melhorar a solubilidade da proteína durante a expressão, como a *tag* de proteínas modificadoras pequenas relacionadas à ubiquitina (SUMO) ou tioredoxina (Trx);

entre outras (TABELA 1) (NGUYEN et al., 2014; WOOD, 2014). Ao longo dos anos, diversas *tags* de afinidade foram desenvolvidas e existem atualmente várias opções comerciais disponíveis, não existindo uma *tag* que possa ser utilizada para todas as proteínas produzidas em qualquer sistema de expressão. Na maioria das vezes, a escolha da *tag* adequada é empírica e depende de tentativa e erro, sendo que as características desejáveis de uma cauda são: custo, tamanho adequado, necessidade ou não de remoção após a expressão e pouco ou nenhum efeito na estrutura ou função da proteína alvo (YOUNG, 2012).

Tabela 1 – Diferentes tipos de *tags*. São apresentadas as principais classes de *tags* com exemplos, vantagens e limitações de uso. O tamanho da *tag* (vermelho) é representado proporcional à proteína alvo (azul). His *tag* = tag de histidina; FLAG = *tag* octapeptídeo DYDDDDK; c-Myc = *tag* do epítipo do produto do proto-oncogene humano; MBP = *tag* proteína ligadora a maltose; GST = *tag* glutationa-S-transferase; SUMO = tag de proteínas modificadoras pequenas relacionadas à ubiquitina; Trx = *tag* tioredoxina. (Adaptado de Wood, 2014)

Tipos de <i>tags</i>	Exemplos	Vantagens	Limitações
<p>His <i>tag</i></p>	His	<ul style="list-style-type: none"> Pouco efeito sobre a estrutura da proteína alvo Uso bem estabelecido Presente em sistemas de expressão comerciais 	<ul style="list-style-type: none"> Contaminantes podem ser co-purificados Pode interferir com a função da proteína alvo
<p><i>Tags</i> epítopos</p>	FLAG, c-Myc	<ul style="list-style-type: none"> Mínimo efeito sobre a proteína alvo Possibilita imunodeteção Pode ser codificada em primers para uso em PCR 	<ul style="list-style-type: none"> Depende de resinas muito caras É utilizada um número de vezes limitado
<p><i>Tags</i> domínios protéicos</p>	MBP, GST	<ul style="list-style-type: none"> Pode aumentar solubilidade da proteína alvo Ligação específica Depende de resina com melhor custo/benefício 	<ul style="list-style-type: none"> Pode diminuir o rendimento da proteína expressa Pode se desprender da coluna
<p><i>Tags</i> de solubilização</p>	SUMO, Trx	<ul style="list-style-type: none"> Pode aumentar solubilidade da proteína alvo Pode auxiliar na renaturação da proteína alvo 	<ul style="list-style-type: none"> Sequência de peptídeos grande, podendo diminuir o rendimento

1.5 O vetor pET28/NcMIC2-like1/1080

Golovanov e colaboradores (2004) e mais recentemente Shukla & Trout (2011) demonstraram que os aminoácidos polares arginina e ácido glutâmico, quando adicionados à solução tampão, são responsáveis pelo aumento da concentração da proteína recombinante na forma solúvel, prevenindo sua agregação e precipitação. Através de mutações sítio dirigidas em uma ribonuclease, Trevino (2007) avaliou a contribuição dos 20 aminoácidos essenciais para o aumento da solubilidade da proteína e constatou que os de natureza ácida em pH neutro, ácido glutâmico e ácido aspártico, contribuem mais com o aumento da solubilidade do que outros aminoácidos polares. Hedhammar (2004) desenvolveu uma nova estratégia de purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de troca iônica através da fusão da molécula alvo com domínios proteicos carregados negativamente. Mais recentemente, Sangawa e colaboradores (2013) utilizaram uma porção do domínio extracelular da proteína precursora amiloide humana (APP) rica em aminoácidos de natureza ácida para produzir uma *tag* de afinidade (FATT-fusion) capaz de facilitar a expressão e purificação de proteínas solúveis.

Da mesma forma, o pesquisador Luis Miguel Pereira (PEREIRA, 2013) em seu doutorado, identificou um fragmento rico em ácido glutâmico e ácido aspártico num contig de *N. caninum* denominado de Nc1081. Esta identificação foi possível a partir de buscas realizadas por meio de BLAST, utilizando um fragmento hipotético formado por códons de ácido glutâmico e ácido aspártico organizados em tandem, contra os dados de marcadores de sequencias expressas (ESTs) de *N. caninum* do Sanger Institute, já que à época o genoma não estava disponível. Atualmente, com o genoma de *N. caninum* sequenciado sabe-se que o Nc1081 localiza-se no cromossomo VIIa entre os nucleotídeos 2810969 e 2811148 numa porção não codificadora de um gene (Gene ID: 13444536).). O fragmento Nc1081 possui 185 pb, peso molecular de 7,1 kDa e pI de 3.44. Mais da metade do fragmento (55,7%) é constituído de ácido glutâmico destacando-se também a presença de ácido aspártico (13%), o que contribui para que 68,8% da molécula seja carregada negativamente (Figura 3A e 3B). Considerando que o fragmento Nc1081 poderia ser utilizado como uma *tag* de afinidade, melhorando a solubilidade das próprias

proteínas de *N. caninum* envolvidas na invasão do parasita, o fragmento foi clonado logo abaixo da sequência de interesse NcMIC2-like1 (Figura 3C). O fragmento foi amplificado, subclonado em pGEM para armazenamento, purificado e ligado ao plasmídeo pET28/NcMIC2-like1 (PEREIRA et al., 2011) gerando o vetor pET28/NcMIC2-like1/1080. A partir deste vetor, a proteína recombinante NcMIC2-like1/1080 foi expressa na forma solúvel, confirmando a hipótese do uso do fragmento rico em ácido glutâmico Nc1081 como uma possível *tag*, auxiliando na solubilização desta proteína.

A

```

1  GCGGAAGATA AAGAGGAGGA AGATGAAGAG GCGGAAGATG AAGCGACGGA
51 AGATAAAGAG GCGGAAGATA AAGAGGCGGA AGATGAAGAG GCGGAAGAGG
101 AAGAGGCGGA AGAGGAAGAG GCGGAAGATG ACGAACAGAA CGAAGAGGAA
151 GAGGGAGAGG AAAGAGAAGC CGAATCGCTC GAAGC

```

B

AEDKEEEDDEEAEDDEATEDKEAEDKEAEDDEEAEEEEAEDEDEQNEEEEGEEEAESLE 61

C

Figura 3 –Representação do fragmento Nc1081, fragmento genômico de *Neospora caninum* testado como potencial *tag* de solubilização. A – Sequência gênica do fragmento. B – Sequência protéica onde os aminoácidos ácidos são representados em azul (E = ácido glutâmico, D = ácido aspártico), básicos são representados em vermelhos (K= lisina, R = arginina), neutros contendo grupo amino são representados em marrom (Q = glutamina, N = asparagina), neutros contendo grupo hidroxila são representados em verde (T = treonina, S = serina) e os apolares são representados em cinza (A = alanina). C - O fragmento foi ligado “downstream” à proteína de interesse, utilizando as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI*, flanqueado por duas caudas de histidina clonado em pET28.

A produção de proteínas solúveis é essencial para sua utilização em ensaios *in vivo*. Contudo, além do baixo rendimento da proteína obtida nos processos tradicionais de solubilização, ela também pode conter contaminantes como ureia, que podem interferir nos resultados dos ensaios. A produção da proteína recombinante NcMIC2-like1 na forma solúvel foi possível devido ao uso de uma *tag* rica em ácido glutâmico Nc1081. Dessa forma, surgiu o interesse no uso desta *tag* para a obtenção de outras proteínas solúveis envolvidas na invasão e motilidade do parasita *N. caninum*, originalmente expressas na forma insolúvel, em estudo no Laboratório de Parasitologia Molecular da FCFRP-USP.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Produção de proteínas recombinantes solúveis de *Neospora caninum* através do uso da *tag* de afinidade Nc1081 e avaliação dos seus efeitos sobre a invasão e adesão do parasita na célula hospedeira.

2.2 Específicos

Alinhamento e predição das estruturas secundárias da proteína micronêmica 2 tipo 1 (NcMIC2-like1) e da proteína associada à adenil ciclase (NcCAP) de *N. caninum*;

Clonagem da NcCAP acoplada a *tag* Nc1081 e expressão da proteína recombinante NcMIC2-like1 e NcCAP na forma solúvel e insolúvel;

Detecção das proteínas recombinantes por ELISA;

Avaliação das proteínas solúveis através de ensaios *in vitro* de invasão e adesão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Alinhamento das sequências proteicas e predição das estruturas secundárias

Para a escolha das proteínas homólogas utilizadas no alinhamento sequencial da MIC2-like1 e CAP de *N. caninum* foi realizado BLAST com as sequências das proteínas depositadas no NCBI e foram escolhidas aquelas pertencentes ao filo Apicomplexa que possuíam maior porcentagem de identidade e similaridade calculadas utilizando o programa EMBOSS Needle.

Foi realizado o alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína micronêmica 2 tipo 1 de *N. caninum* (NcMIC2-like1, NCLIV_033690; gi:304347707) e seus homólogos MIC2 de *N. caninum* (NcMIC2, gi: 6017001); MIC2 de *T. gondii* (TgMIC2, gi:672572717); MIC2 de *H. hammondi* (HhMIC2, gi:675125172); MIC2 de *E. tenella* (EtMIC2, gi:557138642) com auxílio do programa Multalin. Para a predição da estrutura secundária, foi utilizado como modelo a proMIC2 de *Toxoplasma gondii*, depositado no PDB sob código de acesso 4OKU, com auxílio do programa ESPript. A busca por domínios conservados na proteína foi feita utilizando o programa Pfam.

Da mesma forma, foi realizado o alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína associada à adenil ciclase de *N. caninum* (NcCAP, NCLIV_054140; gi:401411135) e seus homólogos CAP de *H. hammondi* (HhCAP, gi:675129278), CAP de *T. gondii* (TgCAP, gi:237829903) e CAP de *E. tenella* (EtCAP, gi:557207171) com auxílio do programa Multalin. Para a predição da estrutura secundária, foi utilizado como modelo a CAP de *C. parvum*, depositada no PDB sob o código de acesso 2B0R, com auxílio do programa ESPript. A busca por domínios conservados na proteína foi feita utilizando o programa Pfam.

Para a predição da estrutura secundária da tag Nc1081 foi utilizado o programa Protean (DNASTar, Lasergene USA) que trabalha com algoritmos padrões, como Chou-Fassman e Garnier-Robson, para prever a presença de alfa-hélices e folhas-beta e a escala de Kyte-Doolittle para determinar o padrão de hidrofobicidade

dos aminoácidos. Inicialmente, a sequência de aminoácidos da *tag* foi salva num arquivo com extensão .PRO e o gráfico com a representação das estruturas secundárias foi gerado no formato PDB. O arquivo PDB da estrutura tridimensional da tag Nc1081 foi visualizada no programa NOC 3.01 e a distribuição das cargas elétricas na superfície da molécula foi feita utilizando a opção de visualização do potencial eletrostático disponível no programa.

3.2 Clonagem da NcCAP

A sequência gênica da proteína NcCAP, cedida pela doutoranda Luciana Baroni, foi ligada ao vetor contendo a *tag* Nc1081. Inicialmente, foi realizada a purificação do plasmídeo pGEM/NcCAP (pGEM®-T easy, Promega) contendo a sequência do gene, seguida do tratamento com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e purificação do inserto. O vetor pET28/NcMIC2-like1/1081 contendo a *tag* Nc1081, cedido pelo pós-doutorando Luis Miguel Pereira, foi previamente purificado e digerido com as mesmas enzimas de restrição para remoção da sequência do gene originalmente clonado NcMIC2-like1. Ao final, foi realizada a ligação do inserto ao vetor utilizando T4 ligase obtendo o vetor pET28/NcCAP/1081 que foi sequenciado para confirmação da identidade

3.2.1 Purificação dos plasmídeos

Colônias de *E.coli* TOP10 transformadas com os plasmídeos pGEM/NcCAP e pET28/NcMIC2-like1/1081 já se encontravam disponíveis no laboratório, armazenadas em estoque contendo glicerol 60%. Uma alíquota de cada estoque foi plaqueada em meio LB ágar (Luria-Bertani; 1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 1,5% Agar; pH 7,0) contendo 50 µg/mL de ampicilina e kanamicina, respectivamente, e foi incubada a 37°C por 18 horas. Uma colônia da placa foi inoculada em um tubo de 50 mL, contendo 5 mL de meio LB com 50 µg/mL de ampicilina e kanamicina, respectivamente, e foi incubado a 37°C por 18 horas,

sob agitação. A purificação dos plasmídeos foi feita utilizando o kit *miniprep* illustra plasmidPrep Mini Spin Kit System (GE Healthcare). O meio líquido foi transferido para um tubo de 1,5 mL, centrifugado a 10.000 g por 1 minuto a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido até se obter um pellet. O pellet foi ressuspenso em 175 µL de tampão de suspensão, seguido da adição de 175 µL de tampão de lise e a solução final foi homogeneizada por inversão. A seguir, foi adicionado 350 µL de tampão de lise à solução, seguido de centrifugação a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para mini coluna acoplada a um tubo coletor e foi centrifugado a 10.000 g a 4°C por 1 minuto e o líquido eluído foi descartado. Foi adicionado 400 µL de tampão de lavagem à coluna, seguida de centrifugação a 10.000 g a 4°C por 1 minutos. O líquido eluído foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada para remoção do resíduo do tampão de lavagem. A mini coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL novo e foi adicionada 60 µL de água MiliQ autoclavada seguida de centrifugação a 10.000 g por 1 minuto a 4°C. Os plasmídeos em água MiliQ foram armazenados a -20°C.

3.2.2 Tratamento com enzimas de restrição

Para os plasmídeos purificados, tanto o pGEM/NcCAP quanto pET28/NcMIC2-like1/1081, foram feitas digestões duplas com 1 µL da enzima de restrição *Bam*HI (10 U/µL, ThermoScientific) e 1 µL de *Hind*III (10 U/µL, ThermoScientific), 2 µL de tampão Buffer R (10x, ThermoScientific) e 16 µL da amostra em banho maria 37°C por 18h.

3.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Todo o conteúdo da reação de digestão foi aplicado em um gel de agarose 0,8% para eletroforese. O gel de agarose (Sigma) 0,8% foi preparado com tampão TAE (0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3) e 0,34 µg/mL de brometo de etídeo (solução 10 mg/mL, Promega) montado em uma cuba (Easy cast mini, Owl

Scientific), contendo tampão TAE e foi corrido sob voltagem de 100 volts e amperagem livre. As amostras foram preparadas em tampão de corrida 6x e foram utilizados 5 μ L do marcador molecular 1 Kb (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas). O gel foi visualizado em um fotodocumentador sob luz UV e as bandas correspondentes ao tamanho esperado da sequência gênica da proteína NcCAP, NcMIC2-like1 e do vetor foram excisadas e purificadas.

3.2.4 Purificação das bandas do gel de agarose

A purificação das bandas excisadas do gel de agarose foi realizada utilizando o kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Para cada 10 mg do gel foi adicionado 10 μ L do tampão de captura em um tubo de 1,5 mL. A amostra foi homogeneizada por inversão e foi incubada a 60°C por 15 minutos até a solubilização da agarose. Após a agarose ter se dissolvido, o líquido formado foi transferido para uma mini coluna acoplada a um tubo coletor e foi centrifugado a 10.000 g a 4°C por 1 minuto e o líquido eluído foi descartado. Foi adicionado 500 μ L de tampão de lavagem à coluna, seguida de centrifugação a 10.000 g a 4°C por 1 minuto. A mini coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL novo e foi eluída com 30 μ L de água MiliQ autoclavada seguida de centrifugação a 10.000 g 4°C por 1 minuto. Após a purificação, foi feita uma nova eletroforese em gel de agarose para avaliar visualmente o rendimento final, aplicando 8 μ L da amostra no gel e comparando a intensidade das bandas.

3.2.5 Ligação do inserto ao vetor

A sequência gênica da proteína NcCAP que estava ligada em pGEM e o vetor pET28/Nc1081, formado a partir da remoção da sequência NcMIC2-like1 originalmente clonada no vetor pET28/NcMIC2-like1/1081, foram submetidos a reação de ligação para obtenção do vetor pET28/NcCAP/1081. Foi feita uma ligação com 1 μ L de T4 ligase (0,5 U weiss/ μ L, Fermentas) previamente diluída em tampão

de T4 ligase 1x (Fermentas), 2 µL de tampão de T4 ligase 10x, 2 µL do vetor (50 a 100 ng) e 15 µL do inserto (150 a 300 ng). A reação foi incubada em banho-maria a 16°C por 18 horas.

3.2.6 Transformação em *Escherichia coli* eletrocompetentes

Após o tempo da reação de ligação, 1 µL da ligação pET28/NcCAP/1081 foi transferida para um tubo de 1,5 mL em banho de gelo e foram adicionados 50 µL de células eletrocompetentes *E.coli* TOP 10 previamente descongeladas, seguida de homogeneização. O conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta (Bio-Rad) de 2 mm e eletroporado no aparelho GenePulser Xcell (Bio-Rad) nas condições de 25 µF de capacitância, 200 Ω de resistência e 2,5 Kv de voltagem. Após a eletroporação, foram adicionados 250 µL de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glucose) à cubeta. O conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo de 1,5 mL e foi incubado sob agitação a 350 rpm, 37°C por 1 hora. Após este período, todo o conteúdo foi plaqueado em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de kanamicina e foi incubado a 37°C por 18 horas. Uma colônia da placa foi reinoculada em tubo de 50 mL, contendo 5 mL de meio LB e 50 µg/mL de kanamicina e foi purificado por miniprep. Para a verificação da presença do inserto com o tamanho esperado, foram realizadas digestões utilizando as enzimas *Bam*HI, *Hind*III e *Xho*I conforme descrito no item 3.2.2, seguido de eletroforese (item 3.2.3) Após confirmação da presença do inserto, os clones foram transformados utilizando *E.coli* BL21 e foram estocados em glicerol 60% a -80°C.

3.3 Expressão das proteínas recombinantes

Uma alíquota de cada estoque de *E.coli* BL21 transformada com os plasmídeos pET28/NcMIC2-like1/1081 contendo a sequência da proteína recombinante NcMIC2-like1 com a *tag* Nc1081 e pET28/NcCAP/1081 contendo a

sequência NcCAP com a *tag* Nc1081 (item 3.2) foram plaqueados em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de kanamicina e incubados a 37°C por 18 horas. Uma colônia de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio LB com 20 µg/mL de kanamicina e foi incubado a 37°C por 18 horas sob agitação. Após este período, uma alíquota de 125 µL de cada cultura foi transferida para um erlenmeyer com 50 mL de meio LB e 50 µg/mL de kanamicina em duplicata e foi incubado a 37°C por aproximadamente 3 horas sob agitação até a OD₆₀₀ alcançar 0,6. Após este período, foi adicionado 1 mM de IPTG (isopropiltiogalactosídeo, Promega) (Figura 4), em um dos frascos enquanto o outro foi utilizado como controle negativo e não recebeu IPTG. Tanto a cultura induzida como a não induzida foram incubadas a 37°C por 3 horas sob agitação e ao final foram centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos. O pellet resultante foi submetido à extração utilizando um sonicador (Sonifier Cell Disruptor, Branson) por 30 segundos em banho de gelo.

Para cada proteína expressa foram realizadas duas extrações diferentes, metade do pellet resultante foi submetido a extração sequencial com tampão ureia em diferentes molaridades e a outra metade foi submetida a extração total em tampão ureia 8M pH 8,0.

Para a extração sequencial, inicialmente metade do pellet foi sonificado com 0,6 mL de tampão Tris-NaCl pH 7,5 (100 mM NaH₂PO₄; 100 mM Tris-Cl), o conteúdo foi centrifugado a 4.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A seguir, foi adicionado 0,6 mL de tampão ureia 2M pH 8,0 (ureia 2M; 100 mM NaH₂PO₄; 100 mM Tris-Cl), o conteúdo foi centrifugado a 4.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O processo foi repetido da mesma forma utilizando os tampões uréia 4M e 8M na sequência até o pellet ser solubilizado por completo.

Para a extração total, foram realizados dois processos distintos de acordo com o tipo de proteína expressa. Para a proteína NcMIC2-like1/1081, a outra metade do pellet foi sonificada com 0,6 mL de tampão Tris-NaCl e a seguir foi adicionado uma quantidade de ureia suficiente para obter uma concentração 8M, o conteúdo foi centrifugado a 4.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido em outro tubo. Para a proteína NcCAP/1081, a outra metade do pellet foi sonificada com 0,6 mL de tampão ureia 8M pH 8,0, o conteúdo foi centrifugado a 4.000g por 10

minutos e o sobrenadante foi recolhido em outro tubo. O processo foi repetido novamente adicionando-se 0,6 mL de tampão ureia 8M pH 8,0 até o pellet ser solubilizado por completo.

Figura 4 – Indução, extração e purificação das proteínas recombinantes. Uma cultura de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET28/NcMIC2-like1/1081 e pET28/NcCAP/1081 foi induzida, centrifugada e metade do pellet foi submetido a extração total com alíquotas de ureia 8M pH 8.0. A outra metade do pellet foi extraída utilizando inicialmente tampão Tris-Cl pH 7.5 seguido de tampão ureia com molaridade crescentes 2M, 4M e 8M pH 8.0. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade utilizando tampão ureia 8M pH 6.3 e tampão de ligação pH 7.4 e a eluição foi feita com imidazol.

3.4 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi feita por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) utilizando uma coluna empacotada com 0,5 mL de resina de agarose carregada com íons metálicos tipo níquel (Ni Sepharose 6 Fast flow, GE Healthcare). Devido à presença da *tag* de histidina, as proteínas recombinantes se ligam aos íons Ni^{+2} na resina de agarose sendo desorvidas na presença do imidazol. O imidazol é capaz de interagir mais fortemente com os íons metálicos da resina do que as proteínas que ao final são

eluídas. A coluna foi mantida na vertical com auxílio de uma haste e foi colocado um filtro em sua base. A resina foi adicionada sobre o filtro e foi lavada com 3 mL de tampão ureia 8M pH 8,0 para remoção do etanol utilizado no armazenamento da resina. A coluna foi fechada embaixo e foi adicionado o conteúdo de 3,0 mL do extrato de uma das proteínas recombinantes. A coluna foi fechada em cima e foi mantida na horizontal em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação para adsorção das proteínas à resina. Após o tempo de agitação, a coluna foi aberta em cima e embaixo e o conteúdo da coluna foi recolhido em um tudo. A seguir, a coluna foi lavada com 12 mL de tampão ureia 8M pH 6,3 adicionando 1 mL em 1 mL à parede da coluna. Na sequência, a coluna foi lavada com 6 mL de tampão de ligação pH 7,4 (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 0,5 M) adicionando 1 mL em 1 mL à parede da coluna. A proteína foi eluída com alíquotas de 0,6 mL de tampão de eluição (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM). As alíquotas recolhidas na eluição foram analisadas por Bradford e foram agrupadas conforme intensidade da cor azul. As proteínas purificadas foram analisadas por eletroforese unidimensional.

3.5 Eletroforese unidimensional

As proteínas recombinantes foram visualizadas em géis SDS-PAGE 12,5%, sob voltagem fixa de 120 V e amperagem livre em tampão Tris-HCl-Glicina (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%). As amostras foram diluídas no tampão de corrida (Tris-HCl 187,5 mM pH 6,8; SDS 6%; glicerol 30%; azul de bromofenol 0,03%; DTT 26 mg/mL) e foi utilizado o marcador de peso molecular Protein MW Marker (Fermentas).

3.6 Coloração dos géis por coomassie blue G

Após a corrida, os géis foram incubados por 1 hora em solução fixadora (ácido fosfórico 8%; metanol 50%) sob agitação a temperatura ambiente, seguida de lavagens com água Mili-Q. Após as lavagens, os géis foram incubados em solução

de comassie G-250 (sulfato de amônio 180 g/L; metanol 34%; ácido fosfórico 3,5% v/v; comassie G-250 0,1%) por 3 dias sob agitação.

3.7 Quantificação das proteínas recombinantes pelo método de Bradford

As proteínas rNcMIC2like-1, rNcMIC2like-1/1081 e rNcCAP, rNcCAP/1081 utilizadas no ensaio de ELISA e no ensaio de invasão foram quantificadas pelo método de Bradford. Foram preparadas diluições das proteínas recombinantes na proporção de 1:2; 1:4; 1:10; 1:20 em solução de ureia 8M, em duplicata. As diluições (20 µL) foram aplicadas em 200 µL de reagente de Bradford (Sigma) em uma placa de 96 poços (Maxi Sorb, Nalgene Nunc) e a absorbância foi medida num leitor de ELISA (Sunrise Tecan) a 595 nm. Foi preparada uma curva padrão utilizando albumina bovina sérica acetilada (BSA) nas concentrações 1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL em solução de ureia 8M, em duplicata, aplicando 20 µL das amostras em 200 µL de solução de Bradford. A média da absorbância das diluições de BSA, descontada do branco, foi submetida à regressão linear obtendo uma curva padrão. A concentração das proteínas foi calculada utilizando o valor médio da absorbância das proteínas descontada do branco, aplicada à equação da reta, multiplicado pelo fator de diluição.

3.8 Detecção das proteínas recombinantes por ELISA

De forma a verificar se as proteínas recombinantes solúveis contendo a *tag* rica em ácido glutâmico interferiam no reconhecimento dos respectivos soros policlonais, as proteínas com e sem a sequência Nc1081 foram testadas utilizando o ensaio de ELISA.

As proteínas recombinantes foram previamente purificadas em coluna de Sephadex™ G-25M (GE Healthcare) para remoção do imidazol utilizado na purificação. O volume total das proteínas obtidas na expressão foi adicionado à

coluna e a eluição foi realizada utilizando alíquotas de 0,6 µL de tampão de ligação pH 7,4 (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 0,5 M). As alíquotas recolhidas na eluição foram analisadas por Bradford e foram agrupadas conforme intensidade da coloração azul.

As placas foram sensibilizadas com as proteínas rNcMIC2like-1, rNcMIC2like-1/1081 e rNcCAP, rNcCAP/1081 na concentração de 5 µg/mL, utilizando tampão carbonato (Na_2CO_3 0,06 M pH 9,6), em duplicata, em uma placa de ELISA 96 poços (Maxi Sorb, Nalgene, Nunc) por incubação à temperatura ambiente por 16 horas. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% de Tween 20, Sigma Aldrich) e bloqueadas com PBS-GT (PBS-T com 2mg/mL de gelatina suína, Sigma) a 37°C por 1 hora. Após o tempo de incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e foram adicionados os soros correspondentes nas diluições 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000 em PBS-GT e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora

Para as proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 foram utilizados soro total anti-NcMIC2-like1 produzidos em coelho durante a dissertação de mestrado de Luiz Miguel Pereira (PEREIRA, 2011). Para as proteínas rNcCAP/1081 e rNcCAP foram utilizados soro total anti-NcCAP produzidos em camundongos durante a dissertação de mestrado de Luciana Baroni (BARONI, 2012).

Após a incubação da proteína recombinante com seu respectivo soro, a placa foi novamente lavada com PBS-T três vezes. O anticorpo secundário anti-coelho conjugado à enzima peroxidase foi adicionado às placas na diluição de 1:10000 para as proteínas NcMIC2-like1/1081 e NcMIC2-like1 e o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à enzima peroxidase na diluição 1:5000 e 1:10000 para as proteínas NcCAP/1081 e NcCAP. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora e lavada com PBS-T três vezes. O reagente TMB (Life Technologies) foi adicionado e a reação foi incubada a 50°C com agitação por 15 minutos. A reação foi interrompida adicionando H_2SO_4 2M e a absorbância foi medida num leitor de ELISA a 450 nm.

3.9 Avaliação das proteínas recombinantes solúveis e seus efeitos através de ensaio de invasão

Com objetivo de avaliar se as proteínas recombinantes solúveis contendo a *tag* rica em ácido glutâmico interferiam no processo de invasão celular pelo taquizoíta de *N. caninum*, as proteínas com e sem a sequência Nc1081 foram incubadas em culturas de células VERO e foram inoculadas com taquizoítas NcLacZ purificados. Após o tempo de invasão, foi feita a lise de todo o conteúdo celular seguido do ensaio de CPRG que é capaz de correlacionar a intensidade da coloração observada à quantidade de taquizoítas que invadiram as células hospedeiras.

3.9.1 Cultura de células VERO

Culturas de células VERO foram mantidas em garrafas de 25 cm² a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI 1640 com 2 mM de glutamina (Sigma) contendo 5% de soro fetal (Gibco) e 10 µg/mL de kanamicina (Gibco). Após 5 dias, as culturas de células VERO das garrafas foram tripsinizadas e transferidas para placas de 24 poços (Costar), adicionando 1 mL de cultura por poço e foram mantidas a 37°C com 5% CO₂ até confluência após aproximadamente 2 dias.

3.9.2 Cultura e purificação de taquizoítas de *Neospora caninum* marcados com LacZ (NcLacZ)

Os taquizoítas NcLacZ utilizados no ensaio de invasão foram descritos por Pereira et. al (2014), contendo o gene de resistência a pirimetamina DHFRM2M3 e o gene repórter Lac-Z. Os taquizoítas desta linhagem são utilizados em ensaios de

invasão, pois são capazes de expressar a enzima β -galactosidase de forma estável. Sendo assim, pode-se correlacionar a quantidade de taquizoítas que invadiram a célula VERO à capacidade da enzima β -galactosidase hidrolisar o análogo de galactosídeo CPRG (chlorophenolred- β -D-galactopyranoside, Roche). Isto é verificado através da mudança da cor amarela para vermelho escuro, medida num leitor de ELISA a 570 nm. Portanto, quanto maior a absorbância, maior o número de taquizoítas que invadiram as células.

Taquizoítas NcLacZ estáveis foram inoculados previamente em garrafas contendo células VERO confluentes e foram mantidos a 37°C com 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 com 2 mM de glutamina e kanamicina. 10 µg/mL. Após uma semana da inoculação, as células infectadas foram removidas do fundo da garrafa com auxílio de um scraper e o conteúdo foi lisado por passagens sucessivas através de uma agulha 26G. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 mL e foi centrifugada por 5 minutos a 3.500 x g a 4°C. O pellet obtido foi ressuspensão em 1 mL de RPMI sem fenol e a seguir foi feita uma diluição 1:100 em RPMI sem fenol. Desta diluição, 10 µL foi aplicado em uma câmara de Neubauer para contagem dos taquizoítas. Após a contagem, o volume da suspensão de taquizoítas foi ajustado para se obter 5 x 10⁵ a 1 x 10⁶ taquizoítas por mL.

3.9.3 Ensaio de invasão

As proteínas rNcMIC2like-1, rNcMIC2like-1/1081 e rNcCAP, rNcCAP/1081 foram previamente purificadas em coluna de Sephadex™ G-25M (GE Healthcare) para remoção do imidazol utilizado na indução de expressão, conforme descrito no item 3.8. As alíquotas recolhidas na eluição foram analisadas por Bradford e agrupadas conforme intensidade da cor azul. Após a purificação, as alíquotas de cor azul mais intensa foram analisadas conforme descrito no item 3.7.

Foi adicionado 1 mL de cada proteína purificada sem imidazol por poço, contendo células VERO confluentes, nas concentrações de 5 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,05 mg/mL em duplicata, utilizando RPMI sem fenol. Como controle positivo foram utilizados taquizoítas NcLacZ purificados incubados apenas em meio RPMI sem

fenol e como controle negativo foi utilizado apenas RPMI sem fenol, sem taquizoítas. As proteínas foram incubadas na placa contendo células VERO a 37°C com 5% CO₂ por 1 hora e após o tempo de incubação a placa foi lavada duas vezes com PBS 1x.

Após a lavagem da placa, foram inoculados 1 mL da suspensão contendo 5×10^5 a 1×10^6 taquizoítas NcLacZ purificados por poço e a placa foi incubada a 37°C com 5% CO₂ por 2 horas, tempo para que ocorresse a invasão celular pelos taquizoítas. Após o tempo de incubação, a placa foi lavada duas vezes com PBS 1x para remoção dos taquizoítas NcLacZ que não haviam invadido as células.

3.9.4 Lise celular e ensaio de CPRG

Após a lavagem, foi adicionado 500 µL de tampão de lise (100 mM Hepes pH 8, (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico) 5 mM MgSO₄.7H₂O; 1% Triton X-100; 30 mg DTT; 0,5% SDS) seguida de uma incubação a 50°C por 1 hora, sob agitação a 125 rpm para a lise do conteúdo celular e recuperação dos taquizoítas NcLacZ. Após o tempo de incubação, o conteúdo de cada poço foi transferido para um tubo de 1,5 mL e foi centrifugado a 100 rpm. O sobrenadante de cada tubo (50 µL) foi adicionado a 200 µL de tampão CPRG (100 µL reagente CPRG; 15 µL de uma solução 100 mM Hepes pH 8; 5 mM MgSO₄.7H₂O; 1% Triton X-100; 10 mg DTT) em triplicata em uma placa de 96 poços (Maxi Sorb, Nalgene Nunc). A reação foi incubada a 37°C até que ocorresse a mudança da cor amarela para vermelho escuro. A leitura da absorbância foi feita num leitor de ELISA a 570 nm.

3.10 Ensaio de adesão (*binding*)

Foram realizados ensaios de adesão em que as proteínas, rNcMIC2like-1/1081 e rNcCAP/1081 foram adsorvidas em uma coluna e o extrato de uma cultura de células VERO ou de taquizoítas de *N. caninum* foi incubado à coluna, seguido da eluição das proteínas e detecção das mesmas por eletroforese unidimensional.

Quando comparado o ensaio de adesão da proteína recombinante incubado com o extrato de *N. caninum* com o ensaio de adesão da mesma proteína com o extrato de VERO, as bandas exclusivas à *N. caninum* foram analisadas por espectrometria de massas para identificação de possíveis domínios relacionados à interação proteína-proteína.

Inicialmente, foi feita a expressão das proteínas recombinantes a partir do estoque de *E.coli* BL21 transformado com os plasmídeos pET28/NcMIC2-like1/1081 ou pET28/NcCAP/1081, conforme procedimento descrito no item 3.3. Os pellets das proteínas recombinantes obtidos a partir das culturas induzidas com IPTG foram submetidos à extração total com alíquotas de 0,6 mL de tampão ureia 8M pH 8,0 até o pellet ser solubilizado por completo. As alíquotas correspondentes ao extrato da proteína recombinante foram agrupadas.

Uma coluna empacotada com 0,5 mL de resina de agarose-níquel, (Ni Sepharose 6 Fast flow, GE Healthcare) foi lavada com 3 mL de tampão ureia 8M pH 8,0. Foi adicionado o conteúdo de 3,0 mL do extrato de uma das proteínas recombinantes à coluna e esta foi mantida na horizontal em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação. Após o tempo de agitação, a coluna foi aberta e o conteúdo foi recolhido. A coluna foi lavada com 5 mL de tampão ureia 8M pH 6,3 seguido de 6 mL de tampão de ligação pH 7,4. Nesta etapa, a proteína recombinante mantém-se adsorvida à resina de agarose-níquel uma vez que não foi feita a eluição com tampão contendo imidazol.

Uma cultura de células VERO foi mantida em uma garrafa (item 3.9.1) até confluência após aproximadamente 5 dias. As células foram removidas com auxílio de um scraper e o conteúdo foi lisado por passagens sucessivas através de uma agulha 26G. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 mL e foi centrifugada por 5 minutos a 3500 x g a 4°C. O pellet obtido foi submetido à extração total com alíquotas de 0,6 mL de G-buffer (2 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,2 mM ATP; 0,2 mM DTT; 1 mM azida; 0,2 mM CaCl₂) até o pellet ser solubilizado por completo. As alíquotas correspondentes ao extrato da cultura de células VERO foram agrupadas.

Taquizoítas Nc1 selvagem inoculados em células VERO (item 3.9.2) foram mantidos em cultura até o completo rompimento das células, após uma semana da inoculação. As células infectadas foram removidas do fundo da garrafa, com auxílio

de um scraper e o conteúdo foi lisado por passagens sucessivas através de uma agulha 26G. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 mL e foi centrifugada por 5 minutos a 3500 x g a 4°C. O pellet obtido foi submetido à extração total com alíquotas de 0,6 mL de G-buffer (2 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,2 mM ATP; 0,2 mM DTT; 1 mM azida; 0,2 mM CaCl_2) até o pellet ser solubilizado por completo. As alíquotas correspondentes ao extrato de taquizoítas de *N.caninum* foram agrupadas.

Foi adicionado 3,0 mL do extrato de uma cultura de células VERO ou de taquizoítas de *N.caninum* à coluna contendo as proteínas recombinantes adsorvidas na resina de agarose-níquel, a coluna foi mantida na horizontal em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação, quando o conteúdo foi recolhido. A seguir, a coluna foi lavada com 6 mL de tampão de ligação pH 7,4 (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 0,5 M). As proteínas foram eluídas com alíquotas de 0,6 mL de tampão de eluição (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 500 mM). As alíquotas recolhidas na eluição foram analisadas por Bradford e foram agrupadas conforme intensidade da cor azul. As proteínas eluídas foram analisadas por eletroforese unidimensional e as bandas não específicas localizadas no gel de acrilamida foram analisadas por espectrometria de massas.

3.11 Espectrometria de massas

3.11.1 Preparo das amostras

As bandas exclusivas à *N. caninum*, quando comparadas com extrato de VERO, localizadas no gel de acrilamida foram excisadas e as proteínas foram digeridas para a análise de espectrometria de massas (MS). Os géis foram inicialmente descorados para remoção do Coomassie G-250 com três lavagens em solução de NH_4HCO_3 25 mM, pH 8,0 em acetonitrila (ACN) 50%. Após descoloração, os géis foram incubados em solução de DTT 6,5 mM em NH_4HCO_3 25mM pH 8,0 à 60°C por 1 hora sob agitação para redução das pontes dissulfeto. A seguir, foi feita uma desidratação dos géis com ACN 100% por 10 minutos, seguida de uma

incubação em solução de iodocetamina 54 mM em NH_4HCO_3 25mM pH 8,0 a temperatura ambiente por 25 minutos para alquilação das cisteínas reduzidas. Uma nova lavagem com solução de NH_4HCO_3 25 mM, pH 8,0 foi feita, os géis foram novamente desidratados com ACN 100% até ficarem brancos e foram secos em centrífuga à vácuo (Centrivap Concentrator, Labconco).

As proteínas foram digeridas em solução de 15 μL de tripsina 25 ng/mL (TrypsinGold, Promega) em NH_4HCO_3 25mM pH 8,0. Os géis foram mantidos em solução à temperatura ambiente por 30 minutos. Foi adicionado 50 μL de NH_4HCO_3 25mM pH 8,0 suficiente para cobrir o gel e a digestão foi mantida em estufa 37°C por 16 horas.

Os peptídeos secos após a digestão foram ressuspensos em solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água. Foi realizada a purificação dos peptídeos com auxílio de ponteiras especiais para pipetagem (ZipTip C18 Pipette Tips, Millipore) que possuem uma matriz cromatográfica do tipo C_{18} acoplada à sua ponta. A purificação foi feita através de passagens sucessivas da amostra pela ponteira em diferentes soluções. Inicialmente, a matriz cromatográfica acoplada a ponteira foi equilibrada, utilizando uma solução de ACN 100% seguida de uma solução de TFA 0,1% em água. A solução de tripsina e peptídeos foi pipetada dez vezes através da ponteira permitindo que seu conteúdo ficasse retido na matriz e o conteúdo foi dispensado em um tubo contendo solução de TFA 0,1% em água. A seguir, foi feita uma lavagem da matriz em solução de TFA 0,1% e metanol 5% em água. Ao final, os peptídeos foram eluídos utilizando uma solução de TFA 0,1% e ACN 50%. A solução contendo os peptídeos purificados foi seca em centrífuga à vácuo e armazenada a 4°C até sua utilização. Quando os peptídeos foram ressuspensos em matriz de alfa-ciano-4-hidroxicinâmico para análise em ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).

3.11.2 Identificação de proteínas por MS-MALDI

Os peptídeos foram analisados no equipamento de ionização/dessorção a laser assistida por matriz MALDI-TOF-TOF (UltraFlex II- Bruker®) na Central de

Espectrometria de Massas FCFRP. A busca para identificação das proteínas foi feita utilizando o programa Mascot (Matrix Science) acessando o banco de dados de *N. caninum* licenciado para o Laboratório Nacional de Luz Síncroton. Foi incluída como modificação fixa a carbamidometilação de cisteína e como modificação variável a oxidação de metionina. Os limites de tolerância foram 1.2 Da para íons precursores e 0.6 Da para fragmentos de íons.

3.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas do ensaio de ELISA e ensaio de invasão foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad, USA) com análise de variância ANOVA. A comparação do reconhecimento das proteínas recombinantes com e sem a *tag* Nc1081 pelos respectivos soros assim como a comparação da invasão das células VERO previamente incubadas com as proteínas recombinantes com e ou sem a *tag* Nc1081 pelos taquizoítas NcLacZ foram feitas aplicando o teste de Bonferroni, considerando diferença significativa menor que 0.05.

4. RESULTADOS

4.1 Alinhamento das sequências das proteínas homólogas e predição das estruturas secundárias

Os alinhamentos das sequências das proteínas micronêmica 2 tipo 1 (MIC2-like1) e adenil ciclase (CAP) de *Neospora caninum* com seus homólogos de *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* e *Hammondia hammondi*, juntamente com a predição das estruturas secundárias, foram apresentados nas Figuras 5 e 6 respectivamente.

NcMIC2-like1 possui 41,6% de identidade e 57,5% de similaridade com a NcMIC2; 38% de identidade e 52,0% de similaridade com a proteína TgMIC2; 44,6% de identidade e 57,1% de similaridade com HhMIC2 e 44,3% de identidade e 59,4% de similaridade com a proteína EtMIC2. A proMIC2 de *Toxoplasma gondii* utilizada no alinhamento estrutural possui 37% e 58% de identidade e similaridade com a MIC2-like1. A proteína MIC2-like1 possui um domínio tipo A do fator de Von Willebrand (VWA) e seis domínios trombospondina tipo 1 (TSR). O domínio VWA (traço azul, Figura 5) é composto por sete alfa-hélices, seis folhas-beta e uma região formada pelos aminoácidos DXSXS que corresponde a um sítio de adesão a um íon metálico (MIDAS) (seta preta, Figura 5). Não foi possível prever as seis estruturas dos domínios TSR da NcMIC2-like1, uma vez que o modelo da proMIC de *T. gondii* utilizado não compreendia toda a extensão da proteína. O alinhamento estrutural permitiu identificar que o domínio TSR1 (primeiro traço laranja, Figura 5) é composto por quatro folhas-beta, além de três ligações dissulfeto (números em verde abaixo da sequência, Figura 5) e uma região rica em prolina entre as folhas-beta9 e beta10 (seis pontos pretos, Figura 5).

CAP de *Neospora caninum* possui 83,0% de identidade e 87,4% de similaridade com ambas HhCAP e TgCAP e 39,6% de identidade e 54,1% de similaridade com a EtCAP. A CAP de *Cryptosporidium parvum* escolhida para o alinhamento seqüencial possui 47% e 65% de identidade e similaridade com a NcCAP. A proteína CAP possui um domínio único associado à adenil-ciclase tipo C

(CAP C). O domínio CAP-C (traço verde, Figura 6) é formado por 14 folhas-beta contíguas, por resíduos de serina-cisteína conservados (quatro pontos pretos, Figura 6) e uma sequência de aminoácidos PEQ indicativo da formação de um dímero (seta preta, Figura 6).

Figura 5 – Alinhamento das sequências das proteínas micronêmicas homólogas e predição da estrutura secundária da MIC2-like1. proMIC2 de *Toxoplasma gondii* cuja estrutura secundária foi resolvida e depositada no PDB sob código de acesso 4OKU utilizada como molde para a predição da estrutura de NcMIC2-like1; proteína micronêmica 2 tipo 1 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1); proteína micronêmica 2 de *Neospora caninum* (NcMIC2); proteína micronêmica 2 de *Toxoplasma gondii* (TgMIC2); proteína micronêmica 2 putativa de *Eimeria tenella* (EtMIC2) e proteína micronêmica 2 de *Hammondia hammondi* (HhMIC2). Os quadrados azuis com as letras vermelhas representam regiões conservadas por similaridade e as letras brancas sobre fundo vermelho representam regiões estritamente idênticas. O traço azul representa a posição do domínio tipo A de Von Willebrand (VWA) e os traços laranjas representam os domínios trombospondina tipo 1 (TSR). As estruturas secundárias estão representadas acima das sequências de aminoácidos; as setas representam as folhas-beta (β); os espirais as alfa-hélices (α). As pontes dissulfeto estão numeradas em verde abaixo da sequência. A seta vertical preta indica a posição do sítio MIDAS (DXSXS). Os pontos pretos abaixo da sequência indicam os aminoácidos prolina que caracterizam o domínio TSR1 na NcMIC2-like1.

Figura 6 – Alinhamento das sequências das proteínas associadas à adenil-ciclase homólogas e predição da estrutura secundária da CAP. CAP de *Cryptosporidium parvum* cuja estrutura foi resolvida e depositada no PDB sob código de acesso 2B0R utilizada como molde para a predição da estrutura de NcCAP; proteína associada à adenil ciclase de *N. caninum* (NcCAP); proteína associada à adenil ciclase de *Toxoplasma gondii* (TgCAP); proteína associada à adenil ciclase putativa de *Eimeria tenella* (EtCAP) e proteína associada à adenil ciclase de *Hammondia hammondi* (HhCAP). Os quadrados azuis com as letras vermelhas representam regiões conservadas por similaridade e as letras brancas sobre fundo vermelho representam regiões estritamente idênticas. O traço verde representa a posição do domínio CAP-C. As estruturas secundárias estão representadas acima das sequências de aminoácidos; as setas representam as folhas-beta (β). A seta vertical preta indica a posição da sequência PEQ. Os quatro pontos pretos abaixo da sequência indicam onde ocorre ligação de hidrogênio entre resíduos de cisteína-serina.

De acordo com os algoritmos utilizados pelo programa Protean, a estrutura da *tag* é formada exclusivamente de uma alfa-hélice. As duas barras vermelhas no gráfico gerado pelo programa (identificadas como A na Figura 7) representam uma única alfa-hélice ao longo de toda a extensão da sequência de aminoácidos (traço numerado de 1 a 61 acima do gráfico, Figura 7A). A primeira barra vermelha representa a estrutura da alfa-hélice predita utilizando o algoritmo de Garnier-Robson e a segunda representa a estrutura da alfa-hélice pelo algoritmo de Chou-Fasman. Não há predição para folhas-beta e demais estruturas secundárias como pode ser observado pelos traços únicos sem preenchimento (identificados como B, T e C na Figura 7A). Já na escala de hidrofiliicidade, em que o score de cada aminoácido varia de - 4.5 a 4.5, a *tag* foi predita como hidrofílica.

A representação da estrutura tridimensional da *tag* (Figura 7B) é de uma única alfa-hélice onde as ligações peptídicas entre os grupos N-H e C=O da cadeia principal estão representadas na forma de uma fita e as cadeias laterais dos aminoácidos estão representadas como hastes. Cada aminoácido é representado por uma cor agrupado de acordo com a sua natureza, os ácidos são representados em azul (E = ácido glutâmico, D = ácido aspártico), básicos são representados em vermelhos (K= lisina, R = arginina), neutros contendo grupo amino são representados em marrom (Q = glutamina, N = asparagina), neutros contendo grupo hidroxila são representados em verde (T = treonina, S = serina) e os apolares são representados em cinza (A = alanina). Dessa forma, é possível visualizar a natureza ácida da *tag*.

A estrutura eletrostática da *tag* Nc1081 é representada na figura 7C, destacando a distribuição das cargas negativas na sua superfície, considerando o pH do meio 7.0. Mesmo sendo composta por aminoácidos de naturezas diversas, a carga negativa na *tag* Nc1081 encontra-se igualmente dispersa na superfície da molécula.

Figura 7 – Representação da estrutura predita da tag Nc1081. A – predição das estruturas secundárias geradas pelo programa Protean, as duas barras vermelhas indicam que de acordo com o algoritmo de Garnier-Robson e Chou-Fasman a tag é formada somente de alfa-hélice, a última barra azul indica que a tag é hidrofílica segundo a escala de hidrofiliidade de Kyte-Doolittle B – representação da estrutura tridimensional da tag Nc1081 com a cadeia principal na forma de fita e a lateral formada por hastes, a molécula encontra-se centrada no aminoácido ácido glutâmico na posição 30, com destaque para a sua cadeia lateral (bolas amarelas). Os aminoácidos ácidos são representados em azul (E = ácido glutâmico, D = ácido aspártico), básicos são representados em vermelhos (K= lisina, R = arginina), neutros contendo grupo amino são representados em marrom (Q = glutamina, N = asparagina), neutros contendo grupo hidroxila são representados em verde (T = treonina, S = serina) e os apolares são representados em cinza (A = alanina). C – representação da superfície eletrostática da tag Nc1081, na figura esquerda a molécula encontra-se centrada no aminoácido ácido glutâmico na posição 30, à direita a molécula num giro de 180° as cargas são representadas numa escala de cores que varia de vermelho (-4,09) a azul (4,09), porém não é visualizada nenhuma região azul, o que demonstra que a superfície é composta por cargas negativas igualmente distribuídas na superfície.

4.2 Clonagens de NcCAP e NcMIC2-like1

O clone de NcMIC2-like 1 no plasmídeo pET28/1081 foi reativado a partir de um estoque em glicerol (PEREIRA et al., 2013). O plasmídeo pET28/NcMIC2-like1/1081 foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e aplicado em um gel de agarose para submissão à eletroforese. Após a corrida, foi possível observar dois fragmentos, o maior deles de 6000 pb corresponde ao plasmídeo pET28 (fragmento superior poços 1, Figura 8A) enquanto o menor, localizado entre 1000 e 1500 pb, equivale ao fragmento NcMIC2-like1 de 1122 pb (fragmento inferior poços 1, figura 8A).

NcCAP encontrava-se previamente clonada em pGEM (BARONI, 2016) e foi reativada da mesma forma. O plasmídeo pGEM/NcCAP foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, liberando um fragmento de 3015 pb que corresponde ao plasmídeo pGEM (fragmento superior poços 2, Figura 8A) e outro de 750 pb que corresponde ao NcCAP (fragmento inferior poços 2, Figura 8A).

Para confirmar a presença da *tag* Nc1081 no plasmídeo pET28/NcMIC2-like1/1081, foi feita uma digestão com as enzimas *Hind*III e *Xho*I e foi observada a presença de um fragmento maior de 6000 pb que corresponde ao pET28/NcMIC2-like1 (fragmento superior poços 1, Figura 8B) e um menor que 250 pb que corresponde a *tag* Nc1081 de tamanho esperado 185 pb (fragmento inferior poços 1, Figura 8B).

Figura 8 – Digestão de pET28/NcMIC2-like1/1081 e pGEM/NcCAP para purificação e clonagens posteriores. Géis de agarose 0,8% contendo M: marcador molecular (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas); A – Digestão com *Bam*HI e *Hind*III - poços 1: plasmídeo pET28/NcMIC2-like1/1081; 2: plasmídeo pGEM/NcCAP; B – Digestão com *Hind*III e *Xho*I 1: plasmídeo pET28/NcMIC2-like1/1081 .

O plasmídeo pET28/NcCAP/1081 foi obtido após a clonagem da sequência gênica de NcCAP no vetor pET28 contendo a. *tag* Nc1081. Para conferir a presença dos insertos no plasmídeo foi feita uma digestão tripla com *Bam*HI, *Hind*III e *Xho*I observando-se a liberação de três fragmentos. O maior deles de 6000 pb corresponde ao pET28 (fragmentos superiores poços 1, 2, 3 e 4, Figura 9) um fragmento de tamanho intermediário de 750 pb que corresponde à NcCAP (fragmento intermediário poço 4, figura 9) e um menor de 184 pb que corresponde à *tag* Nc1081 (fragmento inferior poço 4 , Figura 9). O sequenciamento confirmou a presença de NcCAP e da *tag* Nc1081

A mesma digestão tripla para conferir a presença dos insertos foi realizada para todos os outros plasmídeos clonados que estavam em estoque. A digestão do plasmídeo pET28/NcMIC2-like1/1081 também liberou três fragmentos correspondentes aos plasmídeos pET28 (fragmento superior poço 3, Figura 9), inserto NcMIC2-like1 (fragmento intermediário poço 3, Figura 9) e *tag* Nc1081 (fragmento inferior poço 3, Figura 9). A digestão dos plasmídeos pET28/NcMIC2-like1 e pET28/NcCAP liberou apenas dois fragmentos que correspondem aos plasmídeos pET28 e aos insertos NcMIC-like1 (poço 1, Figura 9) e NcCAP, (poço 2, Figura 9) respectivamente.

Figura 9 – Digestão de pET28/NcMIC2-like1 e pET28/NcCAP com e sem *tag* após clonagem. Gel de agarose 0,8% contendo M: marcador molecular 1 Kb (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas). Poço 1: Digestão *Bam*HI e *Hind*III pET28/NcMIC2-like1; poço 2: Digestão *Bam*HI e *Hind*III pET28/NcCAP; poço 3: Digestão *Bam*HI, *Hind*III e *Xho*I pET28/NcMIC2-like1/1081; poço 4: Digestão *Bam*HI, *Hind*III e *Xho*I pET28/NcCAP/1081.

4.3 Expressão e purificação das proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcCAP/1081

Os plasmídeos pET28/NcMIC2-like1/1081 e pET28/NcMIC2-like1 foram induzidos e os pellets resultantes da expressão das proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 foram submetidos à extração total com tampão Tris-Cl, seguido de purificação por IMAC. O resultado da purificação encontra-se na figura 10, com as proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 induzidas e não induzidas antes da purificação (poços 1 a 4, Figura 10) e as proteínas após a purificação (poços 5 a 8, Figura 10). Foi observado que a proteína com a *tag* Nc1081, com peso predito de 51 kDa, após a purificação apresentou um padrão de três bandas com aproximadamente 43, 48 e 60 kDa (poço 5 e 6, Figura 10), valor próximo dos verificados pela patente (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2011). Enquanto a proteína sem a *tag* Nc1081, induzida e não-induzida, após a purificação, apresentou um padrão de duas bandas com aproximadamente 43 e 48 kDa, porém bem menos abundante (poço 7 e 8, Figura 10).

Figura 10 - Extração total da proteína rNcMIC2-like1 com e sem tag Nc1081 em tampão Tris-Cl seguida de purificação em coluna de IMAC. Gel de acrilamida 12,5% corado com Comassie G-250 contendo M: marcador molecular (Protein MW Marker, Fermentas). Proteína rNcMIC2-like1 com tag Nc1081 induzida (poço 1) e não induzida (poço 2); Proteína rNcMIC2-like1 sem tag induzida (poço 3) e não induzida (poço 4); Proteína rNcMIC2-like1 com tag induzida purificada (poço 5); e não induzida purificada (poço 6); Proteína rNcMIC2-like1 sem tag induzida purificada (poço 7) e sem tag não induzida purificada (poço 8). Retângulo vermelho: 3 bandas de expressão da proteína rNcMIC2-like1 com a tag Nc1081 purificada e 2 bandas da proteína rNcMIC2-like1 purificada sem a tag Nc1081.

A indução do plasmídeo pET28/NcCAP/1081 resultou na expressão de uma proteína recombinante de aproximadamente 38 kDa, sendo o peso predito de 30 kDa (Figura 11). O pellet da expressão da proteína rNcCAP/1081 foi submetido ao teste de solubilidade, verificando-se que a proteína foi obtida na forma solúvel tanto na forma induzida quanto não-induzida (poços 1 e 2, Figura 11). A proteína ainda pôde ser encontrada em quantidade decrescente na forma solúvel no tampão ureia 2M, 4M e 8M, conforme pode ser observado na figura 11 poços 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Figura 11 - Teste de solubilidade da proteína rNcCAP/1081. Gel de acrilamida 12,5% corado com Comassie G-250 contendo M: marcador molecular (Protein MW Marker, Fermentas). Poço 1: proteína induzida extraída com tampão Tris-Cl; 2: proteína não induzida extraída com tampão Tris-Cl; 3: ind. ext. tampão ureia 2M; 4: não ind. ext. tampão ureia 2M; 5: ind. ext. tampão 4M; 6: não ind. ext.

tampão 4M; 7: ind. ext. tampão 8M e 8: não ind. ext. tampão 8M. Retângulo vermelho: bandas de expressão da proteína recombinante.

Os pellets resultantes das expressões das proteínas rNcCAP/1081 e rNcCAP foram submetidos à extração total com tampão ureia 8M pH 8.0 seguido de purificação por IMAC. O resultado da purificação encontra-se na figura 12, com as proteínas rNcCAP/1081 e rNcCAP induzidas e não induzidas antes da purificação (poços 1 a 4, Figura 12), e as proteínas após a purificação (poços 5 a 8, Figura 12). Foi observado que a proteína com a *tag* Nc1081 induzida após a purificação apresentou um padrão de uma banda com aproximadamente 38 kDa (poço 5, Figura 12). Além disso, detectou-se a presença de uma banda com aproximadamente 43 kDa em todos os poços, mais intensa para rNcCAP/1081 (poços 1, 2, 5 e 6, Figura 12) e uma banda de aproximadamente 33 kDa apenas para rNcCAP (poço 7, Figura 12).

Figura 12 - Extração total da proteína rNcCAP com e sem *tag* Nc1081 em tampão ureia 8M pH 8.0 seguida de purificação em coluna de IMAC. Gel de acrilamida 12,5% corado com Comassie G-250 contendo M: marcador molecular (Protein MW Marker, Fermentas). Poços 1: proteína recombinante com *tag* Nc1081 induzida; 2: proteína com *tag* Nc1081 não induzida; 3: sem *tag* ind.; 4: sem *tag* não induzida; 5: com *tag* induzida purificada; 6: com *tag* não induzida purificada; 7: sem *tag*

induzida purificada e 8: sem *tag* não induzida purificada. Seta vermelha: uma banda com peso molecular 38 kDa que corresponde à rNcCAP purificada.

4.4 Detecção das proteínas recombinantes por ELISA

As proteínas recombinantes com e sem a *tag* Nc1081 foram inicialmente testadas para o ELISA nas concentrações 5 e 50 µg/mL, adotando-se a menor concentração para os testes subsequentes. Para a escolha das diluições do soro total anti-NcMIC2-like1 (1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000) e dos anticorpos secundários (1:5000 e 1:10000) foram considerados testes anteriores com a proteína recombinante sem a *tag* realizados anteriormente (Pereira, 2011). A padronização das diluições do soro total anti-NcCAP e do conjugado foram testadas, sendo soro (1:1000, 1:10000, 1:50000, 1:100000) e do anticorpo secundário (1:5000 e 1:10000).

4.4.1 Detecção de rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 pelo soro policlonal anti- rNcMIC2-like1

As proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 foram reconhecidas pelo respectivo soro em todas as suas diluições, sem diferença significativa entre as formas recombinantes na forma solúvel e insolúvel (Figura 13).

Figura 13 - Detecção de rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 pelo soro policlonal anti-NcMIC2-like1. As placas, sensibilizadas com 5 µg/ml das proteínas rNcMIC2-like1/1081 e rNcMIC2-like1 foram incubadas com o soro anti-recombinante (1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000) seguida do conjugado (1:10000), leitura em 450 nm. Barras brancas: proteínas recombinantes com a *tag* Nc1081; barras pretas: proteína recombinante sem a *tag* Nc1081.

4.4.2 Detecção de rNcCAP/1081 e rNcCAP pelo soro policlonal anti- rNcCAP

As proteínas rNcCAP/1081 e rNcCAP foram reconhecidas pelo respectivo soro policlonal em todas as suas diluições sem diferença significativa entre as proteínas recombinantes na forma solúvel e insolúvel, exceto na diluição do soro 1:10000 utilizando o conjugado a 1:10000 (Figura 14).

B

Figura 14 - Detecção de rNcCAP/1081 e rNcCAP pelo soro policlonal anti-NcCAP. As placas, sensibilizadas com 5 µg/mL das proteínas de rNcCAP/1081 e rNcCAP foram incubadas com o soro anti-recombinante (1:1000, 1:10000, 1:50000 e 1:100000) seguida do anticorpo secundário nas diluições A)1:5000 e B)1:10000, leitura em 450 nm. Barras brancas: proteínas recombinantes com a tag Nc1081, barras pretas: proteína recombinante sem a tag Nc1081. * indica $p < 0,05$ entre a proteína recombinante com e sem a tag Nc1081

4.5 Avaliação das proteínas recombinantes solúveis em ensaio de invasão

O ensaio de invasão foi feito inicialmente com as proteínas NcMIC2-like1 e NcCAP nas formas solúvel e insolúvel, contudo os resultados dos testes de invasão para a NcCAP não foram consistentes, ocorrendo resultados contraditórios em sua maioria. Dessa forma, optou-se por continuar os testes somente com a proteína NcMIC2-like1 solúvel e insolúvel que mostrou menor variabilidade inter-ensaios.

Foi verificado que a proteína rNcMIC2-like1/1081 solúvel na concentração de 5 µg/mL favoreceu a invasão da célula VERO pelo taquizoíta NcLacZ, uma vez que houve diferença significativa entre a invasão ocorrida nesta concentração e o controle positivo (Figura 15). Por outro lado, a proteína rNcMIC2-like1 insolúvel na concentração de 0,05 µg/mL dificulta a invasão da célula VERO pelo taquizoíta NcLacZ, com diferença significativa entre a invasão e o controle positivo (Figura 15).

Figura 15 – Avaliação da invasão das células VERO pelos taquizoítas NcLacZ incubados com rNcMIC2-like1/1081 e rNcMi2-like1 através do ensaio de CPRG. As proteínas nas formas solúvel (rNcMIC2-like1/1081) e insolúvel (rNcMi2-like1) foram incubadas nas concentrações 5 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,05 µg/mL previamente em uma cultura de células VERO e em seguida inoculadas com 1×10^6 a 5×10^6 taquizoítas por mL, e incubadas por 2 horas para que ocorresse a invasão, seguida de lise celular e reação com CPRG. Barras verdes: diluição da proteína solúvel, barras azuis: diluição da proteína insolúvel, barra preta (RPMI+Nc): controle positivo e barra branca (BR): controle negativo. * indica $p < 0,05$ entre a proteína recombinante e o controle positivo

4.6 Ensaio de adesão (*binding*) entre as proteínas recombinantes solúveis (rNcMIC-like1/1081 e rNcCAP/1081) e extrato de *Neospora caninum*

Foram recolhidas 5 alíquotas no ensaio de adesão da proteína rNcMIC-like1/1081 incubada com o extrato de células VERO (TV) e 5 alíquotas no ensaio de adesão com o extrato de *N.caninum* (TN) e estas foram analisadas por Bradford. As primeiras duas alíquotas recolhidas no início de cada ensaio (AL1TV, AL2TV e AL1TN, AL2TN respectivamente) apresentaram-se mais intensas ao Bradford e por isso foram aplicadas em um gel de acrilamida. As bandas exclusivas à *N. caninum* (TN), quando comparadas com as do extrato de Vero (TV), foram submetidas à espectrometria de massas (Figura 16A).

Da mesma forma, foram recolhidas 5 alíquotas no ensaio de adesão da proteína rNcCAP/1081 incubada com o extrato de células VERO (CV) e 5 alíquotas no ensaio de adesão com extrato de *N.caninum* (CN) e estas foram analisadas por

Bradford. As alíquotas recolhidas no início de cada ensaio (AL1CV, AL2CV e AL1CN, AL2CN respectivamente), as mais intensas ao Bradford, foram aplicadas em um gel de acrilamida. As bandas exclusivas à *N. caninum* (CN) quando comparadas com as do extrato de VERO(CV), foram submetidas à espectrometria de massas (Figura 16B).

Figura 16 – Ensaio de adesão (binding) entre as proteínas rNcMIC2-like 1 ou rNcCAP contendo a tag Nc1081 e os extratos de células VERO ou de taquizoítas de *N. caninum*: marcador peso molecular (Unstained Protein MW Marker, ThermoScientific). A – AL1TV e AL2TV 1ª e 2ª alíquotas recolhidas do ensaio de adesão entre a NcMIC2like1 e células VERO; AL1TN e AL2TN 1ª e 2ª alíquotas recolhidas do ensaio de adesão entre a NcMIC2like1 e taquizoítas de *N. caninum*. B – AL1CV e AL2CV 1ª e 2ª alíquotas recolhidas do ensaio de adesão entre NcCAP e células VERO; AL1CN e AL2CN 1ª e 2ª alíquotas recolhidas do ensaio de adesão entre NcCAP e taquizoítas de *N. caninum*.

4.6.1 Identificação das proteínas obtidas no ensaio de adesão por MS-MALDI

Foram analisadas no total 8 bandas do ensaio de adesão com a rNcMIC2-like1/1081. Destas, 4 bandas (TV1, TV2, TV3 e TV4, Figura 16) foram identificadas no ensaio com a proteína rNcMIC-like1/1081 incubada com o extrato de células VERO e 4 bandas (TN1, TN2, TN3 e TN4, Figura 16) identificadas no ensaio com a rNcMIC-like1/1081 incubada com o extrato de *N. caninum*.

Já no ensaio de adesão com a rNcCAP/1081, foram analisadas 4 bandas no total. Destas, 2 bandas (CV1 e CV2, Figura 16) foram identificadas no ensaio com a proteína rNcCAP/1081 incubada com o extrato de células VERO e 2 bandas (CN1 e CN2, Figura 16) foram identificadas no ensaio com a rNcMIC-like1/1081 incubada com o extrato de *N. caninum*.

A identificação das proteínas correspondentes às bandas do ensaio de adesão com a rNcMIC2-like1/1081 e a rNcCAP/1081 obtidas por espectrometria de massas estão apresentadas na tabela 1. Das 8 bandas analisadas no ensaio com a rNcMIC2-like1/1081, foram obtidos 3 *hits* para bandas identificadas no ensaio de adesão da proteína com o extrato de *N. caninum*. No ensaio com a rNcCAP/1081 foi encontrado apenas 1 *hit* para uma banda identificada no ensaio de adesão da proteína com o extrato de *N. caninum*.

Tabela 2 – Proteínas identificadas no ensaio de adesão por espectrometria de massas. A identificação das bandas está de acordo com a numeração do gel de acrilamida correspondente a Figura 15; identificação das proteínas, descrição, score, peso molecular observado e predito pelo ToxoDB.

	Bandas	Identificação ToxoDB	Descrição	Score Mascot	Peso molecular observado/ predito(kDa)
rNcMIC2like- 1/1081	TN1	NCLIV_031860	Serina treonina fosfatase 2C putativa	22	33.0/35.57
	TN3	NCLIV_001670	Fator de alongamento alfa 1	219	51.0/49.05
	TN4	NCLIV_041330	Proteína hipotética	22	46.5/639.50
rNcCAP/1081	CN1	NCLIV_029860	Proteína hipotética	45	23.0/20.62

A banda TN1 corresponde ao *hit* identificado como proteína serina treonina fosfatase 2C (PP2C), a banda TN3 corresponde ao *hit* fator de alongamento alfa 1 (EF-1 α). A banda TN4 e CN1 foram identificadas como proteínas hipotéticas.

5. DISCUSSÃO

A expressão recombinante em *E. coli* pode levar à produção de proteínas na forma de corpúsculos de inclusão, insolúveis em ambiente não desnaturante. Sabe-se que diferentes recursos são utilizados para obtenção de proteínas solúveis, desde o emprego de diferentes técnicas de purificação, renaturação até o uso de *tags* de afinidade. A obtenção de proteínas solúveis é importante para que possam ser utilizadas em ensaios funcionais *in vitro*, onde a presença de contaminantes advindos dos processos tradicionais de solubilização de proteínas não é tolerado. Desta forma, a *tag* Nc1081, desenvolvida no nosso grupo de pesquisa para obtenção de proteínas recombinantes solúveis de *N. caninum*, foi investigada com mais detalhes neste trabalho. O vetor patenteado pET28/NcMIC2-like1/1080 (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2011) foi utilizado para a obtenção da NcCAP solúvel e as proteínas NcMIC2-like1 e NcCAP solúveis foram avaliadas em alguns ensaios *in vitro*.

A proteína MIC2-like1 de *N. caninum*, juntamente com seus homólogos MIC2 de *N. caninum*, *E. tenella*, *H. hammondi* e *T. gondii* possuem o domínio adesivo tipo A do fator de Von Willebrand (VWA) bastante conservado entre Apicomplexas, apesar da baixa porcentagem de identidade e similaridade, conforme já apresentado por Pereira e colaboradores (2011) e por diferentes autores (MORAHAN; WANG; COPPEL, 2008; SONG; TIMOTHY; SPRINGER, 2014). O domínio VWA de NcMIC2-like1 possui sete alfa-hélices intercaladas por seis folhas-beta, o que coincide com a conformação típica do domínio formada por folhas-beta paralelas cercadas por alfa-hélices (WHITTAKER; HYNES, 2002). As proteínas MIC2 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *T. gondii* podem ser encontradas numa conformação aberta ou fechada, dependendo da ligação de Mg²⁺ com o sítio MIDAS (BOUCEHR; BOSCH, 2015). O sítio MIDAS (seta vertical preta, Figura 4) na NcMIC2-like1, assim como nos seus homólogos, é uma região conservada formada por cinco aminoácidos não-contíguos localizados entre a folha-beta 1 e alfa-hélice 1 do domínio, capaz de acomodar o cátion bivalente (SONG et al., 2012). As estruturas tridimensionais da VWA de *P. falciparum* e *T. gondii* indicaram que esta adesina possui dois ligantes, um deles depende do sítio MIDAS e o outro de heparina, sugerindo que a TRAP interage com

múltiplos receptores durante a invasão (AKHOURI et al., 2004; HARPER; HOFF; CARRUTHERS, 2004).

Os domínios TSR são conhecidos por serem compostos por folhas-beta antiparalelas mantidas unidas por camadas de resíduos de triptofano e arginina estabilizadas por ligações dissulfeto formadas por cisteínas (TAN et al., 2012). Uma característica observada no alinhamento estrutural da NcMIC2-like1 foi a presença de resíduos de prolina entre as folhas-beta9 e beta10 no domínio TSR1 (seis pontos pretos no segundo traço laranja, Figura 4), que não estão presentes nos demais domínios TSR identificados. Sabe-se que os resíduos de prolina no domínio TSR1 no estado aberto da proteína TgMIC2, isto é, quando o cátion bivalente se liga ao sítio MIDAS, se organizam e formam uma extensão que interage com o domínio VWA (SONG; SPRINGER, 2014). Boucher & Bosch (2015) propõem que a interação ligante-receptor no domínio VWA induz uma mudança conformacional da MIC2 que gera uma projeção do domínio TSR1, criando um braço estável no qual a força gerada pelo motor actina-miosina é transmitida até a superfície da célula hospedeira.

O alinhamento estrutural da proteína CAP de *N. caninum* com seus homólogos de *H. hammondi*, *T. gondii* e *E. tenella* permitiu identificar a presença de um domínio único CAP-C (traço verde, Figura 5) formado exclusivamente por folhas-beta. Em Apicomplexas, a estrutura da proteína CAP é mais simples e difere das demais de eucariotos pela ausência do domínio alfa-hélice localizado na região N-terminal e do domínio central homólogo a Wiskott-Aldrich 2 (WH2) flanqueado por regiões ricas em prolinas (OLSHINA; WONG; BAUM, 2012). O domínio único CAP-C está restrito aos protozoários, sendo encontrado em diferentes gêneros como *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Leishmania* entre outros (HLISCS et al., 2010). Uma vez que a CAP é estruturalmente menos complexa, os pesquisadores entendem que sua função nos protozoários estaria limitada à ligação aos fragmentos de actina-G e síntese de ATP a partir do ADP (MAKKONEN et al., 2012). Hliscs e colaboradores (2010) caracterizaram a CAP-C de *Cryptosporidium parvum* como uma estrutura dimérica em que cada monômero que compõe o dímero é formado por seis folhas-beta paralelas que se associam como beta-hélices. As beta-hélices são estabilizadas por ligações de hidrogênio e por resíduos de serina-cisteína conservados (OLSHINA; WONG; BAUM, 2012) que podem ser identificadas no alinhamento estrutural da NcCAP com seus homólogos (quatro pontos pretos

abaixo do traço verde, Figura 5). A dimerização da CAP-C de *C. parvum* ocorre pela troca de um aminoácido glutamina na posição 162 pela serina na posição 179 na região C-terminal do domínio, resultando na troca de uma folha-beta de um monômero por outro. A presença da sequência de aminoácidos PEQ (seta vertical preta, Figura 5) antes da última folha-beta do domínio é indicativo da formação do dímero (HLISCS et al., 2010), o que também pode ser observado no alinhamento da NcCAP.

A estrutura predita da *tag* Nc1081 é composta por uma única alfa-hélice alongada estabilizada por ligações de hidrogênio entre os resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico, garantindo uma carga negativa ao fragmento que justificaria seu caráter hidrofílico anti-agregante. Sabe-se que pequenas sequências de peptídeos carregados negativamente (HEDHAMMAR et al., 2004) ou positivamente (HEDHAMMAR et al., 2006) são acoplados à proteína alvo para facilitar a sua purificação por cromatografia de troca iônica, utilizando resinas com polaridades opostas as do fragmento. Sangawa e colaboradores (2013) desenvolveram uma *tag* rica em resíduos ácidos conhecida como FATT, uma abreviação de “Flag-acidic-target *tag*”, que utiliza uma porção do domínio extracelular da proteína precursora amiloide humana (APP) contendo aproximadamente 100 aminoácidos com 48% de resíduos ácidos e pI 3.2. Esta alta porcentagem de aminoácidos de natureza ácida pode ser observada também na composição da *tag* Nc1081 que é formada mais da metade por ácido glutâmico (55,7%). A semelhança com a FATT é verificada também pelo seu pI que na Nc1081 é de 3.44, o que em pH neutro faz com que a *tag* assuma uma carga negativa. As semelhanças entre as duas *tags* denotam que, assim como a FATT, a Nc1081 possuiria um grande volume de exclusão o que protegeria a molécula alvo, impedindo a interação indevida com outras proteínas e a formação de agregados na forma de corpúsculos de inclusão.

As predições das estruturas secundárias realizadas neste estudo foram baseadas nas sequências das proteínas depositadas no PDB sem a *tag* acoplada, portanto sua influência nestas estruturas não foi avaliada. Destaca-se ainda que as discussões acerca das estruturas realizadas neste estudo foram bastante simplificadas, uma vez que este não era um dos objetivos do trabalho, sendo

necessário um estudo mais aprofundado utilizando técnicas de cristalografia adequadas.

A proteína rNcMIC2-like1 é insolúvel em tampão salino. Contudo, a partir da indução de células competentes *E.coli* TOP 10 transformadas com o plasmídeo pET28/NcMIC2-like/1080 contendo a *tag* rica em ácido glutâmico, foi possível obter a proteína recombinante solúvel em tampão não desnaturante, conforme já demonstrado por Pereira e colaboradores (2011). A proteína recombinante purificada obtida no presente trabalho apresentou um padrão de três bandas de aproximadamente 43, 48 e 60 kDa, consistentes com os achados do mesmo autor (PEREIRA, 2013).

A NcCAP nativa é obtida na forma insolúvel uma vez que os dímeros que compõe o seu único domínio CAP-C tendem a formar complexos com monômeros de actina *in vivo* (BALCER et al., 2003). Em um estudo de Hliscs e colaboradores (2010), o domínio CAP-C de *C. parvum* e *P. falciparum*, homólogos à CAP-C do parasita *N. caninum*, foi produzido de forma recombinante, porém somente a CAP-C de *C. parvum* foi obtida solúvel, com um peso molecular de 38.7 kDa. Makkonen e colaboradores (2013), expressaram a CAP-C recombinante de *P. falciparum* na forma insolúvel com um peso molecular de aproximadamente 40 kDa. No presente estudo, a sequência gênica da proteína NcCAP foi clonada no vetor pET28/Nc1081, gerando o plasmídeo pET28/NcCAP/1080. Células competentes de *E. coli* TOP 10 transformadas com o plasmídeo foram induzidas e a proteína rNcCAP foi expressa com peso molecular aproximado de 38 kDa. A proteína rNcCAP foi extraída na forma solúvel no tampão Tris-Cl, indicando que a *tag* rica em ácido glutâmico Nc1081 foi responsável pela obtenção da proteína na forma solúvel em tampão não-desnaturante.

Uma das preocupações relacionadas ao uso de *tags* de afinidade é a possibilidade das mesmas interferirem com a estrutura da proteína alvo, alterando sua função (YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012). Apesar das proteínas recombinantes acopladas a *tag* Nc1081 produzidas neste trabalho terem sido expressas na forma solúvel, isto não garante que elas se encontram na conformação nativa. Diferentes métodos cromatográficos são utilizados para auxiliar na renaturação das proteínas recombinantes expressas em diversos sistemas de

expressão, sendo que na cromatografia por afinidade a renaturação ocorre após a imobilização da proteína numa matriz que resulta na melhor disposição da molécula e redução das interações intermoleculares (SINGH et al., 2015). Para minimizar os efeitos da ação do agente desnaturante sobre as proteínas utilizadas nos ensaios de ELISA, invasão e adesão, elas foram previamente purificadas em coluna de níquel, uma vez que as sequências gênicas das respectivas proteínas encontram-se flanqueadas por *tags* de poli-histidina. Estando a proteína imobilizada, a renaturação foi realizada por remoção do tampão desnaturante (ureia 8M, pH 7,4) por lavagens sucessivas com tampão de ligação (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4), seguida de eluição das proteínas recombinantes com tampão de eluição contendo imidazol.

A integridade funcional das proteínas recombinantes expressas com e sem a *tag* Nc1081 foi avaliada através dos ensaios de ELISA e invasão. No ELISA não houve diferença significativa entre o reconhecimento das proteínas recombinantes com ou sem a *tag* Nc1081 pelos respectivos soros policlonais. Considerando que os soros anti-NcMIC2-like1 e anti-NcCAP são altamente específicos contra os respectivos antígenos, os resultados indicam que a proteína recombinante com a *tag* poderia ser utilizada em ensaios imunoenzimáticos apresentando a mesma resposta antígeno-anticorpo que a proteína sem a *tag*, com a vantagem de ser obtida na forma solúvel. Por sua vez, no ensaio de invasão, a proteína rNcMIC2-like1 contendo a *tag* Nc1081 na maior concentração (5 $\mu\text{g/mL}$) possibilitou um aumento na invasão das células VERO pelos taquizoítas, enquanto a proteína sem a *tag* na menor concentração (0,05 $\mu\text{g/mL}$) resultou numa diminuição da invasão da célula hospedeira. Nas demais concentrações não houve diferenças significativas. Ainda que qualitativamente, não é possível afirmar se a *tag* Nc1081 interfere ou não com a invasão do parasita, estando essa aparentemente mais ligada à concentração da proteína utilizada do que com uso da *tag* em si. Por sua vez, a diminuição da invasão através do uso da rNcMIC2-like1 na menor concentração abre caminho para que concentrações ainda menores do que a utilizada no teste possam ser avaliadas como uma possível estratégia de inibição de invasão. Mesmo que o mecanismo por detrás dessa inibição, pela simples presença da proteína recombinante numa cultura de células VERO, seja desconhecido, os resultados apresentados no presente ensaio podem sugerir uma nova frente de investigação da ação da proteína NcMIC2-like1. Uma possível explicação para o aumento da invasão do parasita poderia ser a

ação da NcMIC2-like1 solúvel, em altas concentrações, na alteração de polaridade das células VERO, facilitando a entrada do parasita. Sabe-se que células de fígado em monocamadas polarizadas foram responsáveis pelo aumento da invasão de *T. gondii* (BARRAGAN; SIBLEY, 2002), da mesma forma a presença dos resíduos ácidos na *tag* Nc1081 na proteína solúvel poderiam alterar a polaridade do meio em que a célula VERO se encontra, favorecendo a entrada do parasita. Sabe-se ainda que a presença de adesinas como as da superfamília de moléculas de adesão intercelular 1 humana (hICAM-1) na forma recombinante foram responsáveis por um efeito inibitório na migração de *T. gondii* por se ligarem a TgMIC2 e causarem neutralização da proteína (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005). Da mesma forma, a presença da NcMIC2-like 1 sem a *tag* poderia interagir com a MIC2 do parasita causando precipitação da proteína e diminuição da invasão.

Dentre as proteínas identificadas no ensaio de adesão foi encontrada serina treonina fosfatase 2C (PP2C) que faz parte de uma família de proteínas fosfatase capazes de catalisar a defosforilação dos aminoácidos serina e treonina. Juntamente com as proteínas quinase que fazem o processo inverso de catálise da fosforilação, as proteínas fosfatase estão envolvidas em diversos processos biológicos como diferenciação, interação e motilidade celular além de resposta imune, transcrição e tradução gênica, entre outros (ALMO et al., 2007). Em eucariotos, a PP2C é uma das quatro famílias de proteínas serina treonina fosfatase conhecidas, sendo pouco caracterizada em Apicomplexas (JUAN et al., 2014). Em taquizoítas de *T. gondii* a PP2C é a fosfatase mais abundantemente expressa, podendo estar localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo do parasita (JAN et al., 2009). Outro tipo de PP2C, localizada nas roptrias dos taquizoítas de *T. gondii*, é conhecida como PP2C-hn e é secretada no citoplasma da célula hospedeira, alcançando o núcleo durante a invasão celular (GILBERT et al., 2007).

Já o outro *hit* identificado como fator de alongamento alfa 1 (EF-1 α) faz parte de um complexo formado por diferentes subunidades como o fator de alongamento beta 1 (EF-1 β), teta 1 (EF- γ) e gama 1 (EF- δ). Todos esses fatores estão envolvidos na etapa de alongamento da proteína durante a tradução gênica dependente da hidrólise de GTP e da sua regeneração, a partir da fosforilação do GDP (PETERS; CHANG; TRAUGH 1995). Na etapa de alongamento, o RNA transportador (RNAt) carregado com um aminoácido (aminoacil-RNAt) se liga ao sítio A no ribossomo,

onde ocorre a formação da ligação peptídica, seguido do deslocamento do peptídeo nascente (peptidil-RNAt) para uma região contígua, o sítio P (MATSUBAYASHI et al., 2013). Após a liberação do aminoacil-RNAt do sítio P, o EF-1 α GDP é regenerado em EF-1 α GTP pela ação do EF-1 β e EF- γ (SANDERS et al., 1996). A EF-1 β de *P. falciparum* por sua vez é defosforilada pela enzima PP2C regulando negativamente a sua atividade de troca do nucleotídeo (MAMOUN; GOLDBERG, 2001). Essa interação entre os fatores de alongamento e as proteínas fosfatase, poderia justificar a identificação de ambas as proteínas na análise de adesão no presente estudo. Mais ainda, ela sugeriria uma interação entre a PP2C e a EF-1 α que estão localizadas no citoplasma e a NcMIC2-like1 possivelmente através da região C-terminal da proteína formada pela cauda citoplasmática. Essa interação poderia indicar uma ação diferente desta região conservada nas proteínas TRAP, além daquela atribuída à ligação aos filamentos de actina, como é proposto atualmente por diferentes autores, conforme revisão de Heitzelman (2015). A identificação dessas proteínas ligadas a NcMIC2-like1 recombinante poderia sugerir uma interação entre elas durante a invasão ou motilidade uma vez que as adesinas são capazes de se ligar a estruturas localizadas na região extracelular via domínio AWF.

A proteína hipotética identificada como NCLIV_029860 possui um domínio conhecido como complexo associado ao polipeptídeo nascente (NAC) (pfam01849) que é um dos primeiros fatores encontrados pela cadeia polipeptídica quando esta é sintetizada (SAKAI; WIEDMANN, 1995). O domínio até o momento foi estudado em análises comparativas do genoma de eucariotos (MAKAROVA et al., 1999) e não foram identificados referências que tratam da NAC em Apicomplexas. Não foi possível encontrar domínios associados à proteína hipotética NCLIV_041330 nas bases de dados do pfam e prosite.

Os resultados deste trabalho deram continuidade às pesquisas com o vetor patenteado pelo grupo de pesquisa pET28/NcMIC2-like1/1080 (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2011). A partir do uso da *tag* Nc1081 foi possível expressar a proteína NcCAP na forma solúvel, o que não tinha sido feito até então. Os testes com as proteínas rNcMIC2-like1 e rNcCAP acopladas à *tag* permitiram concluir que as proteínas mantêm sua atividade no reconhecimento antígeno-anticorpo, enquanto não foi possível concluir se a *tag* favorece ou interfere na invasão da célula

hospedeira pelo parasita. A proteína NcMIC2-like1 solúvel foi capaz de aderir com proteínas conhecidas de *N. caninum* revelando novos possíveis ligantes de adesinas envolvidos na invasão ou motilidade do parasita. As próximas etapas do estudo envolvendo a *tag* Nc1081 pretendem otimizar o seu uso como uma ferramenta biotecnológica para expressão de proteínas solúveis em laboratório.

6. CONCLUSÃO

- 1) A presença da *tag* Nc1081 estimula a solubilidade das proteínas recombinantes NcCAP (rNcCAP) e NcMIC2-like1 (rNcMIC2-like1);
- 2) Ambas as proteínas, rNcMIC2-like1 e rNcCAP, com ou sem a *tag*, são reconhecidas com intensidade semelhante pelos seus respectivos soros policlonais;
- 3) A forma solúvel de NcMIC2-like1 (rNcMIC2-like1/1081) aumenta a invasão das células VERO pelos taquizoítas em maior concentração, enquanto sua forma insolúvel (rNcMIC2-like1) diminui a invasão na menor concentração;
- 4) No ensaio de *binding* a rNcMIC2-like1/1081, adere à proteína serina treonina fosfatase 2C, ao fator de alongamento alfa 1 e a proteína hipotética identificada como NCLIV_029860, enquanto a rNcCAP/1081 adere à proteína hipotética NCLIV_041330.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHOURI, R. R. et al. Structural and functional dissection of the adhesive domains of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). **The Biochemical Journal**. v. 379, pt. 3, p. 815-822, 2004.

ALMO, S. C. et al. Structural genomics of protein phosphatases. **Journal of Structural Functional Genomics**. v. 8, p. 121-140, 2007.

AL-QASSAB, S. E.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. On the biological and genetics diversity in *Neospora caninum*. **Diversity**. v. 2, n. 3, p. 411-438, 2010.

BAJERKÅS, 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.

BALCER, H. I. et al. Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/cap complex, cofilin, profiling, and aip1. **Current Biology**. v. 13, p. 2159-2169, 2003.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cellular Microbiology**. v. 4, n. 4, p. 561-568, 2005.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of experimental Medicine**. v. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002

BARONI, L. **Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *Neospora caninum***. 2012. 73p. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BARROS, J. C. et al. Diagnóstico da perda econômica causada pela neosporose na reprodução de novilhas de corte. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande, 2010.

BARTHOLDSON, S. J. et al. Semaphorin7A is an erythrocyte receptor for *P. falciparum* merozoite-specific TRAP homolog, MTRAP. **PLOS Pathogens**. v. 8, n. 11, p. 1-11, 2012.

BAUM, J. et al. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and another apicomplexan parasites. **Journal of Biology Chemistry**. v. 281, n. 8, p.5197-5208, 2006.

BAUM, J. et al. Regulation of apicomplexan actin-based motility. **Nature Reviews. Microbiology**. v. 4, n. 8, p. 621-628, 2006.

BLADER, I. J. et al. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annual Review Microbiology**. v. 69, p. 463-485, 2015.

BOSCH, J. et al. Structure of the MTIP-MyoA complex a key component of the malaria parasite invasion motor. **PNAS**. v. 103, n. 13, p. 4852-4857, 2006.

BOUCHER, L. E.; BOSCH, J. The apicomplexan glideosome and adhesins – Structure and function. **Journal of Structural Biology**. v. 190, n.2, p. 93-114, 2015.

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

BURGESS, R. R. Purification of overproduced *E.coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. **Methods in Enzymology**. v. 273, p. 145-149, 1996.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme protein in apicomplexans. **Sub-cellular Biochemistry**. v. 47, p. 33-4, 2008.

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

DIJKSTRA, T. et al. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**. v. 110, n. 3-4, p.161-169, 2003.

DONAHOE, S. L. et al. A review of neosporosis and pathology findings of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015.

DUBEY J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive hosts for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v. 181, n. 2, p. 382-387, 2011.

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

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929–946, 2002.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUNDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1, p. 90-108, 2011.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Brasília, 2003.

FISCHER, B. E. Renaturation of recombinant proteins produced as inclusion bodies. **Biotechnology Advances**. v. 12, p. 89-101, 1994.

GANGNEUX-ROBERT, F.; KLEIN, F. Serologic screening for *Neospora caninum* France. **Emerging Infectious Disease**, v. 15, n. 6, p 987-988, 2009.

GILBERT, L. A et al. *Toxoplasma gondii* Targets a Protein Phosphatase 2C to the Nuclei of Infected Host Cells. **Eukaryotic Cell**. v. 6, n. 1, p. 73-92, 2007.

GOLOVANOV, A. P. et al. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. **Journal of American Chemistry Society**. v. 126, n. 29, p. 8933-8999, 2004.

GONDIM L. F. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**. v. 34, n. 2, p.159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P. et al. Soroprevalence de *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 86, p. 71-75, 1999.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

GUEDES, M. H. P. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas-Gerais. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 17, n. 4, p.189-194, 2008.

HARPER, J. M.; HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. **Molecular Biochemistry Parasitology**. v. 134, n. 2, p. 201-212, 2004.

HEDHAMMAR, M. et al. Negatively charged purification purification tags for selective anion-exchange recovery. **Protein engineering, Design & Selection**. v. 17, n. 11, p. 779-786, 2004.

HEDHAMMAR, M. et al. Single-step recovery and solid-phase refolding of inclusion body proteins using a polycationic purification tag. **Journal of Biotechnology**. v. 1, p. 187-196, 2006.

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

HEMPHILL, A. Generation of parasite cysts in cultured cells instead of living animals. **3R Info Bulletin nr24**. p. 29-31, 2007.

HLISCS, M. et al. 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.

HUBBERSTEY, A.; MOTILLO, E. Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. **FASEB Journal**. v. 16, n. 6, p. 487-499, 2002.

JAN, G. et al. A *Toxoplasma* type 2C serine-threonine phosphatase is involved in parasite growth in the mammalian host cell. **Microbes and Infection**. v. 11, p. 935-945, 2009.

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, p. 885-894, 2003.

JUAN, G. X. et al. Protein Phosphatase 2C of *Toxoplasma Gondii* Interacts with Human SSRP1 and Negatively Regulates Cell Apoptosis. **Biomedical Environment Science**. v. 27, n. 11, p. 883-893, 2014.

JUNGBAUER, A.; KAAR, W. Current status of technical protein refolding. **Journal of Biotechnology**. v. 128, p. 587-596, 2007.

KEELEY, A.; SOLDATI, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host cell invasion by Apicomplexa. **Trends in Cell Biology**. v. 14, n.10, p. 528-532, 2004.

KING J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**. v. 40, n. 8, p.945-950, 2010.

KLAUCK , V. et al. Relationship between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogenesis**. v. 92, p. 46-49, 2016.

KRITZER, S. et al. An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. **Annals of Clinical Microbiology and Microbials**. v. 1, 2002.

KUMPULA, E. P.; KURSULA, I. Towards a molecular understanding of the apicomplexan actin motor: on a road to novel targets for malaria remedies ? **Molecular Parasitology**. v. 71, n. 5, p. 500-513, 2015.

MAGALHÃES, V. C. S. et al. Transmission paths of *Neospora caninum* in dairy herd of crossbred cattle in northeast o Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 202, n. 3-4, p. 257-264, 2014.

MAKAROVA, K. S. et al. Comparative genomics of the Archaea (Euryarchaeota): evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. **Genome Research**. v. 9, n. 7, p. 608-628, 1999.

MAKKONEN, M. et al. 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.

MAMOUN, C. B.; GOLDBERG, D. E. Plasmodium protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1b and inhibits its PKCmediated nucleotide exchange activity in vitro. **Molecular Biology**. v. 39, n. 4, p. 973-981, 2001.

MARQUES, F. A. et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitology Research**. v. 108, n. 4, p. 1015-1019, 2011.

MATSUBAYASHI, M. et al. Elongation Factor1 α Is a Novel Protein Associated with Host Cell Invasion and a Potential Protective Antigen of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Biology Chemistry**. v. 228, n. 47, p. 34111-34120, 2013.

McCALLISTER M.M. .et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**. v. 28, n. 9, p.1473-1478, 1998.

McCANN, C. M. et al. Lack of serologic evidence for *Neospora caninum* in humans in England. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, n. 6, p. 978-980, 2008.

MINERVINO, A. H. H. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 84, n. 2, p. 254-256, 2008.

MORAHAN, B. J.; WANG, L.; COPPEL, R. L. No TRAP, no invasion. **Cell Press**. v. 25, n. 2, p. 77-84, 2009.

MOURA, A. B. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in beef cattle of microrregion of guarapuava, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 79, n. 3, p. 419-422, 2012.

NGUYEN, M. T. et al. Prokaryotic Soluble Overexpression and Purification of Bioactive Human Growth Hormone by Fusion to Thioredoxin, Maltose Binding Protein, and Protein Disulfide Isomerase. **PLOS One**. v. 9, n. 3, p. 1-10, 2014.

NICOLINO, R. R. et al. Estimativa da diferença do risco de abortos em vacas leiteiras soropositivas para *Neospora caninum* no Brasil. **Ciência Rural**. v. 45, n. 9, p.1629-1633, 2015.

OLSHIDA, M. A.; WONG, W.; BAUM, J. Holding back the microfilament – structural insights into actin and the actin-monomer-binding proteins of apicomplexan parasites. **IUBMB Life**. v. 64, n. 5, p. 370-377, 2012.

PEREIRA, L. M. **Avaliação funcional da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1)**. 2013.196f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicada à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

PEREIRA, L. M. **Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 (TRAP2) do protozoário *Neospora caninum* no processo de invasão celular**. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PEREIRA, L. M.; BARONI, L.; YATSUDA, A. P. A transgenic *Neospora caninum* strain based on mutations of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. **Experimental Parasitology**. v. 138, p. 40-47, 2014.

PETERS, H. I.; CHANG, Y. E.; TRAUGH, J. A. Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity. **European Journal of Biochemistry**. v. 234, p. 550-556, 1995.

RAGOZO, A. M. A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 12, p. 33-37, 2003.

REICHEL, M. P. et al. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. **Vaccine**. v. 33, n. 11, p. 1299-1301, 2015.

REICHEL, M. P. et al. Control options for *Neospora caninum* – is there anything new or we are going backwards ? **Parasitology**. v. 141, n. 11, p.1455-1470, 2014.

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in the cattle – The billion dollar question. **International Journal of Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2013.

SAKAI, H.; WANG, S.; WIEDMANN, M. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. **The Journal of Cell Biology**. v. 130, n. 3, p. 519-528, 1995.

SANGAWA, T. et al. A multipurpose fusion tag derived from an unstructured and hyperacid region of the amyloid precursor protein. **The Protein Society: Methods and applications**. v. 22, p. 840-850, 2013.

SCHETTERS, T. P. M.; MOUBRI, K.; COOKE, B. M. Comparision of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: review. **Journal of South African Veterinary Association**. v. 80, n. 2, p. 75-78, 2009.

SHARMAN, P. A et al. Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. **Parasite Immunology**. v. 32, n. 8, p. 590-598, 2010.

SHUKLA, D.; TROUT, B. L. Understanding the synergistic effect of arginine and glutamine acid mixtures on protein solubility. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 115, p. 11831-11839, 2011.

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

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**. v. 14, n. 41, p. 1-10, 2015.

SINGH, S. M. et al. Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form. **Protein Expression and Purification**. v. 81, n. 1, p. 75-82, 2012.

SINGH, S. M.; PANDA, A, K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 99, n.4, p. 303-310, 2005.

SONG, G. et al. Shape change in the receptor for gliding motility in *Plasmodium* sporozoites. **PNAS**. v. 109, n. 52, p. 21420-21425, 2012.

SONG, G.; SPRINGER, T. A. Structures of the *Toxoplasma* gliding motility adhesin. **PNAS**. v. 111, n. 13, p. 4862-4867, 2014.

TAN, K. et al. Crystal structure oh the TSP-1 type 1 repeats a novel layered fold and its biological implication. **JBC**. v. 159, n. 2, p. 373-382, 2002.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 60, n. 5, p. 523-533, 2002.

THURMOND, P. J.; HIETALA, M. C. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as predictor of congenital infection and abortion. **Journal of Parasitology**. v. 83, n. 1, p. 82-87, 1997.

TREVINO, S. R. et al. Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in Nase sa. **Journal of Molecular Biology**. v. 366, n. 2, p. 449-460, 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Ana Patrícia Yatsuda Natsui; Luiz Miguel Pereira. **Plasmídeo de ligação e expressão e seu processo de produção.** BR n. BR 10 2013 020116 2, 07 maio 2013.

UPADHYAY, A. K. et al. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. **PLOS One.** v. 7, n. 3, p.1-11, 2012.

VILAS-BOAS, R. et al. Infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros de agricultores familiares da região norte do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 24, n. 2, p. 204-208, 2015.

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.

WHITTAKER, C. A.; HYNES, R. O. Distribution and evolution of von willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. **Molecular Biology of the Cell.** v. 13, p. 3369-3387, 2002.

WILKINS, M. F.; O'CONNELL, E.; PUNGA, W.A. Toxoplasmosis in sheep II: the ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *T. gondii*. **New Zealand Veterinary Journal.** v. 36, n. 14, 1988.

WOOD, D. W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. **Current Opinion in Structural Biology.** v. 26, p. 54-61, 2014.

YOUNG, C. L. et al. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal.** v. 7, p. 620-634, 2012.