UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2
(TRAP 2) do protozoário *Neospora caninum* no processo de invasão celular**

Luiz Miguel Pereira

**Ribeirão Preto
2009**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2
(TRAP 2) do protozoário *Neospora caninum* no processo de invasão celular**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicada a Farmácia para obtenção do título
de Mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientado: Luiz Miguel Pereira
Orientadora: Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Ribeirão Preto
2009

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

Pereira, Luiz Miguel

Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 (TRAP 2) do protozoário *Neospora caninum* no processo de invasão celular. Ribeirão Preto, 2009.

88p. : 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. Apicomplexa. 3. Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Luiz Miguel Pereira

Título: Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 (TRAP 2) do protozoário *Neospora caninum* no processo de invasão celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicada a Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus pela vida, saúde e força para realizar este trabalho e a minha família que sempre me apoiou

RESUMO

PEREIRA, L. M. **Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 (TRAP 2) do protozoário *Neospora caninum* no processo de invasão celular.** 2009. p.88. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Neospora caninum é um protozoário Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório que possui o cão como hospedeiro definitivo e principalmente os bovinos como hospedeiros intermediários, causando nos primeiros encefalopatia e nos últimos abortos com perda da fertilidade, o que acarreta prejuízos significativos na pecuária mundial. O parasita necessita multiplicar de modo intra-celular, utilizando a descarga de proteínas contidas em organelas filo-específicas, como as micronemas que liberam proteínas relacionadas a adesão e invasão ativa, além das roptrias e os grânulos densos. Este trabalho foi realizado sobre um tipo de proteína micronêmica denominada proteína Anônima Relacionada à Trombospondina (TRAP), relacionada à adesão e ligação com o motor intracelular, responsável pelo processo ativo de invasão. TRAP 1 já havia sido descrita pela literatura e o objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular do até então desconhecido homólogo TRAP 2, com expressão de suas formas recombinantes e o uso de seus respectivos anti-soros para ensaios funcionais e localização da proteína nativa. Com base em bancos dados de ESTs e genômicos de *N. caninum* e fazendo uso de RLM-RACE (Reação mediada por RNA ligase- amplificação rápida dos terminos de cDNA-RNA,) foi possível a obtenção da sequência completa do gene NcTrap 2, que possui quatro éxons separados por três íntrons. Sua forma protéica, como seu homólogo, é formado por um peptídeo sinal, uma integrina, cinco trombospondinas, uma região transmembrana e a cauda citoplasmática. A integrina e as trombospondinas são motivos relacionados à adesão para início do processo invasivo e foram os alvos deste trabalho. Foram expressos dois recombinantes a partir deste cDNA funcional (integrina e trombospondinas), com 52 e 78 kDa, e seus respectivos anti-soros foram obtidos. Estes foram utilizados em western blots 1D e 2D para localização da forma nativa de NcTRAP 2 de aproximadamente 80 kDa no extrato total e de sua forma processada no ESA (extrato secretado, simulando o momento invasivo do taquizoíta) com 70 kDa. O soro contra o recombinante 1 teve a capacidade de inibir o processo invasivo em valores de 53 a 61%, dependendo do método utilizado (contagem manual ou real time PCR). NcTRAP 2 foi encontrada no complexo apical parasitário do taquizoíta por imunofluorescência confocal, evidenciando sua provável localização nas micronemas. A nova molécula, NcTRAP 2 possui características que a diferencia de NcTRAP 1 o suficiente para ser considerada homóloga. O soro contra sua forma recombinante detectou as formas nativas integral e secretada e demonstrou que NcTRAP 2 possui capacidade de inibir a invasão dos taquizoítas, o que a torna um interessante alvo vacinal.

Palavras chave: *Neospora caninum*, Apicomplexa, Micronemas, Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina

ABSTRACT

PEREIRA, L. M. **Characterization of the thrombospondin related anonymous protein 2 (TRAP 2) of the protozoan *Neospora caninum* in the cell invasion process.** 2009. p.88. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Neospora caninum is an Apicomplexan protozoan, obligatory intracellular parasite that has the dog as definitive host and especially cattle as intermediate hosts, causing in the first ones encephalopathy and in the last ones abortion with fertility losses. Such facts lead to significant losses to livestock worldwide. The parasite must invade the cells for its development, using the discharge of proteins contained in phylum-specific organelles, like the micronemes proteins related with adhesion and active invasion, besides the proteins from rhoptries and dense granules. This work was performed on a type of micronemic protein, a thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), related with adhesion and connection with the intracellular motor responsible for the active process of invasion. Based on the homologue previously described in the literature, TRAP 1, the aim of this study was the characterization of the undescribed TRAP 2 homologue, the expression of its recombinant forms, the use of its anti-sera for functional assays, and detection of its native form. Based on ESTs and genomic data from *N. caninum*, and using the RLM-RACE (ligase mediated rapid amplification of cDNA ends) technique, the complete sequence of NcTRAP 2 was obtained, which had four exons separated by three introns. As NcTRAP 1, the protein sequence is composed of a signal peptide, an integrin, five thrombospondin, a transmembrane region and a cytoplasmatic tail. The integrin and thrombospondin motifs are related to adhesion for initiation of the invasive process and were the targets of this work. We expressed two recombinant fragments from the functional core (thrombospondin and integrin), with 52 and 78 kDa, which were utilized for antisera production. The anti-sera localized the native form NcTRAP 2 which had approximately 80 kDa, and its processed form in ESA (Excreted/Secreted Antigen) with 70 kDa, both in western blot 1D and 2D. The serum against recombinant 1 had the ability to inhibit the invasive process from 53 to 61%, depending on the experimental method used (manual counting or real time PCR). NcTRAP 2 was localized at the apical complex of the parasite of the tachyzoites by confocal immunofluorescence, pointing towards its micronemal localization. The new molecule, NcTRAP 2, holds features that differentiates it from NcTRAP 1 in a substantial way to be considered homologue. The serum against the recombinant form detected the native full length and secreted forms of NcTRAP 2 and demonstrated that NcTRAP 2 has the ability to inhibit the invasion of tachyzoites, turning it into an interesting vaccine target to be investigated.

Keywords: *Neospora caninum*, Apicomplexa, Micronemes, Thrombospondin-related Anonymous Protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>N. caninum</i>	3
Figura 2. Modelo de invasão celular de um Apicomplexa baseado em <i>Plasmodium</i> e sua célula hospedeira, o eritrócito.....	5
Figura 3. Modelo de invasão celular e mobilidade deslizante de <i>T. gondii</i>	9
Figura 4. Ilustração esquemática da complexidade de domínios em proteínas TRAP de parasitas Apicomplexas.....	10
Figura 5. Posicionamento esquemático dos fragmentos protéicos em relação à sequência proteica.....	21
Figura 6. Representação esquemática de íntrons e éxons do gene NcTrap 2.....	41
Figura 7. Alinhamento das proteínas homólogas a NcTRAP 2 e localização dos fragmentos clonados, da região transmembrana e peptídeo sinal.....	42
Figura 8. RNA de <i>N. caninum</i>	45
Figura 9. Clonagem dos fragmentos NcTRAP 2.....	46
Figura 10. Expressão dos fragmentos recombinantes de NcTRAP 2.....	47
Figura 11. Purificação das proteínas recombinantes NcTRAP 2.....	48
Figura 12. Controle sem antígeno da reação Imuno-enzimática.....	49
Figura 13. Controle sem soro da reação Imuno-enzimática.....	50
Figura 14. Controle sem conjugado da reação Imuno-enzimática.....	50
Figura 15. Controle sem antígeno e sem anticorpo da reação Imuno-enzimática.....	51
Figura 16. Análise da soro conversão dos animais imunizados com extrato total ou com as formas recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2 contra seus respectivos antígenos.....	53
Figura 17. Detecção de NcTRAP 2 nativa pelos soros de animais imunizados com as formas recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2.....	55
Figura 18. Detecção de NcTRAP 2 (recombinantes 1 e 2) de <i>N. caninum</i> pelo soro de animais imunizados com extrato total de <i>N. caninum</i>	56

Figura 19. Detecção de NcTRAP 2 recombinante 1 e recombinante 2 pelos respectivos soros cruzados.....	57
Figura 20. Western blot 1D para detecção dos fragmentos recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2 de <i>N. caninum</i> , controle sobre BL21 e ensaios cruzados.....	58
Figura 21. Western blot 1D para detecção da proteína nativa NcTRAP 2 de <i>N. caninum</i> e seus controles.....	60
Figura 22. Western blot 1D do extrato secretado (ESA) de <i>N. caninum</i> e seus controles.	61
Figura 23. Western blot 2D sobre extrato total de <i>N. caninum</i> , controle sobre extrato de Vero e co-localização dos spots em gel 2D (gel 12,5%, strip 3-11 NL).....	63
Figura 24. Proteínas Vero reconhecidas pelo soro anti-recombinante 1 e localização das mesmas em gel 2D com extrato total de <i>N. caninum</i> (gel 12,5%, strip 3-11 NL).....	64
Figura 25. Western blot 2D sobre extrato de <i>N. caninum</i> total utilizando soro anti-extrato total (gel 12,5%, strip 3-11 NL).....	65
Figura 26. Localização de NcTRAP 2 nativa em gel 2D, reconhecidas pelo soro anti-recombinante 1 e anti-extrato total (gel 12,5%, strip 3-11 NL).....	65
Figura 27. Western blot 2D sobre ESA de <i>N. caninum</i> e controle com ESA de Vero com respectivas localizações dos spots em gel 2D (gel 12,5%, strip 3-11 NL).....	66
Figura 28. Curva padrão, real time PCR de <i>N. caninum</i>	67
Figura 29. Ensaio de invasão, taquizoítas de <i>N. caninum</i> em células hospedeiras.....	69
Figura 30. Imuno-localização de NcTRAP 2 por microscopia confocal em taquizoítas de <i>N. caninum</i>	71
Figura 31. Experimento controle em microscopia confocal com soro pré-imune em taquizoítas de <i>N. canino</i>	72
Figura 32. Alinhamento da sequência protéica de NcTRAP 2 com NcTRAP 1 (<i>N. caninum</i>) e TgMIC 2 (<i>T. gondii</i>).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers com sítios de restrição para obtenção de fragmentos de NcTRAP 2 utilizados na clonagem e expressão.....	21
Tabela 2 - Primers utilizados em real time PCR.....	37
Tabela 3 - Comparação entre as sequencias de TRAP nos Apicomplexas.....	44

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP** - Trifosfato de Adenosina
- CD 36** - Cluster de Diferenciação 36
- CHAPS** - Cloramidopropil-dimetilamonio-propano-sulfonato
- CTRP** - Proteína Relacionada à Trombospondina do Circunsporozoíta
- DB71** - Azul Direto 71
- DEPC** - Dietilpirocarbonato
- DHoDH** - Dihidrooorotato Desidrogenase
- DNA** - Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP** - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- DTT** - Ditioneitol
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA** - Ensaio Imunoenzimático
- ESA** - Extrato Secretado de Apicomplexa
- EST** - Expressed Sequence Tag
- FA** - Tampão Formamida Acetato
- FITC** - Isotiocianato de Fluoresceína
- GAG** - Glicosaminoglicana
- GAP** - Proteína Deslizante Associada
- gp120** - glicoproteína 120
- GPI** - Glicosil-Fosfatidil-Inositol
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IL-12** - Interleucina 12
- IMC** - Complexo de Membrana Interno
- IMP** - Partículas de Membrana Interno
- IPTG** - Isopropil Tiogalactopiranosida
- LB** - Meio Luria-Bertani
- LFA** - Fator Associado ao Leucócito
- M2AP** - Proteína Associada a proteína Micronêmica 2
- MIC** - Proteína micronêmica
- MIDAS** - Sítio de Adesão Íon-Metal Dependente

MLC - Miosina de Cadeia Leve

MPP - Protease da Proteína Micronêmica

MyoA - Miosina A

OD - Densidade Ótica

PBS - Tampão Fosfato Salino

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

PI - Ponto Isoelétrico

PVDF - Fluoreto de Polivinilideno

RNA - Ácido Ribonucléico

RNase H - Ribonuclease H

ROM - Rombóide

RPMI - Royal Park Memorial Institute

SNC - Sistema Nervoso Central

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TAQ - *Thermus aquaticus* Polimerase

TCA - Ácido Tricloroacético

TMB - Tetrametilbenzidina

TRAP - Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina

TSP - Trombospondina

UV - Ultravioleta

vWFa - Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ciclo de vida.....	2
1.2. Invasão celular como alvo de estudo.....	4
1.3. Organelas secretoras em Apicomplexas.....	5
1.4. Proteínas micronêmicas.....	6
1.5. O modelo de motilidade deslizante (“gliding motility”) para os Apicomplexas.....	7
1.6. Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina 2, TRAP 2.....	9
1.7. TRAPs em <i>Neospora caninum</i>	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Cultura <i>in vitro</i> de <i>N. caninum</i> e purificação dos taquizoítas.....	14
3.2. Extratos protéicos totais de <i>N. caninum</i> e Vero.....	14
3.3. Obtenção do Extrato secretado de <i>N. caninum</i> – ESA.....	15
3.4. Extração de DNA genômico de <i>N. caninum</i>	15
3.5. Eletroforese em gel de agarose.....	16
3.6. Extração de RNA.....	16
3.7. Síntese de cDNA.....	16
3.8. Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	17
3.9. Preparação de células eletrocompetentes.....	17
3.10. Purificação dos plasmídeos (minipreps).....	18
3.11. Purificação do gel de agarose.....	19
3.12. Obtenção da porção 5’ restante de NcTrap 2.....	19
3.12.1. Análise da sequência de NcTRAP 2.....	20
3.13. Clonagem em plasmídeo de expressão (pET28).....	21
3.13.1. Preparo pET28.....	21
3.13.2. Obtenção dos fragmentos de NcTrap 2 para clonagem.....	22
3.14. Análise da Expressão e purificação dos recombinantes 1 e 2.....	23
3.14.1. Extração total.....	24
3.14.2. Extração solúvel e insolúvel.....	24
3.15. Purificação das proteínas recombinantes em coluna de níquel.....	25
3.16. Quantificação das proteínas recombinantes.....	25
3.17. Imunização.....	26
3.18. Purificação dos soros para obtenção de IgG.....	26
3.19. Purificação dos anticorpos contra as estruturas de <i>E. coli</i>	27
3.20. ELISA.....	27
3.21. Eletroforese acrilamida.....	28

3.21.1. Eletroforese unidimensional.....	28
3.21.2. Eletroforese bidimensional.....	29
3.21.2.1. Primeira dimensão ou focalização isoelétrica.....	29
3.21.2.2. Segunda dimensão.....	30
3.22. Coloração dos géis.....	30
3.22.1. Coloração por comassie blue R.....	31
3.22.2. Coloração por comassie blue G-250.....	31
3.22.3. Coloração por prata.....	31
3.23. Captação de imagens.....	32
3.24. Western blot.....	32
3.25. Parâmetros western blot 1D e 2D.....	33
3.25.1. Soros anti-recombinantes x imunógenos.....	33
3.25.2. Soros anti-recombinantes x Extrato total.....	33
3.25.3. Soro anti-extrato total x Extrato total.....	34
3.25.4. Soros anti-recombinantes x ESA.....	34
3.26. Ensaios de invasão.....	34
3.26.1. Contagem manual.....	34
3.26.2. Contagem por Real Time PCR.....	35
3.27. Real time PCR.....	37
3.27.1. Primers e temperatura de anelamento.....	37
3.27.2. Reação.....	38
3.27.3. Curva de calibração.....	38
3.27.4. Contagem de parasitas invasivos.....	38
3.28. Imunofluorescência.....	39
3.29. Análise estatística dos resultados.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Obtenção da sequencia completa de NcTrap 2.....	41
4.2. Clonagem dos fragmentos de NcTRAP 2 para expressão heteróloga.....	44
4.3. Expressão heteróloga dos fragmentos 1 e 2 de NcTRAP 2 e purificação.....	47
4.4. ELISA.....	48
4.4.1. Controles ELISA.....	48
4.4.2 - Concentrações Antígeno, Anticorpo e conjugado.....	51
4.4.3. Avaliação da evolução da resposta sorológica contra o extrato total e os recombinantes 1 e 2.....	52
4.4.3. Reações cruzadas.....	54
4.4.4. Detecção de NcTRAP 2 nativa pelos soros anti-recombinantes.....	54
4.4.5. Reconhecimento de NcTRAP 2 recombinantes 1 e 2 por anticorpos do soro anti-extrato total de <i>N. caninum</i>	56
4.4.6. Ensaio cruzado entre recombinantes.....	57
4.5. Western blot 1D.....	58
4.5.1. Reatividade dos soros dos animais imunizados com seus imunógenos recombinantes.....	58
4.5.2. Reatividade dos soros dos animais imunizados sobre NcTRAP 2 nativa.....	59
4.5.3. Reatividade dos soros recombinantes sobre extrato secretado (ESA).....	61
4.6 – Western blot 2D.....	62
4.6.1. Localização NcTRAP 2 nativa em western blot 2D.....	62
4.6.2. Western blot 2D com soro de animal imunizado com extrato total.....	64

4.6.3. Localização de NcTRAP 2 nativa em extrato secretado (ESA) por Western blot 2D.....	66
4.7. Curva de calibração real time PCR.....	67
4.8. Ensaio de invasão.....	68
4.9. Imuno-localização de NcTRAP 2 por microscopia confocal em taquizoítas de <i>N. caninum</i>	70
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS.....	79
8. ANEXO.....	88

1 - INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa isolado em 1988 por DUBEY e colaboradores ao investigarem a origem de uma severa desordem neuromuscular de um cachorro. A doença causada por este parasita foi descrita em cães em 1984, ovelhas em 1987 e relacionado a perdas na bovinocultura em 1988 (DUBEY et al., 1988). Devido a semelhanças morfológicas, bioquímicas e com o ciclo possuindo dois tipos de hospedeiros com cinética parecida, os casos foram reportados como causados por *Toxoplasma gondii*, encobrindo a ação desta nova espécie de parasita (HEMPHILL et al., 2006).

N. caninum possui o cão como hospedeiro definitivo e os bovinos como principal hospedeiro intermediário, enquanto *T. gondii* possui o gato como hospedeiro definitivo e humanos, ovinos e caprinos como principais hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2007). Apesar da semelhança morfológica, vários estudos indicam diferenças morfológicas, estruturais, moleculares e antigênicas entre as duas espécies (DUBEY & LINDSAY., 1996; HEMPHILL., 1999; HOWE & SIBLEY., 1997). Uma característica biológica comum importante entre *N. caninum* e *T. gondii* reside na baixa especificidade celular *in vitro*: pois ambos são capazes de infectar diversos tipos celulares; aparentemente todas as células nucleadas (DUBEY & LINDSAY., 1996; HEMPHILL., 1996).

A transmissão de *N. caninum* pode ocorrer via transplacentária de uma maneira altamente eficiente causando a neosporose fetal, com perdas relacionadas a aborto fetal, morte neonatal, doenças clínicas e subclínicas de bezerros (WILLIAMS et al., 2000; TREES et al., 2002; CORBELLINI et al., 2002, 2006; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003) além de redução da fertilidade e diminuição do valor de matrizes infectadas, levando a importantes perdas econômicas no setor de criação bovina (TREES et al., 1999).. Possíveis rotas de transmissão pós-natal do parasita são através da ingestão de oocistos contendo esporozoítas, os quais são disseminados através das fezes de cães infectados ou pela ingestão de tecidos infectados, tais como fetos abortados, placenta ou outro tecido bovino infectado contendo taquizoítas ou cistos teciduais com bradizoítas. (ANDERSON et al., 2006; TREES & WILLIAMS., 2005; GONDIM et al., 2002; DIJKSTRA et al., 2001). Há pesquisas correlacionando o aumento da soroprevalência de *N. caninum* com a

presença de aves, sendo estas possíveis reservatórios (MINEO et al., 2009) e elementos de disseminação de difícil controle. *N. caninum* já foi detectado nos hospedeiros definitivos e/ou intermediários em diversos países (como Brasil, Austrália, Itália, Japão, Reino Unido, Estados Unidos, Países Baixos, Argentina, Alemanha, França, Rússia) e em praticamente todos os continentes (DUBEY et al., 2007). A epidemiologia até agora consultada mostra que não há limitação ambiental para a distribuição geográfica de *N. caninum*, sendo detectado em todos os climas habitáveis pelos seus hospedeiros. No Brasil, *N. caninum* já foi diagnosticado *in situ* em fetos abortados de bovinos e de isolados de bovinos e cães (CORBELLINI et al., 2006; GONDIM et al., 1999a; 2001; LOCATELLI-DITTRICH., 2003). Os búfalos parecem representar importantes reservatórios naturais de *N. caninum* no país (RODRIGUES., 2004, 2005). Excluindo-se os eqüinos, *Neospora spp* já foi descrita sorologicamente, para bovinos e/ou cães (DRIEMEIER et al., 2006; AGUIAR et al., 2006; CORBELLINI et al., 2002, 2006; ANDREOTTI et al., 2006; AZEVEDO et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2004; FERNANDES et al., 2004; CÂNON-FRANCO et al., 2003, 2004; SOUZA et al., 2002; GENNARI et al., 2002; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; MINEO et al., 2001; GONDIM et al., 1999b), ovinos (FIGLIUOLO et al., 2004) cervídeos do gênero *Mazama* (TIEMANN et al., 2005), do genero *Odocoileus* (ANDERSON et al., 2006), veados-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) (TIEMANN et al., 2005), lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VITALIANO et al., 2004), raposa-caranguejeira *Cerdocyon thous*) e graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*) (CANON-FRANCO et al., 2004), gambá (*Didelphis marsupialis*) (YAI et al., 2003), búfalos (GENNARI et al., 2005, Fuji et al., 2001), gatos (BRESCIANI et al., 2006, DUBEY et al., 2002) , capivaras (CÂNON-FRANCO et al., 2003) .

1.1- Ciclo de vida

O ciclo de vida de *N. caninum* ainda não se encontra totalmente elucidado quanto à definição completa de todos hospedeiros definitivos e intermediários. Durante o ciclo há três principais estágios: esporozoítas em oocistos, taquizoítas e bradizoítas em cistos teciduais. Os oocistos são produzidos nas fezes dos cães, após a ingestão de *N. caninum* na forma de bradizoítas (BUXTON et al., 2002). Os cães (*Canis familiaris*) e coiotes (*Canis latrans*) foram identificados como hospedeiros

definitivos para o *N. caninum*, liberando os oocistos no ambiente através das fezes (DUBEY et al., 2006; MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004).

Figura 1 – Ciclo de vida do *N. caninum*. (adaptado de DUBEY., 2003)

Os taquizoítas pertencem ao estágio de multiplicação mais rápido de *N. caninum* e é neste estágio que ocorrem lesões resultantes da sua multiplicação, seguida pela invasão e ruptura de células neurais, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais vasculares, hepatócitos e diversos outros tipos celulares (DUBEY., 2003). Se não houver resposta imunológica do hospedeiro durante este período, os taquizoítas continuam a se multiplicar causando mais mortes celulares (BUXTON, et al., 2002).

Os bradizoítas se multiplicam lentamente e são encontrados em cistos teciduais no sistema nervoso central (SNC), tanto no hospedeiro definitivo como nas várias espécies que representam os hospedeiros intermediários. Os cistos teciduais são as formas latentes da infecção, uma vez que um hospedeiro intermediário com sistema imune apto não fornece condições propícias para o desenvolvimento dos protozoários, podendo persistir por muitos anos (INNES et al., 2002).

1.2 - Invasão celular como alvo de estudo

Todos Apicomplexas são parasitas intracelulares obrigatórios e invadem as células hospedeiras por um mecanismo conservado e extremamente bem sucedido. O processo de invasão à célula hospedeira é totalmente dirigido pelo parasita, num processo conhecido por entrada ativa, diferindo da entrada induzida provocada por bactérias invasivas (CESBRON-DELAUW et al.; 2008).

A invasão celular exige que o parasita utilize seu próprio sistema de actina/miosina (DOBROWOLSKI & SIBLEY., 1996; DOBROWOLSKI et al., 1997; SOLDATI et al., 2001; MEISSNER et al., 2002), ou seja, a célula hospedeira não possui uma função ativa, como ocorre por fagocitose para alguns protozoários e no engolfamento de parasitas intracelulares (como para *Leishmania*). Os Apicomplexas penetram sem alterar a actina do hospedeiro e são independentes do cálcio da célula hospedeira, ao invés; utiliza-se de um mecanismo de secreção regulado por cálcio intracelular (CARRUTHERS & SIBLEY., 1999).

A invasão da célula hospedeira pelo estágio infectante do Apicomplexa é composta por um processo multi-fatorial (ilustrado na Figura 2). Num primeiro momento ocorre a interação entre o estágio infectante (zoíta) e a célula hospedeira (Fig2A e Fig.3). Num segundo instante o zoíta sofre uma reorientação para que sua proeminência apical entre em contato com a superfície da célula hospedeira (Fig2B). Num terceiro momento ocorre a adesão entre o parasita e a célula hospedeira, formando uma junção entre o zoíta e a membrana da célula de forma irreversível (tight junction), e liberação de proteínas das micronemas (Fig2C). Após a formação desta junção, inicia-se o movimento da junção ao redor do zoíta invasivo (Fig2D), processo esse que culmina com a invasão do parasita dentro da célula ao redor de um vacúolo parasitóforo (Fig2E,F,G).

Figura 2 - **Modelo de invasão celular de um Apicomplexa baseado em *Plasmodium* e sua célula hospedeira, o eritrócito.**

- A) Interação inicial
- B) Reorientação apical
- C) Adesão entre parasita e célula hospedeira e liberação das proteínas micronêmicas
- D) Envaginamento da membrana com liberação das proteínas de roptrias (em azul)
- E) Fechamento da membrana da célula hospedeira, formação do vacúolo parasitóforo.

1.3 - Organelas secretoras em Apicomplexas

Um processo essencial do ciclo de *N. caninum* é a invasão celular, ou seja, a interação parasita/célula hospedeira. Trata-se de um mecanismo complexo que parece ser similar ao dos outros Apicomplexas, já que todos são organismos intracelulares obrigatórios. Participam do processo receptores de superfície associados a uma série de proteínas liberadas pelas micronemas, roptrias e grânulos densos que contêm proteínas relacionadas ao processo de reconhecimento, movimentação, invasão e replicação dos Apicomplexas.

As micronemas e roptrias estão localizadas na porção anterior do parasita (complexo apical) enquanto os grânulos densos estão mais amplamente distribuídos pelo citoplasma (JOINER & ROOS., 2002; RAVIDRAN & BOOTHROYD., 2008). Esses três tipos são secretados sequencialmente, as micronemas no momento da interação parasita/hospedeiro, as roptrias no momento da invasão e os grânulos densos na formação do vacúolo parasitóforo (RAVIDRAN & BOOTHROYD., 2008; JOINER & ROOS., 2002; ROY et al., 2006). Micronemas e roptrias são fundamentais para invasão, processo que leva aproximadamente 15 a 20 segundos, sendo que a descarga das micronemas leva a uma forte interação entre parasita e hospedeiro (RAVIDRAN & BOOTHROYD., 2008), enquanto os grânulos densos são

fundamentais para o estabelecimento do parasita no vacúolo formado, bem como sua replicação (JOINER & ROOS., 2002).

As micronemas são organelas que contém uma mistura concentrada de proteínas adesivas liberadas para invasão parasitária (JOINER & ROOS., 2002; CARRUTHERS & BOOTHROYD., 2007). As proteínas micronêmicas formam complexos no retículo endoplasmático formadas pelo menos por uma proteína transmembrana associada a proteínas solúveis adicionais. Em *T. gondii* as proteínas micronêmicas estão em associação com proteínas ancoradas à membrana. (SHEINER & SOLDATI-FREVER., 2008).

T. gondii possui um conjunto de 8 a 12 roptrias que possuem forma de clava, consistindo de um corpo bulboso e um pescoço estreito e eletro denso (SHEINER & SOLDATI-FREVER., 2008). Há descobertos cerca de 30 proteínas nas roptrias, sendo parte transmembrana e parte constituindo seu conteúdo interno. Algumas proteínas das roptrias são homólogas a quinases, fosfatase e proteases, relevando sua importância para as funções do parasita (SHEINER & SOLDATI-FREVER., 2008). Em *T. gondii* a descarga das roptrias ocorre seguindo a descarga micronêmica, coincidindo e contribuindo para a formação do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS & SIBLEY., 1997). Após a descarga, suas proteínas ou permanecem associadas ao vacúolo parasitóforo ou são exportadas para célula hospedeira onde participarão de processos de remodelamento celular (ROY., et al.; 2006; DUBREMETZ., 2007). Os grânulos densos são vesículas pós-Golgi, envolvidas no transporte de proteínas solúveis. As proteínas neste grânulo podem estar na forma de agregados ou simplesmente na forma solúvel, sendo secretadas para formação e manutenção do vacúolo parasitóforo (JOINER & ROOS., 2002; SHEINER & SOLDATI-FREVER., 2008).

1.4 - Proteínas micronêmicas

As proteínas micronêmicas possuem módulos que são homólogos a domínios adesivos de eucariotos superiores já sendo comprovada sua capacidade de ligação às células hospedeiras (DICRISTINA et al., 2000). Há cerca de uma dúzia de proteínas micronêmicas descritas em *T.gondii*, sendo que três se apresentam como complexos heteroméricos, MIC 2/M2AP, MIC1/4/6 e MIC 3/8 (BRYDGES et al.; 2008, CEREDÉ et al.; 2005). Estes complexos são formados por uma proteína solúvel que

se associa com uma transmembrana sendo carregado até sua secreção (EL HAJJ et al.; 2008).

A caracterização molecular das proteínas micronêmicas tem revelado conservação de domínios estruturais que mantêm homologia com domínios adesivos de eucariotos superiores (BROSSIR & SIBLEY.; 2005). Estes motivos estão presentes em uma ou múltiplas cópias e um grande número de combinações destes blocos foram identificados, sendo cada proteína micronêmica estruturalmente única. A diversidade das adesinas presentes nas micronemas pode abrir rotas alternativas e fortalece a capacidade invasiva dos Apicomplexas, possibilitando invadir diferentes tipos celulares em diferentes estágios de seu ciclo (SOLDATI et al.; 2001). Os Apicomplexas em estágio invasivo apresentam relativa mobilidade sobre as células antes da invasão, em parte devido à ligação da porção citoplasmática das proteínas micronêmicas a um motor de actino-miosina do parasita (TARDIEUX & MÉNARD., 2008).

Várias proteínas micronêmicas são capeadas actina-dependente (preparadas para ligação a aldolase para formação do sistema motor de actina miosina) após a secreção pelo parasita suportando a idéia que há uma função como ligantes, direta ou indiretamente entre o sistema de actino-miosina do parasita e a superfície das células hospedeiras (CEREDE et al.; 2005). Há homologia entre as caudas citoplasmáticas de diversas MICs de diferentes Apicomplexas, e experimentos demonstram que a troca das regiões homólogas inter-espécies não muda a capacidade invasiva (SOLDATI et al.; 2001).

1.5 - O modelo de motilidade deslizante (“gliding motility”) para os Apicomplexas

O modelo de invasão celular atualmente em vigor para *T. gondii*, que se acredita ser conservado entre vários Apicomplexas, está representado na Fig3A. Durante a invasão, as micronemas (em vermelho) e as roptrias (azuis) são secretadas sequencialmente. As MICs são liberadas para a superfície do parasita, redistribuídas em direção ao pólo posterior e excluídas do vacúolo em formação durante o processo de invasão. Já as proteínas de roptrias acumulam dentro do vacúolo parasitóforo (SOLDATI & MEISSNER., 2004).

O modelo presente baseia-se no fato de que os Apicomplexas usam motilidade deslizante (“gliding motility”) para a invasão da célula hospedeira (Fig3B). Para que essa motilidade ocorra é necessário que ocorram interações coordenadas entre as adesinas presentes na superfície celular (como TRAP) e o citoesqueleto do parasita. A película de Apicomplexas é composta pela membrana plasmática e o Complexo de Membrana Interno (Inner Membrane Complex, IMC). O complexo molecular motor composto de miosina A (MyoA) e sua miosina de cadeia leve (MLC) é ancorado de um lado por duas proteínas deslizantes-associadas GAP45 e GAP50 com o citoesqueleto do parasita (partículas das membranas internas (IMP), os filamentos subpeliculares (IMC network, IMC e os microtúbulos). Do outro lado do complexo motor a F-actina é ancorada por um substrato extracelular (no caso de invasão, a superfície da célula hospedeira) auxiliada por aldolase, que liga F-actina com uma MIC adesiva (tendo sido demonstrados o papel de TgMIC 2 e PfTRAP nesse processo) (JEWET & SIBLEY., 2003, BUSCAGLIA et al., 2003). Pelo fato dos componentes estarem conectados com ambos o parasita e a estrutura extracelular, a força motriz exercida pela miosina A (MyoA) sobre actina resulta em movimento do parasita em relação ao seu ponto de ancoragem extracelular. Há evidências que as fibras de actina se polimerizam no momento da adesão, possibilitando a formação do motor para invasão, desfazendo-se após sua conclusão (OPITZ et al., 2002).

Para liberação do parasita do complexo de ligação à célula hospedeira, algumas proteínas são clivadas após a liberação, contribuindo para a dissolução dos complexos formados e interrupção da junção de movimento no fim do processo de invasão. TgMIC 2, a proteína TRAP de *T. gondii*, possui importância no processo de reconhecimento e invasão (STARNES et al., 2006), sendo proteoliticamente clivado em múltiplos sítios por enzimas que operam na superfície do parasita, conhecidas por rombóides. Em *T. gondii* as rombóides são um grupo de proteases com função parecida a MPP1 e 2, sendo que seis já foram detectadas e clonadas em *T. gondii*, TgROM 1, TgROM 2, TgROM 3, TgROM 4, TgROM 5 e TgROM 6. A numeração presente na nomenclatura foi determinada seguindo apenas a ordem de descoberta de cada proteína (DOWSE & SOLDATI., 2005). Nos ensaios, TgROM 2 possui atividade sobre o sítio de MIC 2, homólogo de NcTRAP 2 em *N. caninum*, responsável pela clivagem do sítio IAGG e liberação do parasita (BROSSIER et al.; 2008).

Figura 3 - **Modelo de invasão celular e mobilidade deslizante de *T. gondii* (Soldati et al 2004).**

A) As proteínas presentes em micronemas (em vermelho) e roptrias (em azul) são secretadas sequencialmente. B) O modelo de mobilidade deslizante envolvendo associações entre GAP45 e GAP50 com o citoesqueleto do parasita (IMC e microtúbulos) que ancoram miosina A e miosina de cadeia leve (MLC). A outra parte do complexo motor é composto de f-actina que se liga a uma proteína micronêmica (TRAP) via aldolase. A força exercida por miosina A sobre actina resulta no movimento do parasita para dentro da célula hospedeira. A clivagem de TRAP é necessária para que a invasão ocorra com sucesso por uma protease romboide (STARNES et al., 2006). Os ligantes presentes nas células hospedeiras (indicados em preto) são desconhecidos.

1.6 – Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina 2, TRAP 2

Uma família de proteínas micronêmicas bem conservada entre os Apicomplexas são as Proteínas Anônimas Relacionadas à Trombospondina (TRAP). Com diversas denominações, membros TRAP existem em esporozoítas de *Plasmodium* (TRAP), em oocinetos de *Plasmodium* (CTRP) e em *T. gondii* (MIC 2) (SULTAN et al., 1997, MENARD 2000, DESSENS et al., 1999, WAN et al., 1997, HUYNH et al., 2004). Existem membros de TRAP em outros Apicomplexas, como em *B. bovis* (GAFFAR et al., 2004), *Eimeria* (EtMIC1), (TOMLEY et al., 2001), *N. caninum* (NcMIC 2, LOVETT et al., 2000) e *Cryptosporidium parvum* (DENG et al., 2002), porém os estudos que levaram ao modelo atual de invasão foram baseados em manipulações genéticas realizadas em *Plasmodium* e *T. gondii*. Todos os membros TRAP em Apicomplexas são proteínas transmembranas tipo I e possuem um número variável de 2 domínios adesivos extracelulares: i) domínio I de integrinas ou domínio tipo A do fator de von Willebrand (vWFA) e ii) trombospondina tipo I (TSR ou TSP-1) (STARNES et al., 2006). A figura 4 mostra a representação esquemática

dos domínios em diferentes proteínas TRAP. O número dos motivos TSP e vWfa em *N. caninum*, *T. gondii* e *Eimeria tenella* são idênticos.

Figura 4- Ilustração esquemática da complexidade de domínios em proteínas TRAP de parasitas Apicomplexas. NcTRAP 1: *Neospora caninum*, número de acesso: AAF01565, TgMIC 2: *T. gondii*, AAB63303, EtMIC1: *Eimeria tenella*, M73495, BbTRAP: *Babesia bovis*, AAS58046, PfTRAP: *Plasmodium falciparum*, AAC1867, PfCTRTP: *P. falciparum*, AAC46961.

A integrina A de TRAP de *T. gondii* está configurada como uma α -hélice semelhante ao antígeno de função associada a leucócito 1 (LFA-1), Mac-1, algumas β integrinas, fator B e colágeno IV. O domínio possui um sítio de ligação a cátion denominado sítio de adesão íon-metálico dependente, MIDAS. MIDAS possui cinco resíduos conservados Asp, Ser, Ser, Thr e Asp que fazem ligação coordenada com cátions divalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} , sendo que mutações neste resíduos aboliram a capacidade de interação entre a integrina A e seus ligantes conhecidos (BROSSIER & SIBLEY., 2005). Interações com heparina, heparina sulfato, chondroina sulfato A e C foram importantes para o processo de invasão de *T. gondii*, e estas associações foram mediadas em parte por TRAP (BROSSIER & SIBLEY., 2005).

As trombospondinas estão envolvidas na interação com vários ligantes, incluindo GAGs (glicosaminoglicanas), CD 36 ou HIV gp120 (ligante a glicoproteínas da superfície do vírus HIV). Estes domínios geralmente se ligam a glicoconjugados

sulfurados, altamente variáveis e encontrados na superfície celular, gerando à esta molécula especificidade para com a superfície celular (DUBREMETZ et al.; 1998, CEREDE et al.; 2005, BROSSIER & SIBLEY., 2005). A mutação de um dos domínios conservados de trombospondina em *T. gondii* inibiu a invasão sem destruir sua capacidade de ligação e interação à célula hospedeira. Apenas a primeira trombospondina de TRAP está bem conservada e possivelmente seja responsável pela interação com as células hospedeiras (BROSSIER & SIBLEY., 2005).

A região transmembrana das TRAPs de Apicomplexas mostram alto grau de conservação e contém pequenos resíduos hidrofóbicos. Mutações na lisina 692 de MIC 2 (TRAP) de *T. gondii*, 11 aminoácidos acima a região transmembrana previne a clivagem por MPP1, conseqüentemente os parasitas mantêm a proteína mutada em sua superfície, mas perdem muito sua capacidade invasiva (DOWSE & SOLDATI., 2005). Porém, a lisina apenas possui função de reconhecimento sendo que a clivagem ocorre na região transmembrana (BROSSIER & SIBLEY., 2005). A região de clivagem em TgMIC 2 fica entre os aminoácidos IAGG, estando claramente conservado entre várias proteínas micronêmicas (DOWSE & SOLDATI., 2005). Esta região IAGG também está presente em NcTRAP 1, sugerindo que o processo ocorra semelhantemente.

Todas as proteínas TRAP possuem uma cauda C-terminal contendo triptofano cuja substituição por uma alanina transformou esporozoítas em não invasivos ou sem motilidade ou com motilidade anormal (KAPPE et al., 1999, STARNES et al., 2006). Essa região está envolvida na interação de TRAP com aldolase que por sua vez recruta F-actina (JEWETT & SIBLEY., 2003; BUSCAGLIA et al., 2003; KAPPE et al., 1999). A Aldolase serve, portanto, como um elo entre os domínios extracelulares de MIC 2 ou TRAP com o citoesqueleto. A força gerada pelo motor de actina/miosina puxa TRAP em direção ao pólo posterior do parasita e causa o movimento do parasita para dentro da célula. A configuração em espiral deste complexo facilita energeticamente a entrada do parasita (OPITZ et al., 2002). As regiões C-terminal de TRAP são funcionalmente homólogas entre *T. gondii* e *P. falciparum* (KAPPE et al., 1999), sugerindo que esse tipo de proteína seja ativa em todas as espécies de Apicomplexas para atuar em adesão.

A deleção de TgMIC 2 (TRAP) é fatal para *T. gondii* (BROSSIER & SIBLEY., 2005; HUYNH et al., 2004), sendo essencial para a motilidade deslizante e invasão celular pelos esporozoítas de malária (SULTAN et al., 1997; KAPPE et al., 1999). A

proteína recombinante TRAP de *P. falciparum* (PfTRAP), presente em oocinetos (estágio desenvolvido dentro do mosquito), está em fases avançadas de testes vacinais (BAUM et al., 2006), sugerindo que outras proteínas TRAP de Apicomplexas possam ser opções para terapêuticas profiláticas.

1.7 - TRAPs em *Neospora caninum*

Em *N. caninum* cinco proteínas micronêmicas foram descritas até o momento, NcMIC1, NcMIC 2, NcMIC3, NcMIC4 e NcMIC10 (NAGULESWARAN et al., 2002; KELLER et al., 2002; HOFF et al., 2001; SONDA et al., 2000; LOVETT et al., 2000). Análises preliminares de ESTs de *N. caninum* (descritas em Material & Métodos) nos despertaram para a presença de uma segunda potencial proteína TRAP, além da já descrita NcTRAP (correspondente a NcMIC 2), passando a ser denominada de NcTRAP 2. A presença de uma segunda TRAP em *N. caninum* representa algo inédito para coccídeos, incluindo-se *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*. Inúmeras investigações já foram feitas em *T. gondii* à procura de outros membros TRAP, mas sem sucesso, apesar dos mais de 70.000 ESTs disponíveis. Isso gerou, portanto, um interesse imediato em torno de NcTRAP 2, pois *T. gondii* é bastante próximo de *N. caninum* (MARSH et al., 1995; DUBEY et al, 2002; REICHEL et al.; 2007). Portanto, decidimos investigar neste trabalho a até então desconhecida segunda forma de TRAP em *N. caninum*, aqui denominada NcTRAP 2.

2 - OBJETIVOS

Caracterização da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 (TRAP 2) do protozoário *N. caninum* com os seguintes objetivos específicos:

- 1) Clonagem e sequenciamento do gene NcTrap 2 e comparação com homólogos em outros Apicomplexas;
- 2) Obtenção de soros contra NcTRAP 2 por imunização em coelhos das formas recombinantes;
- 3) Detecção da forma nativa de NcTRAP 2 por western blot 1D e 2D em extrato total e secretado;
- 4) Avaliação da participação de NcTRAP 2 no processo de invasão celular através de ensaios de inibição;
- 5) Localização de NcTRAP 2 no parasita por microscopia confocal.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cultura *in vitro* de *N. caninum* e purificação dos taquizoítas

As monocamadas de células VERO foram mantidas em garrafas de 25cm² e 75cm² a 37°C com 5% CO₂, em meio RPMI 1640 com 2 mM de glutamina (Gibco) contendo 5% de soro fetal bovino (Cultilab) e penicilina/estreptomicina (50U ou µg/ml). Os taquizoítas de *N. caninum* (cepa Nc1) foram mantidos em monocamadas de células VERO a 37°C com 5% CO₂ com meio RPMI 1640, glutamina (2mM) e antibiótico (Gibco- 100 unid /ml penicilina e 100 µg/ ml estreptomicina).

Após cinco dias da inoculação com os taquizoítas, as células infectadas foram desaderidas da garrafa com ajuda de um “scraper”. A seguir, foram realizadas repetidas passagens por agulha 26G_{1/2} para promover a lise de todas as células infectadas. O conteúdo obtido foi colocado em tubos Falcon 15/50 ml e centrifugado por 3 minutos a 1000 g, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 2,5 ml de PBS a 4°C. Este volume foi submetido à coluna PD10 (Sephadex G-25, Amersham Biosciences), previamente equilibrada em PBS. Foram recolhidas alíquotas de 1ml em eppendorfs de 1,5 ml (total de 10 ml). Após a centrifugação (3300g, 4°C, 3 minutos), os pellets encontravam-se nas alíquotas 4, 5 e 6. Todos os sobrenadantes das alíquotas 4, 5 e 6 foram desprezados e os pellets obtidos foram ressuspensos em 0,5 ml de PBS e contados em câmara de Neubauer. Após contagem o conteúdo foi centrifugado (12000g por 3 min, 4°C) e o pellet ressuspenso em volume adequado de meio RPMI 1640 (10⁷ taquizoítas /ml de meio).

3.2 – Extratos protéicos totais de *N. caninum* e Vero

Os extratos totais de *N. caninum* e Vero utilizados nas imunizações, Elisas, Western blots e eletroforeses 1D foram obtidos por sonicação em tampão uréia 8M, enquanto para eletroforeses e Western blots 2D foram ressuspensos em tampão com uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%.

3.3 – Extrato secretado de *N. caninum* - ESA

O extrato secretado de *N. caninum* (ESA) consiste na técnica *in vitro* de incubar os parasitas vivos a 37°C, simulando o ambiente do hospedeiro, para obter as proteínas solúveis de *N. caninum*, incluindo as proteínas das organelas secretórias. Após purificação, os taquizoítas foram centrifugados por 5 minutos a 4°C, 1000 g ressuspensos em meio RPMI a 4°C na concentração de 5×10^7 /ml e incubados por 10 minutos a 37°C. Em seguida os taquizoítas foram transferidos para gelo por 10 minutos.. Após o choque térmico os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 4°C, 1000 g, e o sobrenadante (ESA) foi centrifugado novamente por 10 minutos a 4°C, 10000 g.

Como a maior parte do conteúdo do ESA é de origem protéica, foi utilizado a precipitação em TCA (ácido tricloroacético)/acetona, que torna as proteínas insolúveis, possibilitando a purificação destas. Partes iguais de ESA em RPMI e TCA/acetona a -20°C (ácido tricloroacético 6M, ditiotretol 50mM em acetona) foram incubados por 40 minutos a -20°C e centrifugados por 15 minutos, 10000 g, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado em ditiotretol 10mM em acetona, centrifugado por 5 minutos, 10000 g, 4°C. O pellet foi seco ao ar e diluído em tampão uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%.

3.4 - Extração de DNA genômico de *N. caninum*

Os protocolos se assemelham aos descritos em SAMBROOKS et al.; 1989. Para extração de DNA genômico de *N. caninum* foram utilizados $3,0 \times 10^7$ taquizoítas purificados, aos quais foram adicionados 25 µl de tampão de lise (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 80 mM de EDTA pH 8,0; 2% de SDS e 0,1 mg/ml de proteinase K), incubados a 37°C por 1 hora. A esta solução foram acrescidos 200 µl de clorofórmio/fenol 1:1, centrifugada (14000 g , 8 minutos, 4°C) e desprezada a fase orgânica. A fase aquosa recebeu 1/10 do volume de 3M acetato de sódio, pH 5,0 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto e foi incubada por 12hs a -20°C. Após centrifugação (14000 g, 8 minutos, 4°C) o sobrenadante foi desprezado, foram adicionados 500 µl de etanol 70% a -20°C, centrifugado novamente (14000 g, 10 minutos, 4 °C), o pellet secado à temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM). A concentração de DNA foi quantificada

por espectrometria UV capilar (Genequant, GE Healthscience, nos comprimentos de onda 260nm e 280nm com os resultados expressos em ng/ μ l).

3.5 - Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose (0,8%) foi corrida em tampão TAE (0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA, pH 8,3), com voltagem constante de 100 V, amperagem livre (Easy Cast Mini, Owl Scientific) e corada com brometo de etídio (1,66 μ g/ml) (Amresco). As amostras foram diluídas em Tampão de amostra (6X, azul de bromofenol/ vermelho ciano) (Fermentas) e o marcador molecular (1,5 μ l/poço) utilizado foi o GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

3.6 - Extração de RNA

Extração de RNA total de taquizoítas de *N. caninum* foi feita com TrizolTM (Gibco-BRL), tratado com DNase I (New England) e quantificado por espectrometria UV capilar (Genequant, GE Healthscience), sendo esta uma medida da relação entre os comprimentos de onda de 260nm (pico de detecção de nucleotídeos) e 280nm (pico de detecção das proteínas). Apenas amostras com relação 260/280nm entre 1,6 e 2,0 foram utilizadas. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose com formaldeído (1,2%) utilizando o tampão de corrida FA 10X, (MOPS 200mM, acetato de sódio 50mM, EDTA 10 mM, água DEPC, pH 7,0) diluído em água DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato) com 20 ml de formaldeído 37% em um litro. As amostras de RNA (5 μ l) foram diluídas em 5X RNA loading buffer (marcador em gel; 16 μ l de azul de bromofenol saturado; 80 μ l de EDTA 500mM, pH 8,0; 720 μ l de formaldeído 37%; 2ml de glicerol 100%; 3,084ml de formamida; 4ml de 10X FA gel buffer e água DEPC para 10ml). A voltagem da corrida foi de 50 V com amperagem livre por 50 minutos.

3.7 - Síntese de cDNA

Ao RNA total (15 μ g) foram adicionados 1 μ l do primer Trap rev 1 (5'-TGAGTGACTTGCGAAACACGAG-3', TM 62 °C) (2 pmol/ μ l), utilizado nas etapas de

amplificação do gene a partir do DNA genômico e 1µl de dNTP (10mM de cada base). A amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos para eliminar possíveis estruturas secundárias, resfriada em gelo por dois minutos e centrifugada a 13000 g por 30 segundos a 4°C. Foi adicionado 4µl de tampão da enzima transcriptase reversa 5X (250mM de T-acetato, pH 8.4, 375 mM de acetato de potássio, 40mM de acetato de magnésio), 2µl de DTT 0,1M (Ditiotreitol), 1µl de inibidor de ribonuclease (RNaseout, Invitrogen), (40U/µl), 1µl da enzima transcriptase reversa (Thermoscript, Invitrogen, 15U/µl). A amostra foi homogeneizada, centrifugada e incubada a 25°C por 10 minutos, em seguida a 59°C por 50 minutos em banho maria para polimerização; sendo posteriormente incubado a 70°C por 15 minutos para inativação, em banho seco, seguido de 2 minutos no gelo. Para eliminar o RNA hibridizado à nova molécula de cDNA, foi utilizado 1µl da ribonuclease RNase H (2U, Invitrogen) com incubação por 20 minutos a 37°C em banho maria.

3.8 - Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para realização da PCR foi utilizado tampão de Taq (20mM Tris-HCl, 50mM KCl) contendo 0,2 mM de dNTP mix; 1,5 mM de MgCl (Invitrogen), 2 pmol de cada primer, 100ng de DNA e 1,6 unidades da polimerase TAQ Platinum (Invitrogen) num volume total de 50 µl. Para obtenção dos fragmentos para sequenciamento e clonagem foi utilizado uma Taq de alta fidelidade (kit Expand High Fidelity, Roche). Cada reação foi constituída de tampão Hi-Expand (Roche) com MgCl₂ (1,5mM MgCl₂) contendo 0,2 mM de dNTP mix (Fermentas), 2 pmol de cada primer, 100ng de DNA e 2,5 unidades da polimerase Hi-Expand (Roche) num volume total de 50 µl.

3.9 - Preparação de células eletrocompetentes

Após plaqueamento em meio LB agar (meio Luria-Bertani, composto de 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl, agar 1,5 % e pH 7,0) uma colônia das células *E. coli* Top 10 (Invitrogen) foi repicada em 50ml de caldo LB (meio Luria-Bertani, composto de 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl e pH 7,0) e incubada a 37°C por 18 horas. Após incubação, 5 ml foram inoculados em 500 ml de LB, incubados a 37°C sob agitação (250 rpm) até a densidade óptica a 600nm

atingir entre 0,5 e 0,8 (medida realizada no aparelho Genequant, GE Healthscience). Todo o conteúdo foi incubado em gelo por 30 minutos, centrifugado (4000g, 4°C, 15 minutos) e o pellet resultante foi delicadamente ressuspensão em 500 ml de água (Milli-Q esterilizada) a 4°C, centrifugado (4000g, 4°C, 15 minutos). Este passo foi repetido mais uma vez e o sobrenadante descartado. O pellet resultante foi homogeneizado em 20 ml de glicerol 10% esterilizado, centrifugado (4000g, 4°C, 15 minutos) e o pellet foi ressuspensão em 1 ml de glicerol 10% esterilizado, sendo que 7,5 µl destes foram diluídos em 742,5 µl de água Milli-Q e submetidos à avaliação de densidade óptica a 600nm. Se esta fosse maior que 0,5 as células atingiriam a concentração mínima para transformação (OD de 0,5 corresponde a 10⁸ células).

3.10 - Purificação dos plasmídeos (minipreps)

Foi utilizado para extração dos plasmídeos o kit FastPlasmid™ Mini da Eppendorf, que tem a vantagem de exigir apenas uma etapa de lise sem a necessidade de neutralização do tampão. Cada tubo contendo a suspensão de bactérias transformadas foi transferido para um tubo de 2ml e centrifugado a 12000g por um minuto e o pellet resultante recebeu 400µl de tampão de lise a 4°C. As amostras foram homogeneizadas em vortex até a resuspensão do pellet, sendo posteriormente incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Cada amostra foi transferida para uma coluna de separação devidamente acondicionada em um tubo coletor, sendo centrifugadas por um minuto a 12000g, com descarte do eluído. As colunas foram lavadas com 400µl de tampão de lavagem, centrifugadas por um minuto a 12000g. Após descarte do material eluído, procedeu-se uma nova centrifugação (1 minuto a 12000g) para limpar a coluna de traços do tampão de lavagem. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores, e cada amostra recebeu 50 µl do tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5), sendo centrifugadas por 1 minuto a 12000g. As colunas foram descartadas e o material eluído, contendo os plasmídeos de interesse tiveram alíquotas digeridas com enzimas de restrição.

3.11 - Purificação do gel de agarose

Para a extração de DNA a partir do gel de agarose foi utilizado o kit Perfectprep® da Eppendorf. O procedimento consistiu em excisar o fragmento de um gel de agarose medindo sua massa dentro de um peso máximo de 400mg. Foram adicionados 3 volumes de tampão de ligação (solução de guanidiniocianato), incubado por 8 minutos a 50°C e homogeneizado em vortex por 2 a 3 minutos até o gel não ser mais visível na mistura. Foi adicionado um volume de isopropanol, homogeneizado, sendo a amostra pipetada sobre uma coluna spin acondicionada em tubo de 2ml, obedecendo sempre dentro de um limite de 800 µl para cada conjunto. Após centrifugação a 10000 g por 1 minuto, o volume eluído foi descartado e a coluna recolocada sobre o mesmo suporte. Após a adição de 750µl de tampão de lavagem, a amostra foi centrifugada a 10000g por 1 minuto, descartando o filtrado e mantendo a coluna sobre o mesmo tubo, centrifugado por mais 1 minuto a 10000g retirando o tampão residual. A coluna foi colocada sobre um novo tubo de 2ml e adicionado 30µl de tampão de eluição, centrifugado a 10000g por 1 minuto, obtendo-se o material genético.

3.12 - Obtenção da porção 5' restante de NcTrap 2

A partir de dados de ESTs parciais do gene NcTrap 2, foi utilizada a técnica de Reação mediada por RNA ligase- amplificação rápida dos terminos de cDNA (RLM-RACE, kit Gene Racer Invitrogen) tendo sido obtido aproximadamente 99,7% da sequencia de NcTrap 2, por comparação com seus homólogos, faltando a extremidade 5'.

O banco de dados genômicos não anotado para *N. caninum* (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/n_caninum) possibilitou uma análise dos contigs flanqueando NcTRAP 2. Os números dos contigs aqui descritos foram equivalentes ao mês de abril de 2007. Foi encontrada uma região flanqueadora (contig 8340) próxima ao contig que albergava a região conhecida de NcTrap 2 (contig 630). Primers foram desenhados inicialmente para se obter um fragmento comum ao contig 8340 e 630, que após sequenciamento possibilitaria encontrar a região NcTrap 2 restante. A sequencia resultante da amplificação com estes primers,

porém, apenas indicou uma nova região intermediária entre os contigs 8340 e 630, o contig 1212. Após o delineamento de vários primers nestes três contigs, obteve-se o sequenciamento da região intermediária entre os contigs 1212 e 630, sendo possível então determinar a sequencia completa do gene Nc Trap 2.

3.12.1 - Análise da sequencia de NcTRAP 2

As fitas sense e anti sense dos sequenciamentos foram processadas no programa Seqman do pacote DNASTar, onde toda a sequencia foi corrigida manualmente nas regiões de baixa resolução. Neste mesmo programa as sequencias foram comparadas, com o intuito de formar uma única com a região conhecida NcTrap 2. Após identificar e reunir as regiões comuns entre o sequenciamento e NcTrap 2, seu conjunto sofreu splicing com auxílio do programa BCM-Genefinder (<http://www.bioscience.org/urllists/genefind.htm>). Este programa indicou os possíveis sítios doadores e aceptores no splicing, possibilitando a formação da sequencia completa NcTrap 2, dividindo íntrons de éxons.

A sequencia completa de NcTrap 2 foi convertida aminoácidos pelo programa EditSeq do pacote DNASTar, sendo retirado a região posterior ao stop códon. O alinhamento da sequencia codificada foi feito pelo programa Gene Doc com seus respectivos homólogos TRAP de Apicomplexas relacionados (TRAP 1 de *N. caninum*, MIC 2 de *T. gondii*, MIC 1 de *Eimeria tenella*, TRAP de *Babesia bovis*, TRAP de *Theileria parva* e TRAP de *Theileria annulata*), determinando as regiões com similaridade (aminoácidos com cadeia lateral de um mesmo grupo) e identidade (aminoácidos idênticos) entre as sequencias.

A sequencia protéica de NcTrap 2 teve a sua região de peptídeo sinal predita pelo programa Signal 3.0 Server (www.cbs.dtu.dk) que localizou o aminoácido onde provavelmente sofreria clivagem. A predição da região transmembrana foi realizada pelo programa TMHMM (www.cbs.dtu.dk), avaliando as regiões que melhor se adaptariam à região hidrofóbica da membrana plasmática.

A sequencia sem o peptídeo sinal e transmembrana serviu de base para o delineamento de primers com sítios de restrição para clonagem e expressão (tabela 2). Aos primers delineados foram acrescentados na região 5' seu respectivo sítio de restrição e três bases (tabela 1), com o intuito de aumentar a região de contato entre a nuclease e seu substrato (sequencia CCC ou TTT).

Tabela 1 – **Primers com sítios de restrição para obtenção de fragmentos de NcTRAP 2 utilizados na clonagem e expressão.** As bases sublinhadas correspondem aos sítios de restrição

Clone	Primer	Sentido	sequencia 5' - 3'	Tm	posição (AA)
Fragmento 1	for bam HI	forward	CCC <u>GGATCC</u> CAGGCAGCGTCAAATGAA	74,2°C	43 - 60
	rev Hind 2	reverso	CCC <u>AAGCTT</u> AGATCCTGACCGACTTCT	63,7°C	1147 - 1167
Fragmento 2	for Eco RI	forward	TTT <u>GAATTC</u> GGCGAGCTCGTGTCACTA	67,1°C	22 - 41
	rev Hind 3	reverso	CCC <u>AAGCTT</u> GGAAAGGCGAGCACTCTT	69,3°C	1613 - 1633

Os dois fragmentos a serem clonados correspondiam à região entre o peptídeo sinal e a região transmembrana (fig 5), onde se localizam os domínios integrina e trombospondina.

Figura 5 - **Posicionamento esquemático dos fragmentos protéicos em relação à sequência proteica.** Barra verde: fragmento 1, barra azul: fragmento 2, barra preta: NcTRAP 2, barra marrom: peptídeo sinal (PS), barra vermelha: região transmembrana (TM); Met: metionina.

3.13 – Clonagem em plasmídeo de expressão (pET28)

3.13.1 - Preparo pET28

Para a expressão os fragmentos foram clonados em plasmídeos pET28 que insere nas proteínas recombinantes caudas de histidina N e C-terminal, atuando como ligantes por terem grande afinidade por resinas de níquel em pH alto e baixa afinidade em pH baixo, possibilitando purificação.

A manutenção do plasmídeo pET 28 (Novagen) foi realizada em culturas mantidas em meio LB com 50 µg/ml de Kanamicina. As células (*Escherichia coli* Top 10) que albergavam o plasmídeo, estocadas em glicerol 60%, foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 18 horas. Cada colônia isoladamente foi retirada com palito de madeira e reinoculada em 3ml de LB líquido com 50 µg/ml de kanamicina, em tubos plásticos de 50 ml e incubados por 18 horas a 37°C sob

agitação (300rpm). Após crescimento, cada suspensão foi submetida à extração dos plasmídeos.

O protocolo original (pET System manual, 11^a edição, Novagen) determina que a quantidade de plasmídeos a ser utilizada deva ser de 3000ng em 25 µl. Como sempre havia duas reações a serem feitas, a quantidade de plasmídeos variou entre 1000 e 2000 ng, necessitando de um ajuste nas quantidades de enzimas adicionadas (10U de cada enzima de restrição e 0,2 U de fosfatase para 3000ng de plasmídeo). Os demais componentes (água, tampão de ligação, ATP) seguiram a mesma quantidade em todas as reações.

Ao plasmídeo, num volume máximo de 25µl, foram acrescentados 3 µl de tampão da reação de restrição 10X Red (Fermentas) utilizado para Bam HI e Hind III e Eco RI e Hind III, no máximo 10U (1 µl) de cada enzima de restrição (Fermentas) (tabela 3) e, quando necessário, o volume foi completado com água livre de nuclease para 30 µl. O conteúdo de cada reação foi incubado por 3 horas a 37°C. Após incubação, os conteúdos receberam 1 µl (0,2 U) de fosfatase alcalina (Fermentas) para incubação por 30 minutos a 37°C.

Todo o conteúdo foi purificado por eletroforese em gel de agarose, onde as bandas esperadas foram cortadas e purificadas. As amostras purificadas foram extraídas em fenol/clorofórmio, eliminando traços das enzimas de restrição e desfosforilação. Cada amostra recebeu 100 µl de clorofórmio/fenol 1:1, centrifugada (14000 g, 8 minutos, 4°C), sendo desprezada a fase orgânica. A fase aquosa recebeu 1/10 do volume de 3M acetato de sódio, pH 5,0 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto sendo incubada por 12hs a -20°C. Após centrifugação (14000 g, 8 minutos, 4°C) o sobrenadante foi desprezado, foram adicionados 500 µl de etanol 70% a -20°C, centrifugado novamente (14000 g, 10 minutos, 4 °C), o pellet secado à temperatura ambiente e ressuspenso em 30 µl tampão TE (Tris-. HCl 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM).

3.13.2 - Obtenção dos fragmentos de NcTrap 2 para clonagem

Cada reação de PCR (2µl) foi submetida à ligação com vetor pCR4-TOPO, clonado, cultivado, plasmídeos recombinantes extraídos e detectados. Todo o

conteúdo extraído (25 µl) foi digerido com Bam HI e HindIII ou Eco RI e Hind III e purificado por eletroforese em gel de agarose, extraídas em fenol/clorofórmio, precipitada e 5 µl das amostras foram avaliadas após em gel de agarose. Verificada e determinada a quantia de fragmento, este foi então submetido à reação de ligação com seu respectivo plasmídeo tratado.

O plasmídeo tratado (50 a 100 ng) e três vezes o respectivo fragmento oriundo da digestão de pCR4 topo/fragmento, foram submetidos a reação de ligação. Estes receberam 2 µl de 10X tampão de ligação (Fermentas), 2 µl de DTT 100mM (Ditiotreitol), e quantidade de água livre de nuclease (água Milli-Q autoclavada) suficiente para 19 µl. A este conjunto foi adicionado 0,5 U weiss (1 µl) de ligase (Fermentas) previamente diluída em tampão de ligação 1X na proporção 1:1 (1 parte de ligase 1 U weiss/ µl e 1 parte de tampão de ligação 1X). Cada reação foi incubada em banho maria por 18 horas a 16°C e 1,5 µl de cada reação foi transformada na linhagem hospedeira *Escherichia coli* Top 10.

Cada colônia isoladamente foi reinoculada em 3 ml de LB líquido e extraídos por miniprep. Para verificação da presença do inserto, foram realizadas digestões com as enzimas utilizadas para cada conjunto plasmídeo/fragmento (tabela 1). A cada amostra (5 µl), foram adicionados 12,5 µl de água Milli-Q, 2 µl de tampão Orange ou Red 10X; 0,5 µl de cada enzima (tabela 1). As amostras foram incubadas a 37°C em banho maria por uma hora. Dos 20 µl resultantes da digestão, 5 µl foram utilizados para detecção, em eletroforese em gel de agarose a 1%. Os clones contendo os fragmentos nas dimensões esperadas foram transformadas na linhagem hospedeira para expressão BL21.

3.14 – Análise da Expressão e purificação dos recombinantes 1 e 2

As células eletrocompetentes BL21 foram transformadas de maneira idêntica às células TOP 10. Para indução, uma colônia de cada recombinante foi repicada em 50 ml de caldo LB com 50 µl/ml de kanamicina, incubada a 37°C por 18 horas sob agitação (250 rpm). Após crescimento, 5 ml da suspensão foi inoculado em 100 ml (pequena escala) ou 10 ml de suspensão em 500 ml (larga escala) de caldo LB, com

50 µl/ml de kanamicina, incubada a 37°C até a densidade óptica a 600nm atingir entre 0,5 e 0,8 (medida realizada no aparelho Genequant, GE Healthscience).

Para a produção em pequena escala, necessária para verificação da produção do recombinante, a amostra foi dividida em duas frações (50 ml cada), induzida e não induzida. A esta última foram acrescentados 5 mM de IPTG e incubados por 3 horas a 37°C sob agitação (250 rpm). Para a produção em larga escala para obtenção em quantidade maior dos recombinantes e realização dos ensaios posteriores, todo o volume (500ml) recebeu 50 mM de IPTG e incubado nas mesmas condições. As suspensões foram centrifugadas a 4000 g por 15 minutos, descartando o sobrenadante. O pellet foi submetido às extrações total, solúvel e insolúvel.

3.14.1 - Extração total de BL21

Um terço das amostras das células BL21 induzidas foram ressuspensas com o tampão SDS 2% (Tris-Cl 5 mM, glicina 38 mM, SDS 2%), equivalente ao dobro do volume do pellet obtido. As amostras foram distribuídas em alíquotas de 0,75 ml em tubos de 1,5 ml e submetidas à sonicação seguida de centrifugação (10000 g por 10 minutos a 4°C). Os sobrenadantes foram analisados em eletroforese em gel de acrilamida 10%.

3.14.2 - Extração solúvel e insolúvel de BL21

Dois terços dos pellets obtidos foram ressuspensos com o dobro do volume de 20 mM Tris-Cl (pH 7,5). Alíquotas de 0,75 ml foram distribuídas em tubos de 1,5 ml e sonicadas duas vezes, seguida de centrifugação (10000 g por 10 minutos a 4°C). O pellet resultante foi ressuspenso com 0,5 ml de 20 mM Tris-Cl (pH 7,5), sonificado duas vezes e centrifugado (10000 g por 10 minutos a 4°C). Os sobrenadantes das duas fases foram reunidos e avaliados por eletroforese em gel de acrilamida 10%. O pellet resultante foi ressuspenso em dois tipos de tampão para extração insolúvel. Cada tubo recebeu 0,75 ml de SDS 2% (para análise de indução ou nível de expressão) ou 0,75 ml de tampão 8M de uréia (8M uréia, 100mM NaH₂PO₄, 100mM Tris-Cl, pH 8,0) (para posterior purificação em coluna de níquel). As suspensões foram sonicadas duas vezes e centrifugadas (10000 g por 10 minutos a 4°C), o pellet foi ressuspenso em 0,5 ml de tampão de uréia 8M sonicados duas vezes e

centrifugados (10000 g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante das duas fases foi reunido para análise em gel ou purificação.

3.15 – Purificação das proteínas recombinantes em coluna de níquel

Os fragmentos recombinantes foram purificados em cromatografia por afinidade, utilizando uma resina ligada a átomos de níquel positivamente carregados (Ni^{2+}). Estes átomos têm a capacidade de interagir fortemente à cauda de histidina acoplada aos fragmentos recombinantes em pH alcalino, e de modo nulo em pH ácido. Tal característica possibilita a purificação dos recombinantes pela diminuição do pH. De 0,5 a 1,0 ml de resina (Ni Sepharose da GE), foram empacotados em colunas vazias para cromatografia por gravidade (Empty Disposable PD-10 Columns, GE) e lavados com 10 ml de tampão uréia 8M pH 8,0. Após passagem do tampão, a amostra foi adicionada ao sistema e lavada com 10 ml de tampão uréia 8M pH 8,0 e 10 ml de tampão uréia 8M pH 6,3. Por fim a amostra foi eluída em alíquotas de 0,4~0,5 ml com tampão uréia 8M pH 4,5. Cada fração (20 μl) foi adicionada a 200 μl de solução de Bradford (comassie blue 250, 1:5, BioAgency). As frações que apresentaram coloração azul foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida 10% e quantificadas.

3.16 - Quantificação das proteínas recombinantes

Para quantificação das proteínas foi utilizado o método de Bradford, realizado em placas de ELISA, em que 20 μl da amostra a ser quantificada foi adicionada a 200 μl de solução de Bradford, e a absorção medida a 595 nm num leitor de ELISA (SpectraMax Plus, Molecular Devices). A curva padrão foi obtida por leitura em duplicata das soluções formadas (595nm) pela adição de 20 μl de soluções padrão de albumina sérica bovina acetilada (1mg/ml; 0,75mg/ml; 0,5mg/ml; 0,25mg/ml; 0,125mg/ml; 0mg/ml) a 200 μl de solução de Bradford. A média das densidades óticas foi submetida à regressão linear formando uma curva cuja equação serviu para obtenção da concentração das amostras. Da mesma maneira, 20 μl das amostras (diluídas 1:2, 1:4, 1:10, 1:20) foram adicionadas a 200 μl de solução de Bradford e lidas a 595nm. A concentração das amostras foi calculada utilizando o valor médio de

cada absorbância na curva padrão, multiplicando o resultado desta pelo fator de diluição utilizado. Após quantificação, as amostras foram preparadas para realização das imunizações.

3.17 – Imunização

Para cada imunização dos animais foram utilizadas as amostras com extrato protéico total de *N. caninum*, NcTRAP 2 recombinante 1 e 2. O extrato total foi obtido pela sonicação ($\sim 10^8$ taquizoítas) de amostras do parasita purificados. Esta amostra foi utilizada para produção de anticorpos totais contra *N. caninum*, servindo como controle positivo. Os experimentos envolvendo animais estavam de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética para pesquisa em animais do campus de Ribeirão Preto (CEUA-USP-RP, processo 0611474534).

Na primeira imunização, três coelhos da raça Nova Zelândia foram imunizados pela via subcutânea com as amostras: Total (extrato total de *N. caninum* em uréia 8M, 450 µg), recombinante 1 (295,8 µg) e 2 (168,2 µg). As amostras eram constituídas de 50% conteúdo protéico (amostras) e 50% adjuvante completo de Freund (Difco) na forma de emulsão. Foram realizadas mais três imunizações, administradas por via intramuscular (glúteo máximo) com o extrato total (300µg, 230µg, 320µg), recombinante 1 (190µg, 292µg, 165µg) e recombinante 2 (150µg, 114µg, 110µg) em adjuvante incompleto de Freund (Difco) em intervalos de três semanas, quando eram realizadas as colheitas de sangue por punção arterial na orelha dos animais. Todas as amostras foram analisadas por ELISA para verificar a produção de anticorpos.

3.18 – Purificação dos soros para obtenção de IgG

Para a realização dos ensaios de invasão, os soros foram purificados em coluna Protein A-agarose CL-4B (Sigma-Aldrich). Alíquotas de 0,8 ml de resina foram empacotadas em colunas vazias para cromatografia por gravidade (Empty Disposable PD-10 Columns, GE) e lavadas com 16 ml de tampão A (fosfato monobásico de sódio 0,02 M, cloreto de sódio 0,15 M, pH 8,0). A amostra foi adicionada e incubada por uma hora sob agitação (200 rpm) a temperatura ambiente, sendo lavada com 8 ml de tampão A. Após a lavagem a coluna recebeu 2,5 ml de

tampão B (fosfato dibásico de sódio 0,2 M, ácido cítrico 0,1 M, pH 4,0) e alíquotas de 0,2 ml foram coletadas e o pH acertado com NaOH 0,1 M.

3.19 – Purificação dos anticorpos contra as estruturas de *E. coli*

Para aumentar a pureza e consequentemente a especificidade das imunoglobulinas purificadas, os soros anti-recombinantes purificados em coluna agarose-proteína A foram em seguida purificados em colunas de sepharose ativada com brometo de cianogênio (Sephacrose 4B - Cyanogen Bromide Activated, Sigma-Aldrich) com extrato de *E. coli* adsorvidos. Não foi possível adsorver os recombinantes devido à incompatibilidade com a uréia necessária para sua solubilização, portanto o procedimento foi realizado apenas com o extrato total em PBS/2% triton X de *E.coli* BL21, para retirada de anticorpos de origem bacteriana. Uma quantia de 200 mg de resina em pó foi reidratada com 40 ml de HCl 1 mM, através de diversas lavagens por um período total de 30 minutos, sendo lavado com 6 ml de água Mili-Q seguido de 5 ml de tampão de ligação (bicarbonato de sódio 0,1M, cloreto de sódio 0,5M, pH 8,5). Em seguida foi adicionada a cada coluna 4 mg do extrato total de *E. coli* e incubado por 2 horas, temperatura ambiente, sob agitação (200 rpm). A coluna foi lavada com 5 ml de tampão de ligação e seus grupos não reativos foram bloqueados com glicina 0,2M, pH 8,0 por duas horas à temperatura ambiente. A coluna bloqueada foi lavada com 5 ml de tampão de ligação seguido por 5 ml de tampão acetato 0,1M (pH 4,0), sendo este procedimento repetido cinco vezes para a total remoção do bloqueador. O procedimento de retirada dos anticorpos de origem bacteriana consistiu em incubar o soro purificado com a resina por 2 horas a temperatura ambiente, e a fração eluída (anticorpos contra os recombinantes, já que os com afinidade por *E. coli* permaneceram ligados) foi utilizada como soro composto de proteínas contra NcTRAP 2, teoricamente sem influência de anticorpos contra estruturas bacterianas.

3.20 - ELISA

O ELISA foi utilizado para determinação da soro conversão após a imunização com os recombinantes 1 e 2 e o extrato total de *N. caninum*. A metodologia descrita a seguir foi comum para todas as reações de ELISA realizadas neste trabalho. Os

antígenos utilizados para determinar a soroconversão foram o extrato total de *N. caninum* (extrato total), recombinante 1 ou 2, todos diluídos em tampão uréia 8M. Foram utilizados como suporte para ligação dos antígenos placas de 96 poços (Immuno 96 MicroWell™ Plates, Nunc), onde 100 ul da suspensão em tampão de sensibilização (0,06 M Na₂CO₃) de antígenos foi incubada por 18 horas à temperatura ambiente. Os poços foram lavados manualmente três vezes com PBS-T (PBS, 0,5% de Tween 20) e foram bloqueados com 100 ul/poço de PBS-GT (PBS, 0,5% de Tween 20 e 0,1% de gelatina suína, Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas três vezes com PBS-T. Os soros foram sempre analisados em duplicatas, diluídos em PBS-GT (e 100 ul/poço da solução) incubados por uma hora a 37°C, sendo em seguida lavados cinco vezes com PBS-T. Foram utilizados anticorpos de origem caprina conjugados com peroxidase específicos contra IgG de coelho (ZyMed, Invitrogen). Cada poço recebeu 100 ul da diluição de conjugado em PBS-GT e incubado por uma hora a 37°C, sendo lavados três vezes com PBS-T. Para mensuração da ligação antígeno-anticorpo foram utilizados 100 ul de solução de TMB (pronto para uso, ZyMed, Invitrogen), por 15 minutos a temperatura ambiente sob isolamento luminoso. Após 15 minutos a reação foi inibida pela adição de 100 ul de ácido clorídrico 2M seguindo a leitura a 450 nm. Os valores a 450 nm foram mensurados num leitor de ELISA (SpectraMax Plus, Molecular Devices) e os resultados plotados em gráfico, onde a absorbância estava no eixo das ordenadas e a diluição dos soros no eixo das abscissas.

3.21 – Eletroforese acrilamida

Para detecção de proteínas e realização do western blot foi utilizado a eletroforese como forma de separação das moléculas protéicas. Dois tipos de eletroforese foram utilizados, a uni e bidimensional.

3.21.1 - Eletroforese unidimensional

Foram utilizados mini-géis de acrilamida de 10%, enquanto para western blot e eletroforese bidimensional de 12,5% (realizados no aparelho SE260, GE). As amostras, cujos volumes variaram conforme suas massas, foram diluídas proporcionalmente no tampão de amostra 4x (62.5 mM 0.5 M Tris HCl pH 6,8; 10 %

Glicerol; 2% SDS; 0,01% azul de bromofenol). Os marcadores moleculares (5 µl/poço) utilizados foram o BenchMark Protein Ladder para detecção de proteínas e o marcador pré-corado Pre-stained BenchMark Protein Ladder, ambos da Invitrogen. Para realização da eletroforese unidimensional, o gel com as amostras foram submetidas a 120V, amperagem livre até o azul de bromofenol atingir o fim do gel (~ 2 horas).

3.21.2 - Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional consiste na separação das proteínas utilizando duas características: o ponto isoeletrico (PI) e a massa molecular. O primeiro passo, correspondente a primeira dimensão é a focalização isoeletrica, que explora a carga de cada proteína e o segundo passo é a separação destas proteínas explorando sua massa molecular, criando a segunda dimensão.

3.21.2.1 - Primeira dimensão ou focalização isoeletrica

Os extratos totais de *N. caninum* ou Vero (50 µg/amostra) foram ressuspensos em tampão de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, traços de azul de bromofenol) e 5 µl de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, coquetel de inibidores de proteases) totalizando 125 µl de amostra por strip. A esta suspensão foram adicionados DTT 0,2 mM (Invitrogen) e 5 µl de tampão de anfólitos (IPG buffer 3-11NL, GE). O DTT tem como função principal expor os sítios carregados pela quebra de pontes dissulfeto e o tampão de anfólitos é um estabilizador eletro-iônico que possui moléculas de diversos PIs, que reconhecem proteínas com carga semelhante, facilitando seu posicionamento. A uréia, tiouréia e o CHAPS são desnaturantes que não mudam significativamente a carga líquida e expõem os sítios carregados, enquanto o azul de bromofenol é um clássico marcador sensível à diferença de potencial, fundamental para o acompanhamento da eletroforese. Cada suspensão foi utilizada para reidratar uma strip de 7 cm (pH 3 a 11, não linear), sendo acondicionados na Bandeja de Reidratação (GE) e cobertos com óleo mineral para evitar a desidratação do meio. O sistema foi incubado por 18 horas a temperatura ambiente. Após a reidratação, as strips foram acondicionadas em suporte próprio

(Mainfold, GE), cobertas com óleo mineral e submetidas a uma sucessão de condições elétricas (Etapa 1: 100 V por 20 minutos, Etapa 2: 300 V por 30 minutos; Etapa 3: 1000 V por 80 minutos, Etapa 4: 5000 V por 15 minutos), utilizando-se o aparelho Ettan IPGPhor 3 (GE). A voltagem total acumulada devia atingir 5000 V para considerar que a focalização pudesse ser encerrada, quando então as strips ou foram congeladas a -80°C ou submetidas ao equilíbrio antes da eletroforese. O equilíbrio consistiu na incubação da strip em tampão de equilíbrio (Tris 50mM, uréia 6 M, glicerol 30% e SDS 2%) com 10 mg/ml de DTT (Invitrogen) por 15 minutos sob agitação, sendo depois transferido para o mesmo tampão de equilíbrio, mas com 25 mg/ml de iodoacetamida (GE) por mais 15 minutos sob agitação. A incubação com esses compostos serve para completar sua desnaturação, pois o DTT e a iodoacetamida quebram ligações dissulfeto e o SDS carrega as proteínas negativamente, possibilitando apenas a influência do peso molecular na eletroforese.

3.21. 2.2 - Segunda dimensão

A strip sobre o gel (acrilamida, 12,5%) foi coberta com tampão de selamento (Tris 25mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, agarose 0,5% e traços de azul de bromofenol) que após aplicado em estado líquido se solidifica sobre o sistema strip-marcador-gel, possibilitando a distribuição homogênea da corrente elétrica sobre estes componentes, além de possuir azul de bromofenol sensível à diferença de potencial, determinando o andamento da corrida. A eletroforese foi efetuada com amperagem constante de 10 mA por 15 minutos para possibilitar a entrada lenta e homogênea da amostra, completando o processo com 20 mA até o azul de bromofenol atingir o fim do gel (realizado no aparelho SE 260, GE) . Este gel foi utilizado ou para coloração ou para western blot.

3.22 - Coloração dos géis

Foram utilizados três tipos de colorações de géis. A coloração por comassie blue R foi utilizada para detectar os fragmentos recombinantes em géis 1D, a coloração por comassie G-250 foi utilizada para coloração dos géis 2D e a coloração por prata para análise de amostras pouco abundantes.

3.22.1 - Coloração por comassie blue R

Neste processo, mais rápido e menos sensível, os géis foram fixados com o tampão fixador (40% de metanol e 10% de ácido acético glacial) por uma hora. Os géis foram corados em comassie blue R (0,1 % de comassie R em 50 % de metanol e 10% de ácido acético) por uma hora e descorados em tampão fixador (40% de metanol e 10% de ácido acético glacial) até contraste adequado das bandas.

3.22.2 - Coloração por comassie blue G-250

Para localização dos spots reconhecidos nos westerns 2D e posterior identificação, o extrato total de *N. caninum* e Vero (50 µg/gel 2D) foram submetidos a separação por eletroforese bidimensional e corados por comassie G-250, mais sensível que a coloração R, fundamental para identificação de spots menos abundantes. Cada gel após eletroforese foi incubado com solução fixadora (ácido fosfórico 8%, metanol 50%) por 12 horas a temperatura ambiente e lavado com água mili-Q três vezes sob agitação por 5 minutos a cada lavagem. Após lavagem, o gel foi posto para corar com solução de comassie G-250 (sulfato de amônio 180 g/l, metanol 34%, ácido fosfórico 3,5 % e comassie G250 0,1%) por três dias.

3.22.3 - Coloração por prata

O método consiste em incubar cada gel em solução fixadora (50% metanol, 10% ácido acético) por no mínimo uma hora, sendo incubadas em seguida em solução de metanol 5% por 15 minutos. Após essa passagem, o gel foi lavado três vezes (5 minutos cada lavagem) com água mili-Q para retirar o excesso de metanol e ácido acético. O gel lavado foi incubado por 2 minutos em solução de tiosulfato de sódio 750 µM e lavado três vezes com água mili-Q. Em seguida este foi incubado com solução de nitrato de prata 10 mM por 20 minutos e lavado três vezes com água mili-Q. Para revelação o gel foi incubado com solução de carbonato de sódio 280 mM, tiosulfato de sódio 15 µM, formaldeído 0,02 % por 30 segundos sendo a solução descartada. Foi adicionada outra alíquota da solução de revelação por até 5 minutos, sendo o líquido descartado e adicionada mais uma alíquota da solução de

revelação. Após atingir a coloração desejada, a reação foi bloqueada com solução de EDTA 50 mM por 10 minutos, lavada com água mili-Q e escaneada.

3.23 - Captação de imagens

Para obtenção das imagens dos géis, transferências e filmes dos westerns, as imagens foram escaneadas (Image Scanner, GE) utilizando o software LabScan (GE).

3.24 - Western blot

O método de transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF (0,45µm, Milipore) utilizado foi semi-seco (TE PWR 77, GE). A membrana PVDF, devido a seu caráter apolar, foi incubada por 5 min em metanol para possibilitar sua permeabilização pelos tampões utilizados posteriormente. A membrana permeabilizada foi acondicionada sobre três folhas de papel filtro para western (Blot Paper T70, GE) e sobre estas foi acondicionado o gel, sendo posteriormente coberto por três folhas de papel filtro. As folhas de papel filtro foram umedecidas previamente com tampão de transferência (Tris 0,25M, glicina 0,2M, SDS 0,001%, metanol 15%). A transferência ocorreu com 0,81 mA/cm² de membrana por 1 hora. Após transferência, a membrana foi submetida à coloração em DB71 (Direct Blue 71 Aldrich, 0,08% em 40% metanol e 10% ácido acético), por 5 minutos sob agitação. Por fim, foram marcadas as posições no marcador de peso molecular, o início e o fim da corrida, para orientação no western blot. A membrana então foi descolorida (NaHCO₃ 0,15M, etanol 50%), lavada com PBS-T e bloqueada. O bloqueio foi realizado com PBS-GT (gelatina suína 0,8 %, Sigma-Aldrich, em PBS-T) por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (uma vez por 10 minutos e duas vezes por 5 minutos sob agitação). A membrana bloqueada foi submetida a diversas diluições dos soros total, recombinante 1 ou 2 em PBS-GT por 1 hora sob agitação. Após a reação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (uma vez por 10 minutos e duas vezes por 5 minutos sob agitação). A membrana foi submetida ao conjugado caprino anti-coelho (ZyMed, Invitrogen), acoplada com peroxidase. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação com o

conjugado diluído em PBS-GT e lavada três vezes com PBS-T (uma vez por 10 minutos e duas vezes por 5 minutos sob agitação).

A membrana foi submetida à mistura dos reagentes ativadores de peroxidase em temperatura ambiente por 5 minutos (Luminol, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). Para detecção da quimioluminescência a membrana foi imediatamente exposta a um filme fotográfico em câmara escura acondicionada em um cassete para filmes autoradiográficos e a exposição ocorreu sob vários intervalos de tempo. Após esta exposição, o filme foi imerso em solução de revelação (Exsil MX) por um minuto, sob água por um minuto, sob solução de fixação (Exsil MX) por um minuto e por fim lavado em água corrente por 30 segundos. O tempo de exposição variou conforme a intensidade do resultado obtido e os filmes foram escaneados (ImageScanner II, Amersham Biosciences) .

3.25 – Parâmetros western blot 1D e 2D

3.25.1 – Soros anti-recombinantes x imunógenos

Os soros anti-recombinante 1 e 2 foram inicialmente utilizados para detectar seus respectivos fragmentos. O soro anti-recombinante 1 foi diluído 1/640000 e o anti-recombinante 2 1/180000 e utilizados sobre 1 µg dos respectivos fragmentos recombinantes, revelados após incubação com conjugado diluído 1/600000. Nas mesmas condições foram realizados ensaios cruzados entre os soros e fragmentos recombinantes, como também sobre extrato de BL21 (2,5 µg por ensaio), bactéria utilizada na expressão.

3.25.2 – Soros anti-recombinantes x Extrato total

Para verificar a capacidade dos soros contra fragmentos recombinantes em detectar NcTRAP 2 nativa, no western 1D o soro anti-recombinante 1 (1/4000) foi utilizado sobre extrato total de *N. caninum* (10 µg) ou sobre o controle constituído de extrato de Vero (10 µg), fonte de taquizoítas, com conjugado diluído a 1/80000. Para o western 2D o soro anti-recombinante 1 foi diluído 1/8000, conjugado 1/80000, sobre 50 µg de extrato de *N. caninum* ou Vero (controle).

3.25.3 – Soro anti-extrato total x Extrato total

A análise deste procedimento foi realizada com o soro anti-extrato total diluído 1/10000 e conjugado 1/80000 sobre 5 ou 50 µg (western 1D ou 2D, respectivamente) de extrato total ou seu controle, o extrato de células Vero, fonte de taquizoítas.

4.25.4 – Soros anti-recombinantes x ESA

Para localização de NcTRAP 2 no extrato secretado de *N. caninum* (ESA), os soros anti-recombinante 1 diluído 1/4000 e o anti-recombinante 2 1/2000, conjugado 1/80000, foram utilizados sobre 10 ou 25 µg (western blot 1D ou 2D, respectivamente) de ESA de *N. caninum* ou ESA de Vero (controle).

3.26 - Ensaios de invasão

Para avaliar a funcionabilidade dos soros contra o extrato total e recombinante 1 foram realizados ensaios de invasão sobre taquizoítas de *N. caninum*, e foram utilizadas duas metodologias para avaliação quantitativa, uma para contagem manual e outra para Real Time PCR.

3.26.1 - Contagem manual

A cultura de células Vero foi feita em placas de 8 poços (Lab-Tek Chamber Slide, Nunc), onde cada poço possui 0,8 cm² de superfície para cultivo e 0,4 ml de volume para acondicionar o meio de cultura. Cada poço recebeu 130 µl de suspensão de garrafas de 25 cm² com cultura de 7 dias de células Vero tripsinizadas. O volume dos poços foi completado para 0,4 ml com RPMI e incubado por 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Formadas as camadas de células, estas foram lavadas com 0,4 ml de RPMI e preparadas para o ensaio. Taquizoítas recém-purificados (2,0 x 10⁵/poço) em 200 µl de RPMI foram utilizados nos ensaios. Cada suspensão de taquizoítas recebeu 250 ou 100 µg/ml dos soros anti-extrato total e anti-recombinante 1 (purificado de acordo com os itens 3.18 e 3.19). Como controle

dos anticorpos formados foi adicionado 4 μ l (diluição 1/50) do soro pré-imune à suspensão e o controle positivo foi formado da suspensão de taquizoítas sem adição de soro. Para verificar se a presença de IgG inespecífica teria influência sobre a invasão, foi utilizado o soro contra a enzima alfa diidrouato desidrogenase (alfaDHODH), clonada no mesmo vetor que NcTRAP 2, pET28. Esta enzima participa do ciclo de formação “de novo” das pirimidinas, catalisando a conversão de dihidrouato em urato no *Trypanossoma cruzi*.

Os taquizoítas foram incubados com os soros por 1 hora a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e a esta suspensão foi colocada nos poços com culturas de Vero cujos poços tiveram seu meio previamente drenado. A incubação ocorreu por uma hora a 37°C, 5% de CO₂, possibilitando que os taquizoítas pudessem invadir as células Vero. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com RPMI para retirar os taquizoítas que não invadiram e a placa foi submetida à coloração. O controle positivo foi realizado da mesma forma, porém os taquizoítas foram incubados sem soro, apenas meio RPMI. Todas as amostras foram feitas em duplicata. Os suportes das câmaras Lab-Tek foram retirados e as lâminas foram fixadas com metanol por 12 horas e coradas com solução de Giemsa (Laborclin) por 10 minutos. O excesso de corante foi gentilmente retirado com água e a lâmina secada ao ar livre.

Para avaliação da quantidade de taquizoítas que invadiram as células, sob imersão do microscópio óptico (ocular 10 x e objetiva 100x), 200 células e os taquizoítas nelas inseridos foram contados, facilmente diferenciáveis pela coloração e formato (os taquizoítas são pequenos e escuros). Foi feita a relação taquizoíta/célula e a média de cada duplicata utilizada para o cálculo da percentagem de taquizoítas invasivos. Foram realizados três ensaios independentes para o método de contagem manual.

3.26.2 - Contagem por Real Time PCR

Seguindo o princípio do ensaio de invasão, foi realizado um procedimento onde os taquizoítas foram quantificados por Real Time PCR (PCR em tempo real). O processo de preparo da cultura, incubação com os anticorpos e invasão seguiu o mesmo princípio do método de contagem manual, com algumas variantes.

A cultura de células Vero foi feita em placas de 24 poços (Test Plate, TPP). Cada poço possui 1,9 cm² de superfície para cultivo e 3,5 ml de volume para acondicionar o meio de cultura. Cada poço recebeu 300 µl da suspensão de células tripsinizadas e completado para 3,0 ml com RPMI, sendo incubado por 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Formadas as camadas de células, estas foram lavadas com 3,0 ml de RPMI e preparadas para o ensaio.

Taquizoítas recém-purificados ($3,0 \times 10^5$ /poço) em 600 µl de RPMI foram utilizados nos ensaios. Cada suspensão de taquizoítas recebeu 250 ou 100 µg/ml dos soros anti-extrato total e anti-recombinante 1. Como controle dos anticorpos formados foi adicionado 4 µl do soro pré-imune e 4 µl do soro contra DHoDH (diluição 1/50) à suspensão e o controle positivo foi formado da suspensão de taquizoítas sem adição de soro. Os taquizoítas foram incubados com os soros por 1 hora a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. As culturas de Vero nos poços lavados tiveram seu meio drenado e substituído pela suspensão recém incubada com o soro ou controle. As amostras foram feitas em triplicata (três poços). As placas com as suspensões foram incubadas por uma hora a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com RPMI retirando os taquizoítas mortos. Após lavagens, as amostras foram submetidas à extração de DNA.

Para obtenção de DNA de cada poço, foi adicionado 300 µl de tripsina/poço (Tryple Express 0,25%, Invitrogen), incubados por 10 minutos a 37 °C e submetidos a agitação a 300 rpm por 10 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes até desprendimento total das células, verificado com microscópio invertido. Cada suspensão foi contada em câmara de Neubauer sendo utilizado o mesmo número de células para cada poço (5×10^4), evitando assim que as variações no procedimento de obtenção de células pudessem interferir nas etapas posteriores, pois um mesmo número de células garantiria uma proporção igual de taquizoítas. Com esta padronização, as amostras receberam 1 ml de RPMI para inativação da tripsina e foram centrifugadas por 20 minutos, 10000 g a 4 °C, sendo retirado o sobrenadante de cada tubo e seus pellets submetidos à extração de DNA.

O DNA de cada pellet foi extraído com auxílio do kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega), onde o DNA é separado do lisado celular por uma membrana de sílica acondicionada num tubo para centrifuga. Cada pellet foi lavado com PBS e centrifugado por 20 minutos, 10000 g a 4 °C, e recebeu 150 µl de tampão

de lise, sendo homogeneizados por pipetagem. Este tampão possibilitou a lise das células e degradação de proteínas e nucleases, liberando o material genético intacto. O lisado foi transferido para minicolunas com filtro de sílica que possui grande afinidade por DNA em tampão alcoólico, retendo o material e podendo ser lavado. A microcoluna com o lisado foi centrifugada a 10000 g por 3 minutos, sendo a fração líquida descartada, restando o material genético na coluna. A coluna recebeu 650 µl de tampão de lavagem (em 60% de etanol), sendo centrifugada por 10000 g por 1 minuto e o líquido descartado. Este processo de lavagem foi feito quatro vezes. Após a última lavagem, a coluna vazia foi centrifugada a 10000 g por 2 minutos para livrar a coluna de traços de tampão. Para eluição do material genético, 250 µl de água livre de nuclease a 65°C foi adicionada à coluna e incubada por 2 minutos. Esta foi centrifugada a 10000 g por 1 minuto, e o líquido contendo o material genético recebeu 2 µl de solução RNase A sendo incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram então submetidas ao real time PCR.

3.27 - Real time PCR

3.27.1 - Primers e temperatura de anelamento

Para a realização do procedimento foram desenhados um primer forward e um reverso (tabela 2), sendo o primeiro ligado à molécula fluorescente (Lux, Invitrogen), que compreendiam uma região de 180 pares de bases no genoma de *N. caninum*, denominada Nc5, região específica para identificação deste organismo. Esta região é utilizada por diversos grupos de pesquisa para a quantificação de *N. caninum* (NAGULESWARAN et al.; 2003; GHALMI et al.; 2008; COLLANTES-FERNANDEZ et al.; 2002).

Tabela 2 – **Primers utilizados em real time PCR.** A tabela indica o nome, sequencia e temperatura de anelamento ideal de cada primer utilizado.

Primer	Sequencia 5' - 3'	TM °C
Forward RT	CGGTTGTGTGTGAACGGGTGAACG	73°C
Reverso RT	CACAAACCACGTATCCCACCTC	64°C

No penúltimo nucleotídeo no sentido 5' – 3' do primer forward RT (tabela 2, nucleotídeo C) foi ligado o fluoróforo FAM, que emite fluorescência no comprimento

de 520 nm. Para a reação de PCR a temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C, pois respeitava o limite máximo do primer reverso (64°C, tabela 6) e foi 13°C menor em relação ao primer forward (73°C, tabela 6), permitindo que este pudesse se anelar sem interferência significativa da temperatura, processo fundamental para a emissão da fluorescência.

3.27.2 - Reação

A reação de real time PCR foi realizada com o kit FastStart Universal Probe Master (Roche). As reações foram de 25 µl, com 12,5 µl do tampão FastStart 2x, 250 nM de primer forward, 250 nM de primer reverso e 5 µl de solução contendo o DNA purificado. Os parâmetros otimizados foram de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (desnaturação inicial), 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação), 40 ciclos de 15 segundos a 60°C (anelamento) e 40 ciclos de 30 segundos a 68°C (polimerização) no equipamento Mastercycler ep Realplex (Eppendorf). Com estes parâmetros foram feitas diversas reações para obtenção da curva de calibração para quantificação das amostras.

3.27.3 - Curva de calibração

A curva de calibração foi construída a partir do DNA extraído de taquizoítas cujo número fora determinado por contagem manual. O DNA foi extraído com o kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) e 2×10^5 taquizoítas/µl foram diluídos 10 vezes até obtenção de 2 taquizoítas/µl. Cada diluição 1/10, ou seja, 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 20 e 2 taquizoítas/µl foram utilizados como pontos da curva.

3.27.4 - Contagem de parasitas invasivos

O DNA extraído das amostras do ensaio de invasão (2,5 µl) foi submetido à quantificação por real time PCR, com os reagentes na mesma proporção que realizado nas amostras componentes da curva de calibração. Foram feitas duplicatas

de cada poço, e após a corrida o software RealPlex (Eppendorf) calculou a quantia obtida em cada amostra comparada com a curva de calibração.

A avaliação da porcentagem de inibição da invasão, tanto na contagem manual quanto no real time, foi calculada pela diferença entre o valor médio obtido com o controle sem soro e o valor obtido em cada amostra (tratados com os soros anti-extrato total, pré-imune, anti-alfaDHoDH e anti-recombinante 1) dividido pelo valor médio obtido com o controle sem soro (teoricamente sem algum fator interferente) multiplicado por 100. Os dados foram convertidos em gráfico para melhor comparação dos resultados nos diferentes soros, sendo no eixo das abscissas os soros e nas ordenadas a porcentagem de parasitas invasivos, obtida da diferença entre o total de taquizoítas (100%) e a porcentagem de taquizoítas inibidos.

3.28 – Imunofluorescência

O soro contra a forma recombinante 1 de NcTRAP-2 foi utilizado pra localizar NcTRAP 2 nos taquizoítas utilizando a imunofluorescência emitida por um conjugado que reconhece a porção fixa (Fc) das imunoglobulinas G. O anticorpo secundário possui de 4 a 6 moléculas de isotiocianato de fluoresceína (FITC), que possui a propriedade de absorver radiação a 488 nm e emitir a 530 nm, o que lhe confere a cor verde, captável em microscopia fluorescente. O processo utilizado segue os parâmetros descritos por NAGULESWARAN et al., 2001, consistindo basicamente na utilização de culturas infectadas ou com os parasitas livres fixados. As culturas de células Vero foram cultivadas em placas de 8 poços (Lab-Tek Chamber Slide, Nunc).

Cada poço recebeu 130 µl de suspensão de garrafas de 25 cm² com cultura de 7 dias de células Vero tripsinizadas. O volume dos poços foi completado para 0,4 ml com RPMI e incubado por 4 dias (em dois dias houve troca de meio) a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Formadas as camadas de células, estas receberam 100 ul de inóculo com taquizoítas oriundos de culturas entre 5 e 7 dias de infecção e cada poço foi completado para 500 ul com meio RPMI, incubado por 4 dias a 37°C; 5% de CO₂. As culturas foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 3% por uma hora a temperatura ambiente, lavadas com PBS e permeabilizadas com PBS/0,2% Triton X por 30 minutos. Após lavagem com PBS-T, estas foram bloqueadas com PBS/3% BSA (albumina bovina), 20 mM de glicina por 16 horas a 4 °C. Os poços foram incubados com o soro contra o recombinante 1 em PBS/0,3% BSA na diluição

1/100, por uma hora à temperatura ambiente e lavados três vezes com PBS. Posteriormente foi incubado com o conjugado FITC (ZyMed) diluído 1/100 em PBS/0,3% BSA por 30 minutos, e tratados para marcação do núcleo. Foi utilizado para esta marcação iodeto de propídeo (0,5 μ M, Santa Cruz Biotechnology), um composto com capacidade de ligação ao material genético de células permeabilizadas, absorvendo a 488 nm e emitindo a 570 nm, de cor vermelha. Este foi adicionado concomitantemente ao anticorpo secundário e as lâminas lavadas receberam uma camada de glicerol 60%, selados com esmalte para evitar a desidratação.

Os procedimentos de imunofluorescência foram captados a temperatura ambiente em microscópio confocal Leica TCS SP4 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) no laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, usando a objetiva de 100 x com imersão em óleo e utilizando o canal de laser de 488 nm para FITC e de 530 nm para iodeto de propídeo. Oito imagens de 0,6 μ m de cada canal foram captadas, agrupadas e processadas pelo programa Image J 1.41 (National Institutes of Health, USA).

3.29 – Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão, utilizando a análise da variância (ANOVA) para comparação entre diferentes grupos experimentais. Os valores entre as diferentes amostras foram comparados utilizando o teste de multicomparação de Bonferroni, considerando significância estatística o nível de erro estatístico menor que 5%. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Graph Pad PRISM 4.0 (Graph Pad, USA).

4 – Resultados

4.1 - Obtenção da sequência completa de NcTrap 2

Foram utilizadas diferentes abordagens experimentais para desvendar a sequência completa do gene NcTrap 2. Inicialmente, com base nas sequências parciais de ESTs disponíveis na época, procurou-se obter as extremidades 5' e 3' por RLM-RACE (Amplificação Rápida dos Termos de cDNA via Reação Mediada por RNA ligase). Foi possível obter todo final 3' e parte do 5', representando aproximadamente 99,7% da sequência por comparação com outras proteínas TRAP. Utilizou-se então o banco de dados genômicos, recém-lançado na época, contendo sequências não anotadas de *Neospora caninum*, (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/n_caninum). A partir daí, uma longa série de PCRs foram realizadas em cDNA e DNA genômico para desvendar os limites entre íntrons e éxons. Após vários sequenciamentos, foi possível concluir que o gene NcTrap 2 era composto de quatro éxons e três íntrons (fig 6).

Figura 6 – **Representação esquemática de íntrons e éxons do gene NcTrap 2.** Os retângulos cinzas representam os éxons e as barras pretas os íntrons. A sequência proteica começa pelo ATG inicial do éxon 1 e termina na região de formação da cauda poli A no final do éxon 4.

O éxon 1, com 116 pb albergava os 21 pb que faltavam para completar a sequência proteica de NcTRAP 2 após o RLM-RACE. Os íntrons possuem um total de 1264 pb distribuídos em fragmentos de 667, 393 e 194 pb representando 28,5% da sequência genômica. Os éxons possuem um total de 3156 pb distribuídos em quatro éxons representando 71,5% da sequência, compostos de fragmentos de 116, 1611, 404 e 1025 pb (fig 6).

Foi realizado o alinhamento da sequência NcTRAP 2 com seus homólogos em Apicomplexas relacionados (TRAP 1 de *Neospora caninum*, MIC 2 de *Toxoplasma gondii*, MIC 1 de *Eimeria tenella*, TRAP de *Babesia bovis*, TRAP de *Theileria parva* e TRAP de *Theileria annulata*) (fig 7). As comparações entre as sequências mostraram que a proteína NcTRAP 2 possui maior

identidade/similaridade com NcTRAP 1 de *Neospora caninum* (39%/53%) com TgMIC 2 de *Toxoplasma gondii* (38%/52%) e com EtMIC 1 de *Eimeria tenella* (39%/52%) (tabela 3). Provavelmente estes homólogos se dividiram de um ancestral comum num período mais tardio que seus homólogos de *Babesia bovis* (TRAP), da *Theileria parvum* (TRAP) e da *Theileria annulata* (TRAP), que apresentam similaridade e identidade com *Neospora caninum* TRAP 2 abaixo de 30% (tabela 3).

Sítio de clivagem peptídeo sinal

Protein	Sequence	Position
NcTRAP1 gi	MGVQREAFGLMFAGLCLFPREVAGGRWGLMDIFKREPKATATASDGEDTEGSAITDLMKSGGTIGAAEGTSLDLCFL	81
NcTRAP2 cl	MASHSSGTSGAFVRRSVFAVLLSLTVSGVFA-----ASGNVSGTSPGELVSLVQAASNEAGD--QLQTKVMIDL	72
TgMIC2 gi	MRLQREAVFGLMFACGMMWPSEVAGGWSIVDALRRK-YDTSRGDANGVDTSGVEDVIQSDSAIGAAEGTSLDLCFL	80
EtMIC1 gi	-----MAPLPRRLAPCRALSLVGLLAASFA-----FSSL-----QPGATTSSG-----QDQVQTSLLDVMLV	54
BbTRAP gi	-----MIGYIKILASVPLLSLAFATTGIHAFADKGIGSP-----RGKQKKQLDFSI	49
TpTRAP gi	-----	-
TaTRAP gi	-----	-

Protein	Sequence	Position
NcTRAP1 gi	VDSSSGISGAHYE-EVKQFTHAPLSKLPFGNDEVNTSLVFTSTVHPHSLRANNASDKETAMQDVLTPYPHGCTNTAAG	161
NcTRAP2 cl	VDDASISGSRNFEQVRKFVDFIDLVPSISSEVHLSVVTFAADSQQDVTFKQPPATNKQLAKEAFKLYRREGGSTATDKG	153
TgMIC2 gi	VDSSSGISGQNER-LVKQFTHFTFIMVLPFGPEVNNNAVVTYSTDVHLQWDLQSPNAVVKQLAAHAVLEMPYKKGSTNTSDG	160
EtMIC1 gi	VDESISGTSNER-KVRQFTHDFVNSMPTSPEDVRVGLITFATRISKVRNWLSDPKATNPSLAISARSLSYSTGVVYTHYG	134
BbTRAP gi	VDESASISDDQTEGQMIPFIRNLHTVLDNNTDIRLSLTYSPTRIQIFTFDAAASSTRALTCLDWMNGTKARYGMTYT	130
TpTRAP gi	-----MTFFNFSLNTVQKLRCTIGKLCRGLVTKSEATCTRKVYGENDKVTLGPPTTYTIFSE	58
TaTRAP gi	-----MTFFNFSLNTVQKLRCTAGRLCRGLVTKSEATCTRKVYGENDKVTLGPPTTYTIFSE	58

Protein	Sequence	Position
NcTRAP1 gi	DQTCNQMLFDYPREBQTVPRVLVAMTDGESDSDFHTVNEAKVIRERGLITVLSVGMVYNNHNECRSMCGCR---NDSSPC	239
NcTRAP2 cl	DIRARRYLTRPVYGTTRANVPKVLVMTDGESDRHYDTIQAADQARAEISVFEVVGVG-MANPVECRGVCGGG---RYGFC	229
TgMIC2 gi	DKACKQILGTGSRPGRHVPKLVLCMTDGESDSDFHTVRAAKEIRELGGIVTVLAVGHYVKHSECRSMCGSGTDDDDSPC	241
EtMIC1 gi	DQDAKLLLYDTNAGARNNVKPLVLMTDGASNLPSCTRSSAAALRDAIAIVVVLGVGSGVNSSECRSIAGCS---TSN---C	210
BbTRAP gi	GRALNVYRKAILPYGRKNVPHALLITDGVSDGSYTAQVAMLRDEEVNVMVIGVG-DVNVAECRGIVGVDG---IMDC	206
TpTRAP gi	VCLTLKLRDELTDGNGLLLTGMTRLKDGNSFNKNSRISSVLPMETLDRLEAITRSEHPVTFEALDGS---VVVTNN	136
TaTRAP gi	VCLTLKLRDELTDGNGLLLTGMTRLKDGNSFNKNSRISSVLPMETLDRLEAITRSEHPVTFEALDGS---VVVTNN	136

Protein	Sequence	Position
NcTRAP1 gi	ELYLQTEWSQLLPSISFILKEVCKTLPKDAVCS-ENSEWSPCSATCG-VGTQGRTRQQLSPAPGPTPTCPDIPPMGRSC	318
NcTRAP2 cl	EQEIMSNNELVQTVLSIMGEVCKLPEKDAECS-ENSEWSGCTASCG-AGTRIKTRKOLSPPLAGDPECDNCEPMGKTCE	308
TgMIC2 gi	ELYLRADTQGLATAIKPKLKEVCKTLPEDAICS-DNSAMSPCSVSQCG-DGSQIRTRTEVSAPQPGTPTCPDPAPAGRTOV	320
EtMIC1 gi	ERYLQSNNSNVTQQVNGHIAAKDLDAVCS-ENSEWGPOVGECKEKGQVQSTRVETSPQKPGSPPTCPTCEAPRGSCA	290
BbTRAP gi	EMKQTNMKDIMGLFNSLMKEVCDILPEQDAVEPVIAEWSNGECCVPEKTRALLDR---MIEKVNNGSNGQEGKSC	284
TpTRAP gi	SDTFSIKLYPSLPGLNLTPGMLPTKNKNSHINF-TGNHNEHALKHALHDLSTSNYDRGLYEDGIKKSSSYCHREIDLAIL	216
TaTRAP gi	SDTFSIKLYPSLPGLNLTPGMLPTKNKNSHINF-TGNHNEHALVKHALHDLSSSNYDKGLYEDGIKKSSSYCHREIDLAIL	216

Protein	Sequence	Position
NcTRAP1 gi	BQG-GVKENRSCDAGTCSVDAGCGTWGLWSESSSSCGAATRQVRREGYNQEPQEDGLLCEQQQPPVEKSTEQAQFAPGV	398
NcTRAP2 cl	DLG-GLVRVEDCNQGECPQDAGCGTWGEWTSWSATCGHASRSRRREGYNTPPPRCAGLLCEQKRPPVPREQSEETDFAPCP	388
TgMIC2 gi	BQG-GLIEIRECSAGVCAVDAGCGVWGEWSAMSSASCGNATRKRERTRYNDPEPQAGRRCEQNDPPVLQEQTEATLAPCI	400
EtMIC1 gi	BQPPGLTRTPCTMPVCKTDAHCHEFGAWSESTTCGTATRKRREGYNSEPAAGGLSCMEQNPPKHEFEVETVQKSECP	371
BbTRAP gi	DQKMNFLPQSETCTIECNHEPVP-----SSPEPVSDMDHETPT-----VTPEGDMDKSHSHSSIP	341
TpTRAP gi	VDESSSIMKEWEKLIPLKSLVKSISISPNVHLSVVTFTSTSTRWLSFLNPS-----KDENLALRVIDELKNSKEVF	291
TaTRAP gi	VDESSSIYEWNKLIPLKSLVRSINISPNVHLSVMVFTSTSTRWLSFLDEAS-----KDEQLALAVLDLKNKKEVF	291

Protein	Sequence	Position
NcTRAP1 gi	VIPPTPEWSAMSECTATCGSGTRHRSRNGLEPGTRSDAQNTQEKPESNPWPGFDLHEQESCNNSPCBINATCGDEGEWSE	479
NcTRAP2 cl	RNQ-VGEWTDMSVCSATCGSGTRHRSRSGSPQVGELYGGQTLQ-----QGIEVRQEEACSNPCPVDVACGEFGEWSE	462
TgMIC2 gi	TIPPTPEWAASDCTVTCGGNRHRVRNALPGLGSQNGESDESLSVKLWPGTDLRQEEACNTSPCBINATCGDEEENST	481
EtMIC1 gi	VQQ-QEGPSEWTECSATCGSGTKHREERGLPQEGELYGGQTLQ-----QGIARETASCENPCBITDATCGEWTETESA	445
BbTRAP gi	STPDMSSSHSDMSSSPTDMS-----SSPTDMSSSPTDMS-----HSDMPSTPTGMSSSHSDMPSSSHSDMPSSHS	407
TpTRAP gi	GFTFTGQALNFIEAVYQFC-----ARQNAKFAITLITDGSSTQ-----PNVTSQASAMLRAGVTILLVVGVMARDYE	360
TaTRAP gi	GFTFTGQALNFIEAVYMF-----ARRNSKGIITITDGSSTQ-----TNVTSQASALLRDAGVTILLVVGVGKAKESE	360

Figura 7 – Alinhamento das proteínas TRAP em diversos Apicomplexas e localização, em **NcTRAP 2** dos fragmentos clonados, da região transmembrana e peptídeo sinal. As sequências pela ordem representam TRAP 1 e TRAP 2 de *Neospora caninum*, MIC 2 de *Toxoplasma gondii*, MIC 1 de *Eimeria tenella*, TRAP de *Babesia bovis*, TRAP de *Theileria parva* e TRAP de *Theileria annulata*. Os aminoácidos destacados em negro representam identidade total, enquanto os destacados em cinza representam similaridade. As barras destacam as regiões de peptídeo sinal e transmembrana e fragmentos escolhidos para clonagem. Barra preta: peptídeo sinal, barra azul: fragmento 1, barra vermelha: fragmento 2 e barra verde: região transmembrana. A seta indica a provável região de clivagem do peptídeo sinal.

Tabela 3 - **Comparação entre as sequências de TRAP nos Apicomplexas.** A tabela indica percentagem de identidade (frequência de aminoácidos idênticos numa mesma posição) e similaridade (frequência de aminoácidos com características similares numa mesma posição) das sequências TRAP 2 e TRAP 1 de *Neospora caninum*, MIC 2 de *Toxoplasma gondii*, MIC 1 de *Eimeria tenella*, TRAP de *Babesia bovis*, TRAP de *Theileria parvum* e TRAP de *Theileria annulata*.

		NcTRAP 1	TgMIC 2	EtMIC 1	BbTRAP	TpTRAP	TaTRAP
NcTRAP 2	Identidade %	39	38	39	17	8	9
	Similaridade %	53	52	52	27	17	19
NcTRAP 1	Identidade %		58	38	16	7	8
	Similaridade %		72	54	30	19	21
TgMIC 2	Identidade %			36	15	7	10
	Similaridade %			52	29	17	19
EtMIC 1	Identidade %				17	9	10
	Similaridade %				32	18	20
BbTRAP	Identidade %					7	9
	Similaridade %					21	23
TpTRAP	Identidade %						75
	Similaridade %						83

4.2 – Clonagem dos fragmentos de NcTRAP 2 para expressão heteróloga

Foram excluídos dos fragmentos de NcTRAP 2 a serem clonados o peptídeo sinal e a região transmembrana. A região predita de peptídeo sinal segue da metionina inicial até o trigésimo segundo aminoácido, sofrendo clivagem entre dois resíduos alanina (FAAS) (barra preta, fig 24), enquanto a região transmembrana predita segue do aminoácido 687 até o 756, (barra verde, fig 7). O fragmento 2 (barra vermelha, fig 7) englobou a região mais abrangente com 537 aminoácidos, enquanto o fragmento 1 (barra azul, fig 7) era composto de uma região menor (374 aa), porém comum ao dois. Ambos abrangeram o cerne entre o peptídeo sinal e a região transmembrana (fig 7), local que alberga os domínios trombospondina e integrina, responsáveis pela interação parasita hospedeiro e posterior invasão.

O primeiro passo para uma clonagem eficiente foi a obtenção de RNA, com as subunidades ribossômicas 28 e 18S sem sinais de degeneração (fig 8). Após a reação de transcrição reversa, o cDNA foi utilizado para a obtenção dos fragmentos.

RNA Total

Figura 8 – **RNA total de *N. caninum***. Gel de agarose com formamida (0,8 %) contendo 2 µg de RNA recém extraído de *N. caninum*. Setas destacando as subunidades ribossômicas 28S e 18S.

Os fragmentos obtidos em PCR foram pré-clonados em um plasmídeo tipo TA, com ligação via topoisomerase I (pCR 4-TOPO), previamente à clonagem em um plasmídeo de expressão. Após digestão dos plasmídeos foram detectados os insertos, sendo o fragmento 1 de ~1100pb (o esperado seria 1124pb) (fig 9, poço 2) e o fragmento 2 de ~1650pb (o esperado seria 1611pb) (fig 9, poço 3). Após a clonagem em pET28 estes foram digeridos para confirmação da presença de seus respectivos insertos (fig 9, fragmento 1, poço 4 e fragmento 2, poço 5).

Figura 9 - **Clonagem dos fragmentos de NcTRAP 2.** Agarose 0,8% contendo as amostras em 1= Padrão molecular; 2 = Fragmento 1 amplificado por PCR; 3 = Fragmento 2 amplificado por PCR; 4 = Plasmídeo pET 28 com fragmento 1 digerido com enzimas Bam HI e Hind III; 5= Plasmídeo pET 28 com fragmento 2 digerido com enzimas Eco RI e Hind III. Peso molecular indicando fragmentos de 10000, 6000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 500 e 300 pb. Setas indicam os recombinantes 1 e 2.

Os plasmídeos pET28 contendo os fragmentos 1 (fig 9, poço 4) e 2 (fig 9, poço 5) clonados em BL21 foram sequenciados. As fitas sense e antisense dos recombinantes 1 e 2 foram 100% complementares à sequência NcTrap 2, não sendo encontrada a mesma complementaridade com a sequência de NcTrap 1 (esta possui consequentemente a complementaridade suficiente para ser considerada homóloga), confirmando que houve a clonagem de fragmentos correspondentes a NcTrap 2. Portanto, foi descartada a possibilidade de clonagem errônea de fragmentos de NcTrap 1, que possui diversas regiões idênticas e semelhantes a NcTrap 2 (fig 7).

4.3 – Expressão heteróloga dos fragmentos 1 e 2 de NcTRAP 2 e purificação

Os plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos 1 ou 2 em BL21 induzidos com IPTG produziram, respectivamente, proteínas de 52 kDa (fig 10, poço 3) e 78 kDa (fig 10, poço 5). Foi detectada auto-indução com mais intensidade no recombinante 1 (fig 10, poço 2) e com menos intensidade no recombinante 2 (fig 10, poço 4). Ambos os recombinantes não foram detectados no extrato solúvel (fig 10, poços 6 a 9) permanecendo predominantes no extrato protéico insolúvel (fig 10, poços 2 a 5). Desta forma foram realizados diversos métodos para solubilização dos corpos de inclusão, no qual a sonicação seguida de tampão uréia 8M foi o método que exibiu, comparativamente, maior quantidade de proteínas recuperadas.

Figura 10 – **Expressão dos fragmentos recombinantes de NcTRAP 2.** Gel SDS-PAGE (12,5%) corado por prata com extratos solúveis e insolúveis de BL21 com plasmídeos pET28 contendo fragmentos 1 ou 2 de NcTRAP 2 induzidas ou não com IPTG. Amostras: 1= Padrão peso molecular; poços 2 a 5 contém amostras insolúveis e poços de 6 a 9 amostras solúveis. Recombinante 1 nos poços 2, 3, 6 e 7 e recombinante 2 nos poços 4, 5, 8 e 9. Extratos contendo fração induzida (+) e não induzida (-) e padrão de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 116, 66, 45, 35 e 25.

Após purificação em coluna de níquel, a análise da pureza dos recombinantes foi importante para determinar o quanto de proteínas provenientes de *E. coli* poderiam influenciar na produção de anticorpos não relacionados a NcTRAP 2, fundamental na interpretação de ensaios como western blot. Foi observado que o recombinante 1 se encontrava predominante sobre contaminantes bacterianos (fig 11, poço 2). A proteína recombinante 2 apresentou uma purificação

menos eficiente que o recombinante 1, porém, também havia uma quantia maior do recombinante 2 em relação aos contaminantes (fig 11, poço 3).

Figura 11 – **Purificação das proteínas recombinantes NcTRAP 2.** Gel SDS-PAGE (12,5%) corado por prata contendo os fragmentos 1 (poço 2) e 2 (poço 3) purificados em coluna de níquel. Amostras nos poços 1 = Padrão de peso molecular (116, 66, 45 e 35 kDa); 2 = Fragmento recombinante 1 (800 ng); 3 = Fragmento recombinante 2 (800 ng).

4.4 - ELISA

4.4.1 - Controles ELISA

Para a padronização do ensaio imuno-enzimático, foram realizados diversos experimentos controles, visando detectar possíveis reações inespecíficas. Para isso, os ELISAS foram realizados com a ausência de um dos componentes: antígeno, anticorpo, conjugado ou antígeno e anticorpo.

a) Sem antígeno

A ausência de antígeno determinou o quanto houve de ligação inespecífica entre os anticorpos do soro e conjugado com a placa e/ou com a gelatina utilizada no bloqueio. O controle sem antígeno apresentou valores baixos em relação à amostra (fig 12) demonstrando que a absorbância medida neste controle foi em grande parte

derivada da afinidade do conjugado e de anticorpos à placa e/ou gelatina. A diluição de conjugado 1/5000 apresentou valores maiores, porém essa concentração não foi utilizada nos procedimentos após a padronização, tendo sido adotada a diluição 1/80000. Também não há uma resposta proporcional quando os parâmetros foram variados, reflexo da inespecificidade e auto reatividade dos componentes utilizados.

Figura 12 - **Controle sem antígeno da reação Imuno-enzimática.** Poços na ausência de antígeno foram submetidos a diferentes concentrações de soro anti- extrato total de *N. caninum* (1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/4000) e conjugado (1/5000, 1/7500 e 1/10000), com absorbância medida a 450nm.

b) Sem anticorpo

A ausência de anticorpo determinou o quanto houve de afinidade entre o antígeno e o conjugado, levando a emissão sem intermédio do soro. Novamente houve grande reatividade com diluição do conjugado 1/5000 (fig 13), o que não acarretou problemas já que esta diluição não foi utilizada para os ensaios posteriores.

Figura 13 - **Controle sem soro da reação Imuno-enzimática.** Poços com 300, 500 e 700 ng/poço de extrato total de *N. caninum* foram submetidos a diferentes concentrações de conjugado (1/5000, 1/7500 e 1/10000), com absorbância medida a 450nm.

c) Sem conjugado

A ausência do conjugado visou observar a capacidade dos demais componentes, principalmente os antígenos e anticorpos, para oxidar o TMB sem a presença da peroxidase do conjugado e interferir na absorbância final. Este experimento (fig 14) revelou uma baixa capacidade dos outros componentes para ativarem a reação imunoenzimática ou possuírem auto-emissão a 450 nm.

Figura 14 - **Controle sem conjugado da reação Imuno-enzimática.** Poços com 500 ng/poço de extrato total de *N. caninum* foram submetidos a diferentes concentrações de soro anti-extrato total (1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/4000) e absorbância medida a 450nm.

d) Sem antígeno e sem anticorpo

Neste caso, foi avaliada a capacidade de ligação inespecífica do conjugado, que exibiu baixa afinidade pelo material que compõe a placa e/ou bloqueio (fig 15).

Figura 15 - Controle sem antígeno e sem anticorpo da reação Imuno-enzimática. Poços bloqueados com gelatina foram submetidos a diferentes concentrações do conjugado (1/5000, 1/7500 e 1/10000) com absorbância medida a 450nm.

4.4.2 - Concentrações Antígeno, Anticorpo e conjugado

Foram testadas diversas concentrações de antígenos do extrato total de *N. caninum* e das proteínas recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2, variando de 300 a 750 ng/poço para extrato total e 2,5 a 10 ng/poço para as recombinantes. Foram escolhidas as concentrações com maior diferença entre o soro imune e pré-imune, com 500 ng/poço para extrato total e 5 ng/poço para as recombinantes 1 e 2.

As diluições dos soros foram testadas amplamente (de 1/100 a 1/16000) e foi decidido que todas em todos os ELISAs os soros seriam utilizados em seis diluições (de 1/500 até 1/16000). O conjugado foi utilizado nos ensaios de padronização em diluições que variaram de 1/40000 a 1/160000, tendo sido escolhida a diluição 1/80000 para os ensaios posteriores.

4.4.3 – Avaliação da evolução da resposta sorológica contra o extrato total e os recombinantes 1 e 2

O animal imunizado com extrato total apresentou uma resposta intensa com soro conversão logo após a primeira imunização (soro 1, $p < 0,05$, fig 16, gráfico A), enquanto a soro conversão dos animais imunizados com os recombinantes 1 e 2 ocorreu efetivamente após a segunda imunização (soros 2 e 3, $p < 0,05$, fig 16, gráficos B e C), apesar que o soro anti-recombinante 1 já apresentava uma menor resposta (não significativa) após a primeira imunização. Todos os soros 2 e 3 apresentaram alta absorbância em relação ao soro pré-imune (fig 16, gráficos A, B e C). Apesar da resposta contra o recombinante 2 (fig 16) ter sido semelhante ao recombinante 1, sua emissão foi menor, revelando uma maior produção de anticorpos contra o recombinante 1.

Figura 16 – Análise da soro conversão dos animais imunizados com extrato total de *N. caninum* ou com as formas recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2 contra seus respectivos antígenos. 500 ng/poço de extrato total de *N. caninum* e 5 ng/poço do recombinante 1 e 2 de NcTRAP 2 foram submetidos a diferentes concentrações de seus respectivos soros (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 e 1/16000) e ao conjugado 1/80000, sendo a absorbância medida a 450nm. Soro pré-imune: Soro obtido antes da primeira imunização; soros 1, 2 e 3: obtidos após a primeira, segunda e terceira imunização. Gráfico A: Extrato total x soro anti-extrato total; gráfico B: Recombinante 1 x soro anti-recombinante 1; gráfico C: Recombinante 2 x soro anti-recombinante 2. Barras brancas: Soro pré-imune; barras pretas: Soro 1; barras pontilhadas: Soro 2; barras quadriculadas: Soro 3. * indica $p < 0,05$ em relação ao soro pré-imune.

4.4.4 – Reações cruzadas

Foram feitos então ensaios cruzados entre os soros e seus antígenos, para analisar se os soros contra os recombinantes reconheceriam estruturas no extrato total, ou se haveria anticorpos no animal imunizado com extrato total que pudessem reconhecer os recombinantes, além do reconhecimento mútuo entre antígenos e soros recombinantes. Para confirmar a especificidade das reações foram realizados, sob os mesmos parâmetros, ELISAs entre antígenos e anticorpos cruzados, como extrato total x soro anti-recombinante 1 ou 2; recombinante 1 x soro anti-recombinante 2; recombinante 2 x soro anti-recombinante 1; recombinante 1 ou 2 x soro anti-extrato total.

4.4.4.1 – Detecção de NcTRAP 2 nativa pelos soros anti-recombinantes

O extrato total foi submetido aos soros anti-recombinante 1 e 2 para detecção de anticorpos que reconhecessem a proteína nativa NcTRAP 2. Tal resultado poderia dar sustentabilidade à hipótese de formação de anticorpos que reconheceriam tanto as formas recombinantes quanto a nativa. Foi verificada uma diferença entre o soro pré-imune e o soro 3 ($p < 0,05$ até a diluição 1/8000 para o soro anti-recombinante 1 e 1/16000 para soro anti-recombinante 2). Considerando que NcTRAP 2 deva ser uma proteína pouco abundante no extrato total, já era esperada uma resposta baixa, porém indicativa de reconhecimento. A absorbância do soro anti-recombinante 1 chegou a ser três vezes maior que seu soro pré-imune (fig 17, A).

Figura 17 –Detecção de NcTRAP 2 nativa presente no extrato total de *N. caninum* pelos soros de animais imunizados com as formas recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2. 500 ng/poço de extrato total de *N. caninum* foi submetido a diferentes concentrações de soros anti-recombinante 1 e 2 (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 e 1/16000) e ao conjugado 1/80000 sendo a absorbância medida a 450 nm. Soro pré-imune obtido antes da primeira imunização; Soro 3 obtido após a terceira imunização. Gráfico A: Detecção de NcTRAP 2 pelo soro anti-recombinante 1; gráfico B: Detecção de NcTRAP 2 pelo soro anti-recombinante 2. Barras brancas: Soro pré-imune; barras pretas: Soro 3. * indica $p < 0,05$ em relação ao soro pré-imune.

4.4.4.2 – Reconhecimento de NcTRAP 2 recombinantes 1 e 2 por anticorpos do soro anti-extrato total de *N. caninum*

Foram realizados ELISAs para verificar se o animal imunizado com extrato total de *N. caninum* reconheceria as formas recombinantes de NcTRAP 2. Apesar da baixa absorvência, ambas as formas recombinantes foram reconhecidas (fig 18, A e B, $p < 0,05$ até diluição do soro 1/2000). Isto se deve provavelmente à pequena resposta produzida contra NcTRAP 2 em sua forma nativa, pois apesar da forma recombinante ser altamente imunogênica, a quantidade produzida pelo taquizoíta de NcTRAP 2 deve ser muito reduzida para formar uma resposta imunológica intensa.

Figura 18 - Detecção de NcTRAP 2 recombinantes 1 e 2 pelo soro de animais imunizados com extrato total de *N. caninum*. 5 ng/poço de recombinante 1 e 2 foram submetidos a diferentes concentrações de soro anti-extrato total (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 e 1/16000) e ao conjugado 1/80000 sendo a absorvência medida a 450nm. Soro pré-imune: Soro obtido antes da primeira imunização; soro 3: Soro obtido após a terceira imunização. Gráfico A: Soro anti-extrato total sobre recombinante 1; gráfico B: Soro anti-extrato total sobre recombinante 2. Barras brancas: Soro pré-imune; barras pretas: Soro 3. * indica $p < 0,05$ em relação ao soro pré-imune.

4.4.4.3 – Ensaio cruzado entre recombinantes

Para avaliar a semelhança estrutural entre recombinantes 1 e 2, foram feitos ensaios cruzados entre seus soros e antígenos recombinantes 1 e 2. A resposta entre o soro anti-recombinante 1 e o recombinante 2 foi forte e significativo ($p < 0,05$, fig 19, A), assim como o soro anti-recombinante 2 reconhece o recombinante 1 ($p < 0,05$, fig 19, B), porém menos intensamente.

Figura 19 – Detecção de NcTRAP 2 recombinante 1 e recombinante 2 pelos respectivos soros cruzados. 5 ng/poço de recombinante 1 ou 2 foram submetidos ao soro anti-recombinante 2 ou 1, respectivamente, em diversas diluições de soros (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 e 1/16000) e ao conjugado 1/80000 sendo a absorbância medida a 450nm. Soro pré-imune obtido antes da primeira imunização; Soro 3 obtido após a terceira imunização. Gráfico A: Soro anti-recombinante 1 sobre recombinante 2; gráfico B: Soro anti-recombinante 2 sobre recombinante 1. Barras brancas: Soro pré-imune; barras pretas: Soro 3. * indica $p < 0,05$ em relação ao soro pré-imune.

4.5 - Western blot 1D

4.5.1 – Reatividade dos soros dos animais imunizados com seus imunógenos recombinantes

Os soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes reconheceram os seus respectivos imunógenos, a proteína recombinante 1 (fragmento 1, fig 20, poço 1) de aproximadamente 52 kDa, e a proteína recombinante 2 (fragmento 2 de 78 kDa, fig 20, poço 3). Também foram realizados ensaios cruzados, com os soros e conjugados nas mesmas concentrações, apenas invertendo o antígeno utilizado, e ambos os soros reconheceram o outro fragmento (fragmento recombinante 2 para soro anti-recombinante 1 e fragmento recombinante 1 para soro anti-recombinante 2 fig 20, poços 5 e 6).

Os controles de reação inespecífica foram realizados sobre extratos de BL21, fonte bacteriana de expressão dos fragmentos recombinantes. O soro anti-recombinante 1 não reagiu com proteínas bacterianas quando testado nas mesmas concentrações utilizadas para detectar os fragmentos recombinantes (fig 20, poço 2), o que indicou sinal de relativa pureza do fragmento utilizado nas imunizações. O soro anti-recombinante 2, entretanto, detectou duas bandas, de 40 e 25 kDa (fig 20, poço 4) as mesmas presentes após purificação (fig 11), o que provavelmente, provocou a produção de anticorpos contra estas estruturas.

Figura 20 - Western blot 1D para detecção dos fragmentos recombinantes 1 e 2 de NcTRAP 2 de *N. caninum*, controle sobre BL21 e ensaios cruzados. Filme autoradiográfico de western blot com os recombinantes contra os soros anti-recombinantes 1 e 2. Da esquerda para a direita. 1 = Recombinante 1, soro anti-recombinante 1; 2 = Extrato BL21, soro anti-recombinante 1; 3 = Recombinante 2, soro anti-recombinante 2; 4 = Extrato BL21, soro anti-recombinante 2; 5 = Recombinante 1, soro anti-recombinante 2; 6 = Recombinante 2, soro anti-recombinante 1. Diluições dos soros anti-recombinante 1 1/640000 e anti-recombinante 2 1/180000 e conjugado 1/600000, marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85, 60, 50 e 40.

4.5.2 – Reatividade dos soros dos animais imunizados sobre NcTRAP 2 nativa

Com o objetivo de detectar a forma nativa de NcTRAP 2 os soros anti-recombinantes sobre extrato total foram utilizados, partindo do princípio que anticorpos contra recombinantes possuem a capacidade de reconhecer a proteína nativa devido a mesma sequência primária de aminoácidos. Ambos os soros, tanto anti-recombinante 1 como anti-recombinante 2 detectaram fortemente um fragmento presente no extrato total de aproximadamente 80 kDa (fig 21, poços 1 e 3), o que provavelmente corresponde à forma nativa de NcTRAP 2, que, teoricamente, sem peptídeo sinal, possui 78 kDa. O controle realizado sobre extratos de células Vero não reagiu com o soro anti-recombinante 1 (fig 21, poço 2) e detectou bandas de 55 e 65 kDa com o soro anti-recombinante 2 (fig 21, poço 4). Este procedimento foi válido para confirmar que a banda de 80 kDa não tinha origem das células Vero, fontes de contaminantes dos extratos de taquizoítas de *N. caninum*.

O soro contra o extrato total de *N. caninum* reagiu com bandas em diversos pesos moleculares, a maioria entre 40 e 80 kDa (fig 21, poço 5). O controle, composto pelo soro total sobre extrato de Vero não detectou bandas na mesma diluição (1/10000, conjugado 1/80000) (fig 21, 6), demonstrando que a produção de anticorpos contra estruturas de Vero não foi significativo. O processo de purificação dos taquizoítas, realizado rotineiramente em nosso laboratório, levou à eliminação de proteínas de Vero por rompimento após passagem em agulha, resultando numa mistura de taquizoítas intactos e estruturas insolúveis (e/ou alto peso molecular) de Vero. A passagem pela coluna de exclusão privilegiou a separação dos taquizoítas e estruturas com dimensão semelhante, como o núcleo de células Vero.

Figura 21 - **Western blot 1D para detecção da proteína nativa NcTRAP 2 de *N. caninum* e seus controles.** Filme autoradiográfico de western blot com os antígenos de extrato total e Vero contra os soros anti-recombinantes 1, 2 e anti-extrato total. Da esquerda para a direita. 1 = Extrato total, soro anti-recombinante 1 (1/4000); 2 = Extrato Vero, soro anti-recombinante 1 (1/4000); 3 = Extrato total, soro anti-recombinante 2 (1/2000); 4 = Extrato Vero, soro anti-recombinante 2 (1/2000); 5 = Extrato total, soro anti-extrato total (1/10000); 6 = Extrato Vero, soro anti-extrato total (1/10000). Em todas as reações o conjugado foi diluído 1/80000, marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85, 60, 50 e 40.

4.5.3 – Reatividade dos soros recombinantes sobre extrato secretado (ESA)

O extrato secretado de *N. caninum* (ESA) foi utilizado em western blot para localizar NcTRAP 2 após a liberação pelos micronemas, com intuito de avaliar seu processamento pela detecção de isoformas. O soro anti-recombinante 1 sobre extrato de ESA detectou fragmentos de aproximadamente 70 kDa e 50 kDa (fig 22, poço 1) , enquanto seu controle detectou fracamente uma banda de 40 kDa (fig22 , poço 2). O soro anti-recombinante 2 detectou apenas o fragmento de 50 kDa (fig 22, poço 3) e seu controle apenas a região no fim da eletroforese, indicativo de detecção inespecífica (fig 22, poço 4). O fragmento de 70 kDa possui aproximadamente o peso predito para NcTRAP 2 (~72 kDa) sem a região transmembrana, clivagem que ocorre após ação das romboídes no fim do processo invasivo.

Figura 22 - **Western blot 1D do extrato secretado (ESA) de *N. caninum* e seus controles.** Filme autoradiográfico de western blot com os antígenos de ESA e Vero contra os soros anti-recombinantes 1 e 2. Da esquerda para a direita. 1 = ESA *N. caninum*, soro anti-recombinante 1 (1/4000); 2 = ESA Vero, soro anti-recombinante 1 (1/4000); 3 = ESA *N. caninum*, soro anti-recombinante 2 (1/2000); 4 = ESA Vero, soro anti-recombinante 2 (1/2000). Em todas as reações o conjugado foi diluído 1/80000, marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85, 60, 50 e 40.

4.6 – Western blot 2D

4.6.1 - Localização NcTRAP 2 nativa em western blot 2D

O soro do animal imunizado com recombinante 1 detectou o spot com o mesmo peso molecular da única banda reconhecida no western blot 1D (fig 21). Este spot foi sugestivo de NcTRAP 2, com aproximadamente 80 kDa e ponto isoelétrico na faixa ácida (fig 23, B, elipse), semelhante às características da proteína nativa que tem peso molecular predito de 78 kDa e ponto isoelétrico de 4,6 (sem o peptídeo sinal). O spot foi localizado no gel contendo extrato total de *N. caninum* (fig 23, A, elipse), porém a identidade final só poderá ser confirmada por espectrometria de massas. Apesar de aparecer como uma única banda de 50 kDa no western blot 1D, no 2D fica claro que a banda é composta de dois spots distintos (fig 23, retângulo), que podem ser isoformas de NcTRAP 2 processadas.

O mesmo ensaio foi realizado sobre extrato de células Vero como controle da interferência destas proteínas. Cinco proteínas foram detectadas (fig 23, D, pentágonos) e localizadas no gel 2D de extrato de Vero (fig 23, C, pentágonos). Entre estes um spot de aproximadamente 45 kDa foi reconhecido simultaneamente nos extratos de Vero e *N. caninum* (fig 23, A e B, pentágono).

Figura 23 - Western blot 2D sobre extrato total de *N. caninum*, controle sobre extrato de Vero e co-localização dos spots em gel 2D (gel 12,5%, strip 3-11 NL). A = Extrato total, gel 2D corado com comassie blue; B = Extrato total, filme autoradiográfico do western blot 2D com soro anti-recombinante 1 (1/8000) e conjugado (1/80000); C = Extrato Vero, gel 2D corado com comassie blue; D = Extrato Vero, filme autoradiográfico do western blot 2D com soro anti-recombinante 1 (1/8000) e conjugado (1/80000). Marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85 ou 80, 60, 50 e 40. As formas geométricas indicam proteínas oriundas de *N. caninum* (elipse e retângulo, B e D) ou de Vero (pentágono) com respectivas co-localizações no gel (A e C).

Uma comparação foi realizada entre os blots controle e extrato total de *N. caninum* para localizar possíveis proteínas de Vero reconhecidas no extrato total de *N. caninum* (fig 24). Foi localizado um spot comum, oriundo de Vero, presente também no gel de extrato total, enquanto quatro proteínas reconhecidas no western de Vero não foram detectadas no western sobre *N. caninum* (fig 24, A,B e C, pentágonos). A proteína NcTRAP 2 e/ou suas isoformas (fig 24, A,B e C, elipse e retângulo) não foram encontradas no western contra extrato de Vero, indicando que estas são realmente de origem parasitária e não da célula de cultivo, que pode

sempre estar presente no extrato de *N. caninum*, visto que não é possível retirar todas as células Vero durante o processo de purificação de taquizoítas. Foi, por fim, relacionado que os spots ou rastros detectados com aproximadamente 50 kDa pertenciam às isoformas de NcTRAP 2 enquanto os encontrados com aproximadamente 45 kDa eram contaminação por Vero.

Figura 24 - **Proteínas Vero reconhecidas pelo soro anti-recombinante 1 e localização das mesmas em gel 2D com extrato total de *N. caninum* (gel 12,5%, strip 3-11 NL).** A = Extrato total, gel 2D corado com comassie blue; B e C = Filmes autoradiográficos de western blot 2D realizado com soro anti-recombinante 1 (1/8000) e conjugado (1/80000) sendo extrato total em B, extrato de Vero em C. Marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85 ou 80, 60, 50 e 40. As elipses indicam a proteína NcTRAP 2 nativa, os retângulos suas formas processadas e o pentágonos as proteínas Vero.

4.6.2 - Western blot 2D com soro de animal imunizado com extrato total

Como no ELISA já havia sido detectada a presença de anticorpos no soro do coelho imunizado com extrato total reconhecendo as formas recombinantes de NcTRAP, um western blot 2D foi realizado com o intuito de verificar se o soro deste animal reconheceria spot(s) na região de NcTRAP 2 nativa. Houve reconhecimento de diversos spots, principalmente de proteínas ácidas com massa variando entre 40 e 80 kDa (fig 25, elipses verdes). Foi possível localizar os possíveis spots de NcTRAP 2 (fig 25, elipse preta) e suas isoformas processadas (fig 25, elipse vermelha), porém a identidade final só poderá ser confirmada por espectrometria de massas.

Figura 25 - Western blot 2D sobre extrato de *N. caninum* total utilizando soro anti-extrato total (gel 12,5%, strip 3-11 NL). A = Extrato total de *N. caninum* em gel 2D corado com comassie blue; B = Filme autoradiográfico de western blot 2D realizado com antígeno de extrato total de *N. caninum*, soro anti-extrato total (1/10000) e conjugado (1/80000). Marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85 ou 80, 60, 50 e 40. A elipse preta indica NcTRAP 2; a vermelha suas isoformas processadas e as verdes algumas proteínas imunogênicas no extrato de *N. caninum*.

Foi realizada uma comparação da reação do soro anti-extrato total com a reação do soro anti-recombinante 1 numa mesma figura, confirmando a localização relativa de NcTRAP 2 (fig 26).

Figura 26 - Localização de NcTRAP 2 nativa em gel 2D, reconhecidas pelo soro anti-recombinante 1 e anti-extrato total (gel 12,5%, strip 3-11 NL). A = Extrato total, gel 2D corado com comassie blue; B e C são filmes autoradiográficos de western blot 2D com conjugado 1/80000, sendo B = Extrato total, soro anti-recombinante 1 (1/8000); C = Extrato total, soro anti-extrato total (1/10000). Marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa: 85 ou 80, 60, 50 e 40. A elipse preta indica NcTRAP 2 e o retângulo suas isoformas processadas.

4.6.3 - Localização de NcTRAP 2 nativa em extrato secretado (ESA) por Western blot 2D

O soro do animal imunizado com recombinante 1 (1/4000, conjugado 1/80000) reagiu com dois spots do ESA de *N. caninum* (fig 27, B), com aproximadamente 80 e 70 kDa, na região de PI ácido. Apenas a banda de 70 kDa havia sido detectada no western blot 1D de ESA. Estas proteínas foram localizadas em gel corado por comassie (fig 27, A), provavelmente correspondentes a NcTRAP 2 na forma nativa não processada (sem peptídeo sinal), com 78 kDa, e NcTRAP 2 sem a região transmembrana, que surge após a clivagem pelas romboídes produzindo um fragmento de aproximadamente 72 kDa. O ensaio controle detectou fragmentos de aproximadamente 30 e 40 kDa (fig 27, D), localizado no respectivo gel (fig 27, C) sem relação aparente com os fragmentos encontrados sobre ESA de *N. caninum*.

Figura 27 - Western blot 2D sobre ESA de *N. caninum* e controle com ESA de Vero com respectivas localizações dos spots em gel 2D (gel 12,5%, strip 3-11 NL). A = ESA *N. caninum*, gel 2D corado com comassie; B = ESA *N. caninum*, filme autoradiográfico de western blot 2D, soro anti-recombinante 1 (1/4000) e conjugado (1/80000); C = ESA Vero, gel 2D corado com prata; D = ESA Vero, filme autoradiográfico de western blot 2D, soro anti-recombinante 1 (1/4000) e conjugado (1/80000). Marcador de peso molecular à esquerda indicados em kDa. As setas vermelhas indicam NcTRAP 2, as pretas NcTRAP 2 processada (extrato de *N. caninum*) e as elipses indicam proteínas reconhecidas no extrato de Vero.

4.7 - Curva de calibração real time PCR

Para realização do real time PCR quantitativo absoluto, foi necessário avaliar se a curva de calibração (referência para o cálculo de taquizoítas) era válida, com valores proporcionais e representativos. Cada ciclo (eixo das ordenadas) onde foi detectada a absorbância que ultrapassasse o limite acima da emissão de fundo da molécula fluorescente foi plotada contra o logaritmo do número de taquizoítas (eixo das abscissas) (fig 28).

A curva demonstrou grande reprodutibilidade da reação de real time PCR, pois não houve valor que tenha saído da faixa esperada (fig 28). O valor R, ou regressão aritmética, que representa a distância dos pontos em relação à reta formada entre estes foi de 0,96, sendo que 1,0 seria o valor hipotético se todos os pontos estivessem sobre a curva. Foi possível distinguir os pontos apenas nas duas maiores diluições, de 50 e 5 taquizoítas, sendo que nas diluições maiores não há esta distinção (fig 28), ou seja, nos primeiros a diferença foi de 1 ciclo enquanto nos outros não ultrapassou 0,5 ciclo, confirmando a grande reprodutibilidade do método e sua validação para servir como referência das amostras.

Figura 28 – **Curva padrão de Real time PCR de *N. caninum***. Duplicatas do DNA extraído de 5, 50, 500, 5×10^3 , 5×10^4 , taquizoítas/reação foram submetidos reação de real time PCR. O logaritmo do número de taquizoítas foram plotados no eixo X e o ciclo onde a detecção ultrapassou um limite pré-determinado foi plotado no eixo Y, formando uma reta onde cada ponto vermelho representa uma reação.

4.8 - Ensaio de invasão

O soro anti-recombinante 1 teve a capacidade de inibir a invasão de taquizoítas à sua célula hospedeira tanto na contagem manual quanto no real time PCR (fig 29). Na contagem, o soro anti-recombinante 1 com 250 ug/ml inibiu 53,58%, e com 100 ug/ml 39,36%, enquanto no real time a inibição foi de 61,87 e 36,99% respectivamente. O soro anti-extrato total inibiu 66,33% (250 ug/ml) e 55,67% (100 ug/ml) na contagem, por sua vez o real time PCR apresentou 60,09% (250 ug/ml) e 34,49% (100 ug/ml) de inibição em relação ao controle sem soro. O soro pré-imune inibiu 12,38% (contagem) e 18,39% (real time); e o soro contra a enzima alfaDHODH 16,35% (contagem) e 18,94% (real time). Todos os valores de inibição com o soro anti-recombinante 1 e com o soro anti-extrato total apresentaram valores significativos ($p < 0,05$), o que não ocorreu com o soro controle (anti-alfaDHODH, $p > 0,05$).

Figura 29 - **Ensaio de invasão de taquizoítas de *N. caninum* em células hospedeiras.** O método foi mensurado pela contagem manual (2×10^5 taquizoítas/poço) ou por real time PCR (3×10^5 taquizoítas/poço) que foram submetidos aos soros anti-extrato total com 250 (barras listras horizontais, Total 250) e 100 ug/ml (barras listras verticais, anti-recombinante 1 com 250 (barras pontilhadas, Rec 250) e 100 ug/ml (barras quadriculadas, Rec 100), anti-alfaDHODH, diluição 1/50 (barras pretas, DHoDH), e pré-imune, diluição 1/50 (barras brancas, PI). Gráfico A: Contagem manual, os taquizoítas invasivos foram contados manualmente após coloração por Giemsa. Gráfico B: Real time PCR, as amostras foram submetidos ao real time PCR e os valores calculados a partir de uma curva padrão, feita de diluições decimais conhecidas do DNA de taquizoítas. * indica $p < 0,05$ e ! $p > 0,05$ em relação ao soro pré-imune.

4.9 – Imuno-localização de NcTRAP 2 por microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum*

O soro do animal imunizado com a proteína recombinante 1 (1/100) reconheceu o complexo apical de taquizoítas de *N. caninum* em cultura Vero previamente infectada. A figura 30 mostra o resultado obtido em cortes ópticos feitos por microscopia confocal. A co-localização dos núcleos com iodeto de propídeo (fig 30, A e C) exaltou a localização apical do taquizoíta (fig 30, C). Os dados aqui apresentados corroboram a hipótese da origem micronêmica de NcTRAP 2.

Figura 30 – Imuno-localização de NcTRAP 2 por microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum*. Cultura Vero infectada com taquizoítas de *N. caninum*, submetida ao soro anti-recombinante 1, ao anticorpo anti-coelho conjugado com FITC e iodeto de propídeo. A = Detecção dos núcleos por iodeto de propídeo; B = Detecção de NcTRAP 2, com soro recombinante 1/100 e conjugado FITC 1/100; C = Sobreposição figuras A e B. Setas indicam a detecção por FITC. A barra inferior representa uma distância de 10 μm.

Foi realizado um controle com o soro pré-imune sobre uma cultura infectada de *N. caninum*, com o intuito de verificar a interferência de anticorpos formados antes das imunizações, sendo usados os mesmos parâmetros que no ensaio anterior. O iodeto de

propídeo detectou os núcleos dos taquizoítas e Vero (fig 31, A e C, setas), mas não detectou a região apical dos taquizoítas (fig 31, B e C), apenas emissão inespecífica, confirmando que a marcação observada com o soro anti-recombinante 1 é específica (fig 30).

Figura 31 – Experimento controle em microscópica confocal com soro pré-imune em taquizoítas de *N. caninum*. Cultura Vero infectada com *N. caninum*, submetida ao soro pré-imune, ao anticorpo anti-coelho conjugado com FITC e iodeto de propídeo. A = Detecção dos núcleos por iodeto de propídeo; B = soro pré-imune 1/100 e conjugado FITC 1/100; C = Sobreposição figuras A e B. Setas indicam núcleos de Vero e *N. caninum* detectados pelo iodeto de propídeo. A barra inferior representa uma distância de 5 μm.

5 - DISCUSSÃO

O presente trabalho desvendou a estrutura e sequencia do gene NcTrap 2, com 3 íntrons e 4 éxons e sua sequencia protéica com apenas 38% de identidade a NcTRAP 1. Proteínas recombinantes de NcTRAP 2 de diferentes tamanhos, denominadas recombinantes 1 e 2, serviram de imunógenos para coelhos. Os soros permitiram localizar a forma nativa de NcTRAP 2 e a realização de avaliação funcional com o ensaio de invasão. A invasão foi inibida de 53 a 61%, dependendo do método utilizado (contagem manual ou real time PCR). Além disso, a localização predita nas micronemas foi confirmada por microscopia confocal.

A análise de TgMIC 2 (BROSSIER & SIBLEY., 2005; WAN et al., 1997) e NcTRAP 1 (LOVETT et al.; 2000) serviram de base para o presente trabalho de NcTRAP 2. O domínio integrina possui grande similaridade com seus homólogos de *N. caninum* (NcTRAP 1) e *T. gondii* (TgMIC 2) (fig 32). O alinhamento indicou que a região da integrina em NcTRAP 2 vai do 64° ate o 208° aminoácido enquanto em NcTRAP 1 vai do 73° ao 216° e TgMIC 2 do 72° ao 215°. O domínio integrina está presente em várias proteínas de mamíferos, incluindo colágeno, proteínas da matriz extracelular e proteínas séricas, além de possuir homólogos já degenerados em artrópodes, nematóides, fungos e plantas (MORAHAN et al.; 2008, WHITTAKER & HYNES.; 2002). No domínio integrina há a presença de uma região MIDAS com a sequencia conservada DXSXS tanto em NcTRAP 2 quanto em TgMIC 2 e NcTRAP 1 (fig 74) (LOVETT et al.; 2000). Este domínio, primeiramente detectado em mamíferos, é responsável pela ligação coordenada aos metais Mg^{2+} e Mn^{2+} , mediadores de interações de reconhecimento e adesão celular (MORAHAN et al.; 2008). Mutações neste domínio levam a perda da capacidade de ligação da integrina em *T.gondii* (BROSSIER & SIBLEY, 2005).

Além deste domínio, há cinco trombospondinas, similares a TgMIC 2 e NcTRAP 1, que possuem repetições WSPCSVTCG (fig 32) que se apresentam com algumas variações pontuais entre os homólogos. O domínio trombospondina é responsável pelo reconhecimento de grupos fosfato nas proteoglicanas (MORAHAN et al.; 2008). Ademais NcTRAP 2 apresentou três cópias de WSXWS (barra azul, fig 32), domínio presente em receptores de hematopoetina, citocinas e componentes do complemento. Há quatro cópias de WSXWS em TgMIC 2 e duas

em NcTRAP 1. NcTRAP 2 apresentou também dois motivos similares WSXCS (barra azul, fig 32). Peptídeos baseados nestes motivos mostraram, em *T. gondii*, grande afinidade pela heparina e promoveram a adesão celular, inibindo a interação das células do melanoma com proteínas da matriz extracelular, sendo também importante na cadeia beta do ligante de IL-12 na transdução de sinal (BROSSIER & SIBLEY., 2005). O domínio trombospondina possui vários motivos RXR conservados (barra azul, fig 32), com posição conservada entre os homólogos TgMIC 2, NcTRAP 1 e NcTRAP 2. Este motivo básico e hidrofóbico já foi demonstrado ser importante na adesão de TRAP de *Plasmodium* com cadeias de glicosamidas negativamente carregadas presentes em vários tipos celulares (MORAHAN et al., 2008; LOVETT et al., 2000).

Na região transmembrana, todos os homólogos possuem a região de clivagem IAGG (fig 32), sitio de clivagem de MPP1 e rombóide TgROM 5, fundamentais para a liberação do parasita no fim do processo invasivo (DOWSE & SOLDATI., 2005). Ainda na região transmembrana, constatou-se que NcTRAP 2 possui alta identidade e similaridade com NcTRAP 1 (68% e 82%) e TgMIC 2 (51% e 62%) enquanto a comparação entre as duas últimas indicou 74% e 91% (LOVETT et al., 2000). Tal análise evidencia que NcTRAP 1 é muito mais próxima a TgMIC 2 do que com NcTRAP 2, reforçando a hipótese de que este trabalho está descrevendo um novo tipo de TRAP. A proximidade maior entre NcTRAP 1 e TgMIC 2 também foi verificada pelas sequências das caudas citoplasmáticas pois NcTRAP 2 possui apenas 32% de identidade e 42% de similaridade com NcTRAP 1 e 27% e 46% com o TgMIC 2. Por sua vez, TgMIC 2 possui 81 % de similaridade e 65% de identidade com NcTRAP 1. As três proteínas apresentam nas caudas citoplasmáticas diversas regiões idênticas, possivelmente compartilhando funções semelhantes, como na interação com a proteína ligadora a actina, a aldolase responsável pela ligação entre o sistema motor actina/miosina e a proteína micronêmica. A ligação à aldolase é feita através da interação com a uma tirosina conservada em TgMIC 2 (BROSSIER & SIBLEY., 2005).

Figura 32 - Alinhamento da sequência proteica de NcTRAP 2 com NcTRAP 1 (*N. caninum*) e TgMIC 2 (*T. gondii*). Os principais componentes de cada sequência estão destacados: Barra vermelha, domínio integrina; barra verde, região transmembrana; barras azuis, motivos funcionais; colchetes pretos, peptídeo sinal; colchetes azuis, trombospondinas.

Os fragmentos recombinantes 1 e 2 foram desenhados com base nos domínios integrina e trombospondinas, responsáveis pela adesão da molécula de TRAP a célula hospedeira (MORAHAN et al., 2008). Estes, após expressão, apresentaram pesos maiores que o esperado quando submetidos a SDS-PAGE. Isto foi verificado para a maioria das TRAPs, como em *Plasmodium berguei*, *Plasmodium falciparum* (ROBSON et al., 1997) e NcTRAP 1 (LOVETT et al.; 2000). Esta característica ocorre em proteínas com baixo ou alto ponto isoelétrico, no caso de TRAPs ficam entre 4 e 5. Também há uma grande quantidade de prolinas que podem ocasionar tal fenômeno, observado por exemplo em colágenos e caseínas, provavelmente por provocarem um aumento na extensão da proteína (ROBSON et al.; 1997).

A resposta imune produzida após imunizações com extrato total de *N. caninum* resulta em proteção em modelos murinos (INNES et al.; 2002). A obtenção de extrato total para a fabricação de vacinas, porém, a torna inviável, pois por ser uma mistura, possui antígenos que não conferem proteção, alguns podendo ser imuno-supressivos levando a uma resposta imune indesejável (CHO et al.; 2005). O uso de extrato total neste trabalho visou apenas utilizá-lo como um controle positivo da produção de anticorpos e parâmetro geral de resposta em outros experimentos, sendo também verificado em experimentos envolvendo NcMIC 3 (NAGULESWARAN et al.; 2002) e NcMIC 4 (KELLER et al.; 2004).

A forma nativa de NcTRAP 2 foi detectada com aproximadamente 80 kDa na forma não processada e com 70 kDa na sua forma secretada, o que representa valores muito próximos aos seus pesos moleculares preditos para a molécula inteira sem o peptídeo sinal (78 kDa) e após clivagem na região transmembrana (72 kDa). A forma secretada de NcTRAP 1 foi descrita com pesos moleculares de 115 kDa e 95 kDa (LOVETT et al.; 2000), muito superiores ao peso predito de 80 kDa, o que não ocorreu neste trabalho para NcTRAP 2. A grande variação de pesos moleculares entre NcTRAP 1 e NcTRAP 2 poderia ser explicada por diversas hipóteses como variação na localização dos sítios de clivagem, diferentes formas de modificações pós-traducionais, ou ainda interação com outras proteínas ainda desconhecidas, como já descrito para TgMIC 2 formando complexo com a proteína TgM2AP (HARPER et al.; 2006).

Os métodos de mensuração nos ensaios de invasão utilizados neste trabalho consistiram em contagem manual e real time PCR. Como descrito por

NAGULESWARAN et al., 2003; há diferença quando se compara os métodos num mesmo experimento, já que o método de contagem geralmente utiliza a detecção visual dos taquizoítas enquanto o de real time calcula a quantia absoluta de acordo com a quantia de DNA presente na amostra. Neste trabalho ambos os métodos forneceram resultados bastante semelhantes nos valores para inibição de invasão celular, porém a reação molecular sofreu menos variação e as porcentagens de inibição foram sensivelmente maiores do que pelo método manual. Devido a sua sensibilidade e especificidade, o método de real time é utilizado para quantificação de amostras de *Toxoplasma*, *Neospora* e *Plasmodium*, utilizando diversos tipos de marcadores fluorescentes (BELL & RANFORD-CATRWRIGHT., 2002).

As proteínas micronêmicas são encontradas no complexo apical, armazenadas nas micronemas, necessárias principalmente para a adesão e início do processo invasivo (RAVINDRAN & BOOTHROYD., 2008; CEREDE et al., 2005; SOLDATI et al., 2001; DICRISTINA et al., 2000). Neste trabalho demonstrou-se que NcTRAP 2 localiza-se na parte apical, o que já foi mostrado da mesma forma com antisoros contra recombinantes de estruturas micronêmicas, como demonstrado para NcTRAP 1 (LOVETT et al., 2000), TgMIC 2 (BROSSIER & SIBLEY., 2005), TgMIC 3 (EL HAJJ et al., 2008) e NcAMA 1 (ZHANG et al., 2007). O fato de NcTRAP 2 ter inibido a invasão em altos níveis (53 a 61%), ao se considerar uma única proteína, torna esta molécula um candidato em potencial para compor uma vacina multi-componentes. Em *T. gondii*, motivos selecionados de proteínas cruciais para adesão/invasão como TgMIC2, MIC3 e SAG1 estão sendo testados em forma de quimera em vacinações. (JONGERT et al., 2008). A caracterização molecular iniciada neste trabalho com NcMIC 2 abre o caminho para estudos mais detalhados para se avaliar quais os motivos essenciais para invasão celular presentes em NcMIC 2 e a eficiência da proteína em ensaios in vivo de imunização. Desta forma, estaremos contribuindo para ampliar a gama de antígenos que poderão ser utilizados numa futura prevenção contra neosporos

6 – Conclusões

1) A sequência codificada de NcTRAP-2 possui apenas 39% de identidade e 52% de similaridade com NcTRAP 1, indicando claramente que *N. caninum* possui dois genes diferentes de TRAP (proteínas anônimas relacionadas à trombospondina);

2) NcTRAP 2 possui maior identidade e similaridade, dentre os Apicomplexas, com *Toxoplasma gondii* (38 e 52%) e *Eimeria tenella* (39 e 52%) do que com *Theileria parva/annulata* (8 e 17 % para o primeiro e 9 e 19% para o segundo) ou *Babesia bovis* (17 e 27%);

3) A sequência genômica NcTrap 2 possui três introns e quatro éxons. Os íntrons possuem um total de 1264 pb distribuídos em fragmentos de 667, 393 e 194 pb respectivamente, representando 28,5% de sua sequência genômica. Os éxons possuem um total de 3156 pb distribuídos em quatro éxons distribuídos em fragmentos de 116, 1611, 404 e 1025 pb;

4) As duas formas recombinantes de NcTRAP 2 (com ausência de peptídeo sinal e a região transmembrana), induzem intensa produção de anticorpos em coelhos imunizados;

5) As formas nativas de NcTRAP 2 possuem 80 kDa e 50 kDa e, em sua forma secretada, 70 kDa;

6) NcTRAP 2 inibe a invasão celular em ao menos 53%;

7) NcTRAP 2 está localizada na região apical dos taquizoítas.

7 - Referências Bibliográficas

- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.; CAMARGO, E.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Vet Parasitol.** v.124(1-2), p.71-77, 2006.
- ANDERSON, T.; DE JARDIM, A.; HOWE, D.K.; DUBEY, J.P.; MISHALSKI, M.L. *N. caninum* antibodies detected in Midwestern white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) by Western blot and ELISA. **Vet Parasitol.** v.145(1-2), p.152-5, 2006.
- ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; SILVA, E.A.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.D.E. F. Occurrence of *N. caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Vet Parasitol.** v.135(3-4), p.375-9, 2006.
- AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.; VASCONCELLOS, S.A.; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.; RODRIGUES, A.A.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *N. caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Res Vet Sci.** v.79(1), p. 51-6, 2005.
- BAUM, J.; RICHARD, D.; HEALER, J.; RUG, M.; KRNAJSKI, Z.; GILBERGER, T.W.; GREEN, J.L.; HOLDER, A.A.; COWMAN, A.F. A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites. **J Biol Chem.** v.281(8), p. 5197-208, 2006.
- BELL, A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in parasitology.** v.18(8), p.337-42, 2002.
- BRESCIANI, K.D.; GENNARI, S.M.; SERRANO, A.C.; RODRIGUES, A.A.; UENO, T.; FRANCO, L.G.; PERRI, S.H.; AMARANTE, A.F. Antibodies to *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitol Res.** v.100(2), p. 281-5, 2006
- BROSSIER, F.; STARNES, G.L.; BEATTY, W.L.; SIBLEY, L.D. Microneme rhomboid protease TgROM1 is required for efficient intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic cell.** v.7(4), p. 664-74, 2008.
- BROSSIER, F.; SIBLEY, L. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC 2. **Int J Biochem Cell Biol.** v.37(11), p. 2266-72, 2005.
- BRYDGES, S.D.; HARPER, J.M.; PARUSSINI, F.; COPPENS, I.; CARRUTHERS, V.B. A transient forward-targeting element for microneme-regulated secretion in *Toxoplasma gondii*. **Biology of the Cell.** v. 100, p. 253-64, 2008.
- BUSCAGLIA, C.A.; COPPENS, I.; HOL, W.G.; NUSSENZWEIG, V. Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. **Mol Biol Cell.** v.14(12), p. 4947-57, 2003.

- BUXTON, D.; MCALLISTER, M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitol.** v.18(12), p. 546-552, 2002.
- CANON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.; SILVA, J.C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondonia, Brazil. **Vet Res Commun.** v. 28(2), p. 113-8, 2004.
- CANON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.; JOPPERT, A.M.; SOUZA, C.E.; D'AURIA, S.R.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoerus hydrochoeris*) from Brazil. **J Parasitol.** v.89(4), p. 850, 2003.
- CARRUTHERS, V.B.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol.** v.10(1), p. 83-9, 2007.
- CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European journal of cell biology.** v.73(2), p. 114-23, 1997.
- CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol.** v.31(2), p. 421-8, 1999.
- CÉRÈDE, O.; DUBREMETZ, J.F.; SOÛTE, M.; DESLÉE, D.; VIAL, H.; BOUT, D.; LEBRUN, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **Israel journal of experimental medicine.** v.201(3), p. 453-63, 2005.
- CESBRON-DELAUW, M.F.; GENDRIN, C.; TRAVIER, L.; RUFFIOT, P.; MERCIER, C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. **Traffic.** v. 9(5), p.657-64, 2008.
- CHO, J.H.; CHUNG, W.S.; SONG, K.J.; NA, B.K.; KANG, S.W.; SONG, C.Y.; KIM, T.S. Protective efficacy of vaccination with *N. caninum* multiple recombinant antigens against experimental *N. caninum* infection. **The Korean journal of parasitology.** v. 43(1), p.19-25, 2005.
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology.** v.40(4), p.1194-8, 2002.
- CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.; GONDIM, L.F.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Vet Parasitol.** v.103(3), p.195-202, 2002.
- CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D.R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *N. caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **Vet J.** v.172(1), p.114-20, 2006.

- DENG, M.; TEMPLETON, T.J.; LONDON, N.R.; BAUER, C.; SCHROEDER, A.A.; ABRAHAMSEN, M.S. *Cryptosporidium parvum* genes containing thrombospondin type 1 domains. **Infect Immun.** v.70(12), p.6987-95, 2002.
- DESSENS, J.T.; BEETSMA, A.L.; DIMOPOULOS, G.; WENGELNIK, K.; CRISANTI, A.; KAFATOS, F.C.; SINDEN, R.E. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. **EMBO J.** v.18(22), p.6221-7, 1999.
- DI CRISTINA, M.; SPACCAPELO, R.; SOLDATI, D.; BISTONI, F.; CRISANTI, A. Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Mol Cell Biol.** v.10(19), p.7332-41, 2000.
- DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *N. caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *N. caninum* tachyzoites. **Int J Parasitol.** v.31(8), p.747-52, 2001.
- DOBROWOLSKI, J.M.; CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol.** v.26(1), p.163-73, 1997.
- DOBROWOLSKI, J.M.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell.** v.84(6), p.933-9, 1996.
- DOWSE, T.; SOLDATI, D. Host cell invasion by the Apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. **Curr Opin Microbiol.** v.7(4), p.388-96, 2005.
- DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *N. caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Prev Vet Med.** v.74(2-3), p.130-41, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 20 (2) p.323-67. 2007.
- DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WONDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **J Comp Pathol.** v. 134(4), p.7-89, 2006.
- DUBEY, J.P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N.J.; WONG, S.K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J.W.; EWING, R.; MENSEA, M.; KWOK, O.C.H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Vet. Parasitol.** v. 116 p.275-296. 2003.
- DUBEY, J.P. Review of *N. caninum* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol.** v.41(1), p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA,

- A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.; LINDSAY, D.S. Redescription of *N. caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol.** v.32(8), p.929-46, 2002.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *N. caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J Am Vet Med Assoc.** v.193(10), p.1259-63, 1988.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *N. caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol.** v.67(1-2), p.1-59, 1996.
- DUBREMETZ, J.F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular Microbiology.** v.9(4), p. 841 – 848, 2007.
- DUBREMETZ, J.F.; GARCIA-RÉGUET, N.; CONSEIL, V.; FOURMAUX, M.N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International journal for parasitology.** v. 28(7), p.1007-13, 1998.
- EL HAJJ, H.; PAPOIN, J.; CÉRÈDE, O.; GARCIA-RÉGUET, N.; SOËTE, M.; DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Molecular Signals in the Trafficking of *Toxoplasma gondii* Protein MIC3 to the Micronemes. **Eukaryotic Cell.** v. 7(6), p.1119-28, 2008.
- FERNANDES, B.C.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*N. caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais-Brazil. **Vet Parasitol.** v.123(1-2), p.33-40, 2004.
- FIGLIUOLO, L.P.; KASAI, N.; RAGOZO, A.M.; DE PAULA, V.S.; DIAS, R.A.; SOUZA, S.L.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*N. caninum* antibodies in ovine from Sao Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.** v.123(3-4), p. 161-6, 2004.
- FUJI, T.U.; KASAI, N.; NISHI, S.M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *N. caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Vet Parasitol.** v.99(4), p.331-4, 2001.
- GAFFAR, F.R.; YATSUDA, A.P.; FRANSSSEN, F.F.; DE VRIES, E. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. **Mol Biochem Parasitol.** v.136(1), p.25-34, 2004.
- GENNARI, S.M.; RODRIGUES, A.A.; VIANA, R.B.; CARDOSO, E.C. Occurrence of anti-*N. caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. **Vet Parasitol.** v.134(1-2), p.169-71, 2005.
- GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; D'AURIA, S.N.; CARDOSO, S.M.; KWOK, O.C.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *N. caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. **Vet Parasitol.** v.106(2), p. 177-9, 2002.

- GHALMI, F.; CHINA, B.; KAIDI, R.; DAUBE, G.; LOSSON, B. Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. **Veterinary parasitology**. v.155(1-2), p.161-7, 2008.
- GONDIM, L.F.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**. v.34(2), p.159-61, 2004.
- GONDIM, L.F.; GAO, L.; MCALLISTER, M.M. Improved production of *N. caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **J Parasitol**. v.88(6), p.1159-63, 2002.
- GONDIM, L.F.; SARTOR, I.F.; MONTEIRO, L.A.; HARITANI, M. *N. caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **N Z Vet J**. v.47(1), p.35, 1999a.
- GONDIM, L.F.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *N. caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Vet Parasitol**. v.86(1), p.71-5, 1999b.
- GUIMARAES, J.S.; SOUZA, S.L.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *N. caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. **Vet Parasitol**. v.124(1-2), p.1-8, 2004.
- HARPER, J.M.; HUYNH, M.H.; COPPENS, I.; PARUSSINI, F.; MORENO, S.; CARRUTHERS, V.B. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. **Mol Biol Cell**. v. 17(10), p. 4551-63. 2006.
- HEMPHILL, A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *N. caninum* tachyzoite surface protein. **Infect Immun**. v.64(10), p.4279-87, 1996.
- HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Adv Parasitol**. v.43, p.47-104, 1999.
- HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**. v. 133(3), p.261-78, 2006.
- HOFF, E.F.; COOK, S.H.; SHERMAN, G.D.; HARPER, J.M.; FERGUSON, D.J.; DUBREMETZ, J.F.; CARRUTHERS, V.B. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. **Exp Parasitol**. v.97(2):p.77-88, 2001.
- HOWE, D.; SIBLEY, D. Development of Molecular Genetics for *Neospora caninum*: A Complementary System to *Toxoplasma gondii*. **Methods**. v.13, p.123-133, 1997.
- HUYNH, M.H.; OPITZ, C.; KWOK, L.Y.; TOMLEY, F.M.; CARRUTHERS, V.B.; SOLDATI, D. Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*. **Cell Microbiol**. v.6(8), p.771-82, 2004.

- INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.; CONRAD, P.A. Immune responses to *N. caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitol.** v.18(11), p.497-504, 2002.
- JEWETT, T.J.; SIBLEY, L.D. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in Apicomplexan parasites. **Mol Cell.** v.11(4):p.885-94, 2003.
- JOINER, K.A.; ROOS, D.S. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. **J Cell Biol.** v.157(4), p.557-63. 2002.
- JONGERT, E.; VERHELST, D.; ABADY, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart. **Vaccine.** v. 26(41), p.5289-95. 2008.
- KAPPE, S.; BRUDERER, T.; GANTT S.; FUJIOKA, H.; NUSSENZWEIG, V.; MENARD, R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. **J Cell Biol.** v.147(5), p.937-44, 1999.
- KELLER, N.; RIESEN, M.; NAGULESWARAN, A.; VONLAUFEN, N.; STETTLER, R.; LEEPIN, A.; WASTLING, J.M.; HEMPHILL, A. Identification and characterization of a *N. caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. **Infection and immunity.** v. 72(8):4791-800, 2004.
- KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ, M.; BJORKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPHILL, A. Identification of a *N. caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. **Infect Immun.** v.70(6), p.3187-98, 2002.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.; JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *N. caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **Vet Rec.** v.153(12),p.366-7. 2003.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J Parasitol.** v.87(6), p.1493-4, 2001.
- LOVETT, J.L.; HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Mol Biochem Parasitol.** v. 15;107(1), p.33-43, 2000.
- MARSH, A.E.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.; HO, M.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. **J Parasitol.** v.81(4), p.530-5, 1995.
- MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol.** v.28(9),p.1473-8, 1998.

- MEISSNER, M.; SCHLUTER, D.; SOLDATI, D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. **Science**. v.298(5594), p.837-40, 2002.
- MENARD, R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. **Microbes Infect**. v.2(6), p.633-42, 2000.
- MINEO, T.W.; CARRASCO, A.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**. v. 159, p. 149-153, 2009.
- MINEO, T.W.; SILVA, D.A.; COSTA, G.H.; VON ANCKEN, A.C.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Vet Parasitol**. v.98(4), p. 239-45, 2001.
- MORAHAN, B.J.; WANG, L.; COPPEL, R.L. No TRAP no invasion. **Trends in parasitology**. v. 25(2), p.77-84, 2008.
- NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; HEMPHILL, A. *N. caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. **Experimental parasitology**. v.104(3-4), p.149-58, 2003.
- NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N.; BJÖRKMAN, C.; HEMPHILL, A. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *N. caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**. v. 32(6), p.695-704, 2002.
- NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; BJORKMAN, C.; HEMPHILL, A. *N. caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. **Infect Immun**. v.69(10), p.6483-94, 2001.
- OPITZ, C.; SOLDATI, D. The glideosome: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**. v. 43(3), p.597-604, 2002.
- RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J.C. Secretion of Proteins into Host Cells by Apicomplexan Parasites. **Traffic**. v. 9(5), p.647-56, 2008.
- REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T.; DUBEY, J.P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **The Journal of small animal practice**. v.48(6), p.308-12, 2007.
- ROBSON, K.J.; NAITZA, S.; BARKER, G.; SINDEN, R.E.; CRISANTI, A. Cloning and expression of the thrombospondin related adhesive protein gene of *Plasmodium berghei*. **Molecular and biochemical parasitology**. v.84(1), p.1-12, 1997.

- RODRIGUES, A.A.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.; DUBEY, J.P. Shedding of *N. caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Vet Parasitol.** v.124(3-4), p.139-50, 2004.
- RODRIGUES, A.A.; GENNARI, S.M.; PAULA, V.S.; AGUIAR, D.M.; FUJII, T.U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R.Z.; DUBEY, J.P. Serological responses to *N. caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Vet Parasitol.** v.129(1-2), p.21-4, 2005.
- ROY, C.R.; SALCEDO, S.P.; GORVEL, J.P.E. Pathogen–endoplasmic-reticulum interactions: in through the out door. **Nature Reviews Immunology.** v. 6, p.136-47, 2006.
- SAMBROOKS, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edition, v. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SHEINER, L.; SOLDATI-FRAVE, D. Protein Trafficking inside *Toxoplasma gondii*. **Traffic.** v.9, p.636-646. 2008.
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.** v.31(12), p.1293-302, 2001.
- SOLDATI, D.; MEISSNER, M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. **Curr Opin Cell Biol.** v.16(1), p.32-40, 2004.
- SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. **Mol Biochem Parasitol.** v.108(1), p. 39-51, 2000.
- SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitic research.** v. 88, p. 1013-25, 2002.
- STARNES, G.L.; JEWETT, T.J.; CARRUTHRS, V.B.; SIBLEY, L.D. Two Separate, Conserved Acidic Amino Acid Domains within the *Toxoplasma gondii* MIC 2 Cytoplasmic Tail Are Required for Parasite Survival. **The Journal of biological chemistry.** v.286(41), p.45-54, 2006.
- SULTAN, A.A.; THATHY, V.; FREVERT, U.; ROBSON, K.J.; CRISANTI, A.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R.S.; MENARD, R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. **Cell.** v.90(3), p.511-22, 1997.
- TARDIEUX, I.; MÉNARD, R. Migration of Apicomplexa Across Biological Barriers:The *Toxoplasma* and *Plasmodium* Rides. **Traffic.** v.9, p.627-35, 2008.
- TIEMANN, J.C.; RODRIGUES, A.A.; DE SOUZA, S.L.; DUARTE, J.M.; GENNARI, S.M. Occurrence of anti-*N. caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. **Vet Parasitol.** v.129(3-4), p.341-3, 2005.

- TOMLEY, F.M.; BILLINGTON, K.J.; BUMSTEAD, J.M.; CLARK, J.D.; MONAGHAN, P. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. **Int J Parasitol.** v. 31(12), p. 1303-10, 2001.
- TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *N. caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitol.** v.21(12), p.558-61, 2005.
- TREES, A.J.; MCALLISTER, M.M.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; SMITH, R.F.; WILLIAMS, D.J. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Vet Parasitol.** v.109(1-2), p.147-54, 2002.
- TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology.** v.29, p.1195-1200, 1999.
- WAN, K.L.; CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC 2. **Mol Biochem Parasitol.** v.84(2), p.203-14, 1997.
- WILLIAMS, D.J.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P.J.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology.** v.121 (4),p.347-58, 2000.
- WHITTAKER, C.A.; HYNES, R.O. Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere. **Molecular Biology of the Cell.** v. 13, p.3369-87, 2002.
- YAI, L.E.; CANON-FRANCO, W.A.; GERALDI, V.C.; SUMMA, M.E.; CAMARGO, M.C.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence of *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of Sao Paulo, Brazil. **J Parasitol.** v. 89(4), p. 870-1, 2003.
- ZHANG, H.; COMPAORE, M.K.; LEE E.G.; LIAO, M.; ZHANG, G.; SUGIMOTO, C.; FUJISAKI, K.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. **Mol Biochem Parasitol.** v.151(2), p. 205-12, 2007.