UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Identificação e caracterização de proteínas de superfície da família SRS do Apicomplexa *Neospora caninum*

Marcos Alexandre Bezerra

Ribeirão preto 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Identificação e caracterização de proteínas de superfície da família SRS do Apicomplexa *Neospora caninum*

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Marcos Alexandre Bezerra **Orientador (a)**: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 21/06/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

LOMBADA

BEZERRA, M.A
Identificação e caracterização de proteínas de superfície da família SRS do Apicomplexa <i>Neospora caninum</i>
Doutorado FCFRP

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Bezerra, Marcos Alexandre

Identificação e caracterização de proteínas de superfície da família SRS do Apicomplexa *Neospora caninum*. Ribeirão Preto, 2017.

118 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Yatsuda Natsui, Ana Patrícia.

1. *Neospora caninum*. 2. Apicomplexa. 3. Proteínas de superfície. 4. Proteínas SRS. 5. NcSRS67 e NcSRS57.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcos Alexandre Bezerra

Identificação e caracterização de proteínas de superfície da família SRS do Apicomplexa *Neospora caninum*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
_ / _	
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof Dr	
	• • <i>·</i>
Instituiçao:	_Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Dedico esta conquista aos meus pais, Plínio Arrais Bezerra e Maria Augusta Hipólito, por me apoiarem em todos os momentos na busca dos meus objetivos. Ao meu irmão Bruno Arrais Bezerra, pelas conversas e incentivos. Também à minha namorada Nathália Alves dos Santos, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão dedicados durante todo este tempo. A vocês, os meus sinceros agradecimentos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida, pelas oportunidades e por colocar em meu caminho pessoas que me acolheram e enriqueceram meus dias.

À técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular da FCFRP-USP Maraísa Palhão Verri, pelo grande auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao pós doutorando Luiz Miguel Pereira pelo grande auxílio durante os experimentos de bancada, pelas grandes contribuições neste trabalho e pelas discussões científicas produtivas e pelo companheirismo;

À doutoranda Luciana Baroni, pelas grandes contribuições durante os experimentos e também pelas discussões científicas e pelo companheirismo;

À pós doutoranda Leticia Pollo de Oliveira, pelo auxílio na preparação e tripsinização de amostras submetidas à espectrometria de massas;

À doutora Carla de Agostino Biella, pela colaboração na etapa de obtenção de anticorpos policionais;

À farmacêutica-Bioquímica Aline Bononi, pelas contribuições neste trabalho;

Ao Farmacêutico Bruno Bonamichi Bueno, pala amizade e companheirismo;

À doutora Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira, pela amizade, pelos momentos de descontração e formação conjunta através das discussões e contribuições;

À mestranda Julia Audrey Silva, pela amizade, pelos momentos de descontração e formação conjunta através das discussões e contribuições;

À especialista de laboratório Jaqueline Nakau Mendonça do Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP-USP, pelo auxílio na execução das análises de espectrometria de massas;

Ao especialista de laboratório Eduardo Tozatto do Laboratório Multiusuário de Microscopia da FCFRP, pelo auxílio na captação de imagens com o microscópio confocal;

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, da FCFRP-USP pelos conhecimentos ministrados e incentivos à pesquisa.

À todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão preto -USP que sempre me atenderam com muita educação e competência.

> À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pela concessão da bolsa.

> > e, em especial,

À professora. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, pela acolhida e oportunidade em seu laboratório, pelas dicas extremamente relevantes e pelos conhecimentos transmitidos. Por sua amizade, companheirismo, compreensão e inestimável colaboração no desenvolvimento desta pesquisa. Jamais esquecerei seus esforços por mim.

"A persistência é o menor caminho do êxito".

(Charles Chaplin)

RESUMO

BEZERRA, M. A. Identificação e caracterização de proteínas de superfície da família SRS do apicomplexa *Neospora caninum.* 2017. 145f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, intimamente relacionado a Toxoplasma gondii e responsável por abortamento e perda da fertilidade em bovinos, o que acarreta prejuízos significativos na pecuária mundial. Como parte de seu ciclo intracelular, a primeira interação do parasita com a célula alvo é realizada por proteínas de superfície conhecidas como superfamília SRS (Surface Antigen Glycoprotein – Related Sequences). Proteínas SRS ou SAG tem sido alvo de intensas pesquisas devido ao seu padrão imunodominante. exibindo grande potencial como ferramenta de diagnóstico e/ou candidatos vacinais. Atualmente existem cinco genes pertencentes à extensa família de proteínas SRSs descritos na literatura científica para N. caninum, dos quais dois foram caracterizados de taquizoítas por serem altamente reconhecidos por soros de animais infectados: NcSRS29B (SAG1) e NcSRS29C (SRS2). Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar as proteínas de superfície SRS, NcSRS57 e NcSRS67. Além disso, foi obtido um panorama geral de proteínas ancoradas por GPI de N. caninum na linhagem Nc-1. Dentre os homólogos apicomplexas, NcSRS67 apresentou maior identidade e similaridade com Hammondia hammondi (HHA 450490), enguanto NcSRS57 revelou maior identidade e similaridade com Toxoplasma gondii (TgSRS57). NcSRS67 e NcSRS57 apresentaram a terceira maior semelhança entre os homólogos envolvidos no alinhamento estrutural. Estas duas proteínas SRS possuem doze resíduos de cisteína conservados que por predição formam seis pontes dissulfeto distribuídas em dois domínios SRS (D1 e D2), formando sanduiches de folhas β e α hélices associadas entre si. A sequência codificadora de NcSRS67 (sem o peptídeo sinal e sem a âncora GPI) foi clonada e expressa constitutivamente no plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x}. A forma nativa de NcSRS67 apresentou massa molecular de 35 kDa (predito 30.6 kDa sem peptídeo sinal e sem âncora GPI). A sequência rNcSRS57 (sem o peptídeo sinal e sem a âncora GPI) foi clonada em pET32, entretanto apenas um fragmento de 92 pb foi traduzido em relação a sequência clonada de 1074pb, devido a presenca de stop códon oculto. Este evento gerou rNcSRS57 com massa molecular abaixo do esperado (19,5 kDa). NcSRS57 nativa apresentou massa de 43 kDa (predito sem peptídeo sinal e sem âncora GPI 31.14 kDa). Os efeitos inibitórios dos anticorpos policionais anti-rNcSRS67, anti-rNcSRS57 e a associação destes sobre a adesão/invasão de taquizoítas foram investigados in vitro, resultando em uma inibição de 20% para o anticorpo anti-rNcSRS67, 16% para o anticorpo anti-rNcSRS57 e 11% para a associação destes dois anticorpos. NcSRS67 foi localizada sobre parte da superfície de taquizoítas, ao contrário de NcSRS57, que abrangeu toda a área da superfície destes parasitas. Apesar das inúmeras tentativas, as formas nativas de NcSRS67 e NcSRS57 obtidas por eletroforese 2D não foram identificadas por MS/MS. O tratamento de taquizoítas de N. caninum com a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC) específica, seguido de análises por MS/MS também gerou a identificação de proteínas de N. caninum,

dentre elas as proteínas mais abundantes já identificadas no secretoma de *N. caninum*, NcSRS29B (SAG1) e NcSRS29C (SRS2). Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo agregam conhecimentos sobre o parasita *N. caninum* e revelam-se úteis na busca e seleção de novos alvos a serem investigados contra a neosporose.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; Apicomplexa; Proteínas de superfície; Proteínas SRS; NcSRS67, NcSRS57.

ABSTRACT

BEZERRA, M.A. Identification and Characterization of SRS family of surface proteins of the apicomplexan *Neospora caninum*. 2017. 145f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Neospora caninum is an obligate intracellular parasite of the Apicomplexa phylum, closely related to Toxoplasma gondii and responsible for abortion and loss of fertility in cattle, resulting in significant losses in the worldwide livestock. As part of its intracellular cycle, the first interaction of the parasite with the target cell is performed by surface proteins known as SRS superfamily (Surface Antigen Glycoprotein -Related Sequences). SRS or SAG proteins have been subject of intensive research due to their immunodominant pattern, exhibiting great potential as a diagnostic tool and/or vaccine candidates. Currently there are five genes belonging to the SRS family of proteins described in the scientific literature for N. caninum. Two of these genes were isolated from tachyzoites due to their high sera reactivity of infected animals: NcSRS29B (SAG1) and NcSRS29C (SRS2). Therefore, this work was carried out with the aim of characterizing SRS surface proteins, NcSRS57 and NcSRS67. In addition, we have performed an overview of N. caninum GPI anchored proteins in the Nc-1 lineage. Our results showed that; among the apicomplexan homologues, NcSRS67 presented higher identity and similarity with Hammondia hammondi (HHA_450490), while NcSRS57 revealed greater identity and similarity with Toxoplasma gondii (TgSRS57). NcSRS67 and NcSRS57 presented the third major similarity between the homologues involved in the structural alignment. These two SRS proteins have twelve conserved cysteine residues predicted to form six disulfide bonds distributed in two SRS domains (D1 and D2), forming β -sheet sandwiches and α -helices associated with each other. The coding sequence of NcSRS67 (without the signal peptide and without the GPI anchor) was cloned and constitutively expressed in the plasmid pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x}. The native form of NcSRS67 has a molecular mass of 35 kDa (predicted 30.6 kDa without signal peptide and without the GPI anchor). The rNcSRS57 sequence (without the signal peptide and without the GPI anchor) was cloned into pET32, however only a 92 bp fragment was translated in contrast to the cloned sequence of 1074 bp, due to the presence of a hidden stop codon. This event generated rNcSRS57 with molecular mass lower than expected (19.5 kDa). Native NcSRS57 has 43 kDa mass (predicted without signal peptide and without GPI anchor 31.14 kDa). The inhibitory effects of the anti-rNcSRS67 polyclonal antibodies, anti-rNcSRS57 and the association of both on the adhesion/invasion of tachyzoites were investigated in vitro, resulting in a 20% inhibition for the anti-rNcSRS67 antibody, 16% rNcSRS57 and 11% for the association. NcSRS67 was localized on part of the surface of tachyzoites, unlike NcSRS57, which covered the entire surface area of these parasites. Despite of the numerous attempts, native forms of NcSRS67 and NcSRS57 obtained by 2D electrophoresis were not identified by MS/MS. The treatment of *N. caninum* tachyzoites with the specific phospholipase C phosphatidylinositol (PI-PLC) enzyme, followed by MS/MS analysis also generated the identification of *N. caninum* proteins, among them the most abundant proteins already identified in the secretome of *N. caninum*, NcSRS29B (SAG1) and NcSRS29C (SRS2). Thus, the results obtained in this study increase the knowledge of the parasite *N. caninum* and demonstrate to be useful in the search and selection of new targets to be investigated against neosporosis.

Keywords: *Neospora caninum*; Apicomplexa; Surface proteins; SRS proteins; NcSRS67, NcSRS57.

RESUMEN

BEZERRA, M.A. Identificación e Caracterización de proteínas de superficie de la familia SRS de apicomplexa *Neospora caninum*. 2017. 145f. Tesis (Dutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Neospora caninum es un parásito intracelular obligado del filo de Apicomplexa, estrechamente relacionado con Toxoplasma gondii, responsable de abortos y pérdida de fertilidad en el ganado bovino y por lo que genera pérdidas significativas en el ganado mundial. Como parte de su ciclo intracelular, la primera interacción del parásito con la célula huésped se realiza mediante proteínas de superficie conocidas como superfamília SRS (Surface Antigen Glycoprotein - Related Sequences). Las proteínas SRS o SAG han sido objeto de intensas investigaciones debido a su patrón inmunodominante, que representa un gran potencial como herramienta de diagnóstico y/o vacunación. En la actualidad existen cinco genes que pertenecen a la familia de proteínas SRS descritas en la literatura científica para N. caninum, donde dos de ellos se caracterizan por taquizoitos porque son altamente reconocidos por sueros en animales infectados: NcSRS29B (SAG1) y NcSRS29C (SRS2). Por lo tanto, este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de caracterizar proteínas de superficie SRS, NcSRS57 y NcSRS67. Adicionalmente, hemos obtenido un enfoque general de proteínas ancladas GPI de N. caninum en el linaje Nc-1. Nuestro resultado demostró que entre los homólogos apicomplexos, NcSRS67 presentó mayor identidad y similitud con Hammondia hammondi (HHA 450490), mientras que NcSRS57 reveló mayor identidad y similitud con Toxoplasma gondii (TgSRS57). NcSRS67 y NcSRS57 presentó la tercera mayor similitud entre los homólogos implicados en la alineación estructural. Estas dos proteínas SRS han doce conservado residuos de cisteína que por predicción forman seis enlaces disulfuro distribuidos en dos dominios SRS (D1 y D2), formando sándwiches de hoja β y hélices α asociadas entre sí. La secuencia codificante de NcSRS67 (sin péptido señal y sin anclaje GPI) se clonó y se expresó constitutivamente en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO-His6x. La forma nativa de NcSRS67 tiene una masa molecular de 35 kDa (predicho 30,6 kDa sin péptido señal y sin anclaje GPI). La secuencia rNcSRS57 (sin péptido señal y sin anclaje GPI) se clonó en pET32, sin embargo sólo un fragmento de 92 pb se tradujo en relación con la secuencia clonada de 1074 pb, debido a la presencia del codón de parada oculto. Este evento generó rNcSRS57 con una masa molecular inferior al esperado (19,5 kDa). El nativo NcSRS57 tiene una masa de 43 kDa (predicho sin péptido señal y sin anclaje GPI 31,14 kDa). Los efectos inhibitorios de los anticuerpos policionales anti-rNcSRS67, anti-rNcSRS57 y la asociación de ambos en la adhesión/invasión de taquizoitos se investigaron in vitro, resultando en la inhibición del 20% para el anticuerpo anti-rNcSRS67, 16% de rNcSRS57 y 11% para la asociación de estos dos anticuerpos. NcSRS67 se localizó Sobre una parte de la superficie de los taquizoítos, a diferencia de NcSRS57, que cubrió toda la superficie del parásito. A pesar de los numerosos intentos, las formas nativas de NcSRS67 y NcSRS57 obtenidas mediante electroforesis 2D no fueron identificadas por MS/MS. El tratamiento de los taquizoitos de *N. caninum* con la enzima fosfolipasa C fosfatidilinositol (PI-PLC), seguido de análisis MS/MS, también generó la identificadas en el secretoma de *N. caninum*, entre ellas las proteínas más abundantes ya identificadas en el secretoma de *N. caninum*, NcSRS29B (SAG1) y NcSRS29C (SRS2). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio suman conocimientos sobre el parásito *N. caninum* y demuestran ser útiles en la búsqueda y selección de nuevos objetivos a investigar contra la neosporosis.

Palabras claves: *Neospora caninum*; Apicomplexa; Proteínas de superficie; Proteínas SRS; NcSRS67, NcSRS57.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida heteroxênico de <i>N. caninum</i> 4
Figura 2. Etapas envolvidas no processo invasivo do Apicomplexa Toxoplasma
gondii9
Figura 3. Representação esquemática de uma proteína ancorada por
glicosilfosfatidilinositol (GPI)11
Figura 4. Alinhamento cromossômico de N. caninum (acima) com T. gondii (abaixo)
mostrando a sintenia e distribuição dos genes da família SRS e as subfamílias dos
domínios SAG representadas em diferentes cores15
Figura 5. Organização das atividades desenvolvidas22
Figura 6. Construção do plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO
Figura 7. Perfil de gradiente de pH calculado a partir de géis Immobiline DrySTrip em
função do comprimento dos géis para determinação do ponto isoelétrico (pl) de
proteínas representadas através de spots42
Figura 8. Representação esquemática das etapas envolvidas no teste de ancoragem
por glicosilfosfatidilinositol (GPI) da proteína NcSRS57 de Nesopora caninum48
Figura 9. Representação esquemática de um ciclo de seleção de fagos ligantes de
rNcSRS57 a partir de uma biblioteca de bacteriófagos M1350
Figura 10. Representação esquemática de um ensaio ELISA utilizando bacteriófagos
ligantes de rNcSRS5752
Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos de proteínas de superfície
da superfamília SRS/SAG de coccídios55
Figura 12. Sequências de aminoácidos das proteínas NcSRS67 e NcSRS5757
Figura 13. Amplificação por PCR e clonagem do gene NcSRS67 de <i>N. caninum</i> 58
Figura 14. Amplificação por PCR e clonagem do gene NcSRS57 de <i>N. caninum</i> 59
Figura 15. Expressão e teste de solubilidade da proteína recombinante rNcSRS67 60
Figura 16. Expressão e purificação da proteína recombinante rNcSRS67 de N.
caninum61
Figura 17. Expressão da proteína recombinante rNcSRS5762
Figura 18. Representação de parte do fragmento NcSRS57 traduzido em BL2163
Figura 19. Purificação da proteína recombinante rNcSRS5764
Figura 20. Espectro de fragmentação (MS) dos peptídeos trípticos mais intensos
obtidos para a proteína recombinante rNcSRS67 de <i>N. caninum</i>

Figura 21. Identificação da proteína recombinante rNcSRS67 de N. caninum por
MS/MS (score 42)
Figura 22. Análise da proteína recombinante rNcSRS57 de N. caninum por MS/MS
(score 308)67
Figura 23. Avaliação da reatividade do soro policlonal anti-rNcSRS67 por ELISA68
Figura 24. Avaliação da reatividade do anticorpo policional anti-rNcSRS57 por ELISA
Figura 25. Reatividade do soro policional anti-rNcSRS67 com as proteínas nativa e
recombinante rNcSRS6770
Figura 26. Detecção da proteína nativa NcSRS6771
Figura 27. Reatividade do soro policional anti-rNcSRS57 com as proteínas nativa e
recombinante rNcSRS5772
Figura 28. Detecção da proteína nativa NcSRS5773
Figura 29. SDS-PAGE bidimensional (2D) do extrato total de taquizoítas (ET) de N.
caninum e controle de células Vero para detecção da proteína nativa NcSRS6774
Figura 30. Localização por imunofluorescência de NcSRS57 sobre a superfície de
taquizoítas modificados de <i>N. caninum</i> 77
Figura 31. Localização por imunofluorescência de NcSRS67 sobre a superfície de
taquizoítas de <i>N. caninum</i> 78
Figura 32. Localização por imunofluorescência de NcSRS57 sobre a superfície de
taquizoítas modificados de <i>N. caninum</i> 79
Figura 33. Efeito do tratamento de taquizoítas de N. caninum com fosfolipase C
fosfatidilinositol (PI-PLC)80
Figura 34. Análise dos sobrenadantes obtidos a partir do extrato total de taquizoítas
incubados ou não com a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC)81
Figura 35. Ensaio ELISA para determinação de atividade entre fago e a proteína
rNcSRS57
Figura 36. Ensaio de pull down da interação de fagos contendo peptídeos ligantes
de rNcSRS57 com a proteína nativa NcSRS57 de N. caninum
Figura 37. Western blot das amostras obtidas ao ensaio de pull down
Figura 38. Proteínas extraídas de taquizoítas de N. caninum recém-purificados
mediante o tratamento com a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC)87
Figura 39. Proteínas extraídas de taquizoítas descongelados de N. caninum
mediante o tratamento com PI-PLC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers forward (For) e reverso (Rev) para amplificação das sequências
VcSRS67 e NcSRS5725
labela 2. Comparação das sequências de aminoácidos de proteínas de superfície
la superfamília SRS/SAG de coccídios54
Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) dos spots
narcados na figura 29A75
Tabela 4. Proteínas de <i>N. caninum</i> identificadas por espectrometria de massas
Synapt G2) a partir da tripsinização da banda representada na figura 34A, poço 2.

Tabela 6. Proteínas de N. caninum identificadas por espectrometria de massas apartir da tripsinização dos spotsrepresentados na figura 39A89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ACN	Acetonitrila
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CHAPES	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato)
Cys	Cisteína
CPRG	Clorofenolred-β-D-galactopiranoside
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESA	Extrato secretado
ET	Extrato total
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (Glycosylphosphatidylinositol)
His	Cauda de histidinas (6x)
IPG	Immoblized pH Gradient
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KCI	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
LB	Luria-Bertani
LacZ	Gene para β-galactosidase
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de
massas	
MALDI	Ionização e Dessorção a laser Assistida por Matriz
MJ	Junção de movimento (moving junction)
MS	Espectrometria de massas (mass spectrometry)

MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
Nc	Neospora caninum
NL	Não linear
pb	Pares de Bse
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS adicionado de Tween ou Triton x-100
PBS-GT	PBS-T adicionado de gelatina suína
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pCR-Blunt II-TOPO	Plasmídeo de expressão
PDB	RCSB Protein Data Bank
pET28	Plasmídeo de expressão
pET32	Plasmídeo de expressão
pf	Plasmodium falciparum
рН	Potencial hidrogeniônico
pl	Ponto isoelétrico
PS	Peptídeo sinal
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucléico
SAG	Antígeno de Superfície ancorado por GPI (GPI-anchored
surface antigen)	
SRS	Sequências Relacionadas à SAG (SAG-related sequence)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato
de sódio	
SFB	Soro fetal bovino
SUSA	Antígenos de Superfície Não Relacionados à SAG
TAE	Tampão Tris acetato-EDTA
TE	Tris EDTA
TOF	Tempo de vôo (<i>time of flight</i>)
TOP 10	Células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes para clonagem
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UTR	Região não traduzida (untranslated region)
Ve	Célula Vero
VP	Vacúolo parasitóforo

X-Gal	5 -bromo- 4 -cloro- 3 -indol- β -D-galactopiranosida
WB	Western Blot

LISTA DE SÍMBOLOS

Alfa α °C **Graus Celcius** Ampere А cm² Centímetro quadrado Da Dalton g grama gravidade g G_{1/2} Calibre (agulha) GE **General Eletric** h(s) Hora metro m Μ Mol/litro Minuto min U Unidade enzimática UV Ultravioleta V Volt Ω Ohm

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Resumen	v
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	х
Lista de abreviaturas e siglas	xi
Lista de símbolos	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Neospora caninum	2
1.2 Ciclo de vida e trasmissão	3
1.3 Neosporose	6
1.4 Processo invasivo e importância das proteínas de superfície SRSs	8
1.5 Proteínas de superfície ancoradas por glicosilfosfatidilinositol	9
1.5.1 Proteínas GPI em Apicomplexas: superfamília SRS (Surface	Antigen
Glycoprotein – Related Sequence) e proteínas SUSA (SAG-Unrelated	Surface
Antigen)	11
1.5.1.1 Superfamília de proteínas de superfície SRS	12
1.5.1.2 <i>N. caninum</i> : NcSRS57 e NcSRS67	17
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos Gerais	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Delineamento experimental	22
4.2 Cultura in vitro e purificação de taquizoítas de N. caninum	23
4.3 Análise das sequências codificadoras de NcSRS67 e NcSRS57 em N.	caninum
	23

4.4 Procedimentos para clonagem e expressão de rNcSRS67 e rNcSRS57	24
4.4.1 Extração de DNA genômico de <i>N. caninum</i>	24
4.4.2 Clonagem das sequências NcSRS67 e NcSRS57 de <i>N. caninum</i>	24
4.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
4.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose	26
4.4.5 Purificação dos fragmentos NcSRS67 e NcSRS57 a partir de gel de agaro	se 26
4.4.6 Reação de ligação das sequências NcSRS67 e NcSRS57 em plasmídeo	de
clonagem	27
4.4.7 Purificação de plasmídeos selecionados (MiniPreps)	27
4.4.8 Digestad de pGEM-1-easy contendo as sequencias incorso/ e incorso/	20
4.4.9 Sequenciamento	20 28
4.4.11. Transformação por Eletroporação em <i>E. coli</i> Top10, Invitrogen	29
4.4.12 Reação de ligação das sequências NcSRS67 e NcSRS57 em vetores	de
expressão	29
4.4.12.1 Construção de um novo plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO	30
4.4.12.2 Ligação de NcSRS67 em pCR-Blunt II-TOPO	31
4.4.12.3 Ligação de NcSRS57 em pET32	31
4.4.13 Expressão, análise e purificação das proteínas recombinantes rNcSRS67	7 e
rNcSRS57	31
4.4.13.1 Expressão de rNcSRS57	31
4.4.13.2 Expressão de rNcSRS67	32
4.4.13.3 Extrações solúvel e insolúvel das proteínas rNcSRS67 e rNcSRS57	33
4.4.13.4 Purificação das proteínas recombinantes rNcSRS67 e NcSRS57 em resi	ina
de níquel	34
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante	34 33
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante	34 33 34
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policlonais contra as recombinantes rNcSRS67	34 33 34 e
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policlonais contra as recombinantes rNcSRS67 rNcSRS57	34 33 34 e 34
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policlonais contra as recombinantes rNcSRS67 rNcSRS57 4.5.1 Declaração de ética	34 33 34 e 34 34
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policlonais contra as recombinantes rNcSRS67 rNcSRS57 4.5.1 Declaração de ética 4.5.2. Animais	34 33 34 e 34 34 35
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policlonais contra as recombinantes rNcSRS67 rNcSRS57 4.5.1 Declaração de ética 4.5.2. Animais 4.5.3. Imunização de animais para obtenção de anticorpos contra rNcSRS67	34 33 9 34 34 35 e
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policionais contra as recombinantes rNcSRS67 rNcSRS57 4.5.1 Declaração de ética 4.5.2. Animais 4.5.3. Imunização de animais para obtenção de anticorpos contra rNcSRS67 NcSRS57	 34 33 34 e 34 34 34 35 e 35 e 35
de níquel 4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante 4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante 4.5 Produção de anticorpos policlonais contra as recombinantes rNcSRS67 rNcSRS57 4.5.1 Declaração de ética 4.5.2. Animais 4.5.3. Imunização de animais para obtenção de anticorpos contra rNcSRS67 NcSRS57 4.6. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	 34 33 34 e 34 34 35 e 35 35 35

4.8 Eletroforese em Gel de Acrilamida SDS-PAGE	37
4.9 Coloração de gel de acrilamida	38
4.9.1 Coloração por coomassie G	38
4.9.2 Coloração com Nitrato de Prata	38
4.10 Eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 2D)	39
4.10.1 Primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF)	40
4.10.2 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (géis 2D)	40
4.10.3 Estimativa do pl de proteínas	42
4.11 Aquisição de imagens	42
4.12 Wester blot	42
4.13 Espectrometria de massas	43
4.13.1 Digestão de bandas e spots para análise em MALDI	43
4.13.1.1 Análises por MALDI	44
4.13. 2 Digestão de fragmentos de gel para análises por Synapt G2	45
4.13.2.1 Análise por LC-MS/MS (Synapt G2)	45
4.14. Ensaio de invasão/adesão	46
4.15. Imunofluorescência	46
4.16. Teste de ancoragem por GPI de NcSRS57	47
4.17. Panorama geral de proteínas GPI de <i>N. caninum</i>	48
4.18. Amplificação de bacteriófagos ligantes de rNcSRS57	49
4.18.1 Obtenção da cultura de <i>E. coli</i> M91	49
4.18.2 Seleção de bacteriófagos com afinidade a NcSRS57	49
4.18.3. ELISA para avaliação da afinidade dos fagos à rNcSRS57	51
4.18.4. Pull down associado a phage display	52
4.19 Análise estatística	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Análise in silico das sequências NcSRS67 e NcSRS57 de N. caninum	54
5.2 Clonagem de NcSRS67 e NcSRS57	57
5.3 Expressão, teste de solubilidade e purificação das proteínas SRS	59
5.3.1 Expressão, teste de solubilidade e purificação de rNcSRS67	59
5.3.2 Expressão, teste de solubilidade e purificação de rNcSRS57	62
5.4 Identificação das proteínas recombinantes por espectrometria de massas	65
5.4.1 Identificação de rNcSRS67	65

5.4.2 Identificação de rNcSRS5766
5.5 Reatividade dos anticorpos policionais por ensaio imunoenzimático (ELISA)
(ELISA)67
5.5.1 Reatividade do anticorpo policional anti-rNcSRS6767
5.5.2 Reatividade do anticorpo policional anti-rNcSRS5768
5.6 Análise das proteínas NcSRS67 e NcSRS57 por SDS-PAGE, western blot (WB)
1D e 2D, e espectrometria de massas69
5.6.1 Western blotting 1D da proteína NcSRS6769
5.6.2 Western blotting 2D de NcSRS6770
5.6.3 Western blot 1D da proteína NcSRS5771
5.6.4 Western blot 2D de NcSRS5772
5.7 Eletroforese bidimensional (2D) para identificação de NcSRS6774
5.8 Ensaio de invasão/adesão in vitro76
5.9 Localização de NcSRS67 e NcSRS57 em taquizoítas de N. caninum77
5.10 Teste de ancoragem por GPI de NcSRS57 e outras SRSs através da clivagem
com fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC)80
5.11 Seleção de bacteriófagos com afinidade pela proteína rNcSRS5782
5.12 Tentativa de isolamento da proteína NcSRS57 associada a fagos/rNcSRS57.84
5.12.1 Ensaio de <i>pull down</i>
5.12.2 Determinação da Interação entre fagos selecionados por rNcSRS57 com
NcSRS57 nativa através de western blot
5.13 Análise em gel 2D de proteínas de superfície obtidas de taquizoítas de N.
caninum tratados com PI-PLC86
5.13.1 Taquizoítas recém-purificados86
5.13.2 Taquizoítas descongelados
6 DISCUSSÃO
7 CONCLUSÃO
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os últimos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, o rebanho bovino brasileiro chegou a 215,1 milhões de cabeças em 2015, um acréscimo de 2,8 milhões de animais em relação a 2014 (Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa Pecuária Mundial, 2015). Com isso, o Brasil manteve-se como segundo colocado no ranking mundial, atrás apenas da Índia e, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (Neto, 2014; Governo Federal: Portal Brasil, 2015).

Com a abertura de novos mercados mundiais, padrões como qualidade, menor impacto ambiental, rastreabilidade, preço competitivo e a exigência sanitária tornaram-se condições para consolidar a participação no mercado internacional (MICHELS, 2000; LOPES; CARVALHO, 2002; BARROS et al., 2011). Um exemplo de barreira sanitária imposta atualmente sobre a bovinocultura é o combate à febre aftosa, porém com a crescente exigência dos mercados internacionais outras doenças podem potencialmente ser incluídas nas questões sanitárias, além disso, o estudo do impacto econômico de uma doença, como a neosporose, por exemplo, pode identificar o quanto a mesma afeta a rentabilidade do sistema de cria na cadeia produtiva (BARROS et al., 2011).

A neosporose, uma enfermidade causada pelo protozoário coccidio *Neospora caninum*, emergiu como uma importante doença mundialmente conhecida por induzir abortamentos em bovinos, além de acometer diversas outras espécies de animais domésticos e silvestres (DUBEY et al., 1988; GONDIM, 2006; DUBEY et al., 2007; KING et al., 2012). *N. caninum* tem o cão como hospedeiro definitivo e transmissor horizontal do agente ao bovino, que uma vez instalado é transmitido de mãe para filho possivelmente por várias gerações (DUBEY et al., 1988).

Sabe-se que depois dos custos relacionados com a nutrição, a fertilidade é o fator com maior impacto na economia da exploração leiteira (BLOWEY, 1999), sendo a perda da gestação uma das maiores causas de decréscimo da fertilidade (LEE; KIM, 2007). Devido às mortes embrionárias e fetais, são alterados os padrões de produção de leite, ou seja, a produção diminui (CALDOW; GRAY, 2004), aumentam as despesas com diagnósticos, refertilizações, reposição de fêmeas e diminuição

sobre o valor das matrizes infectadas, levando a importantes perdas econômicas no setor de criação bovina (WILLIAMS et al., 2000; TREES et al., 2002; CORBELLINI et al., 2002; DUBEY et al, 2007; PARKINSON, 2009; MARQUES et al, 2011). Uma fêmea infectada com *N. caninum* tem de três a sete vezes mais chances de abortar do que uma fêmea não infectada (QUINTANILLA-GONZALO et al., 2000; DUBEY et al., 2007; WILLIAMS et al., 2009; ALMERIA; LÓPEZ-GATIUS, 2013) e, caso não aborte, o feto pode ser infectado no útero em 80-95% dos casos, já que a transmissão deste parasita ocorre com alta eficiência pela via transplacentária (DAVISON et al., 1999).

Nos últimos dez anos, obstáculos adicionais para o controle da neosporose tornaram-se conhecidos, o que inclui a descoberta de novos hospedeiros (intermediários e definitivos) de *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2004; GONDIM, 2006; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011; Da SILVA ANDRADE et al., 2012; MINERVINO et al., 2012; VILLALOBOS et al., 2012), a possibilidade de outras vias de transmissão do parasita como através do colostro ou do leite das vacas aos seus bezerros (ORTEGA-MORA et al., 2003), ou através do sêmen de touros (MOORE et al., 2003), além das dificuldades no diagnóstico preciso da infecção (GONDIM et al., 2003). Apesar dos avanços imunobioquímicos no estudo de *N. caninum*, ainda não existe uma vacina eficiente para a prevenção da doença (DUBEY et al., 2007; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2012; WESTON et al., 2012).

1.1. Neospora caninum

Neospora caninum é um protozoário parasita intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa e está intimamente relacionado a *Toxoplasma gondii*, devido a suas características genéticas e morfológicas (DUBEY et al., 2006; DUBEY; SCHARES, 2011). Este parasita foi descrito e nomeado apenas em 1988 por Dubey (DUBEY et al., 1988) como um novo gênero e espécie, recebendo a denominação de *Neospora caninum* em referência ao fato de ter sido inicialmente detectado em tecido de cães na Noruega, onde era até então erroneamente diagnosticado como *Toxoplasma gondii* (BJERKAS et al., 1984). Apesar das semelhanças morfológicas e genéticas entre *N. caninum* e *T. gondii*, diferenças fundamentais entre estes dois

parasitas foram posteriormente identificadas no que diz respeito à sua gama de hospedeiros naturais, composição de carboidratos sobre a superfície, características estruturais, antigenicidade, fatores de virulência e patogênese (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2007). Diferenças entre *N. caninum* e *T. gondii* também tem sido descritas usando análises genômicas e transcriptômicas (REID et al., 2012). Ademais, diferentemente de *T. gondii*, *N. caninum* não causa infecção em humanos (MCCANN et al., 2008; SHAAPAN, 2016), embora já tenham sido detectados anticorpos contra este parasita em soros de humanos imunocomprometicos com HIV, pacientes com desordens neurológicas e uma baixa detecção em indivíduos recém nascidos (NAM et al., 1998; TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006).

Há duas décadas, *N. caninum* vem sendo extensivamente investigado devido a sua importância como um patógeno veterinário (DONAHOE et al., 2015). *N. caninum* tem uma distribuição global e pode causar doença neuromuscular em cães e abortamento e mortalidade neonatal em bovinos, resultando em perdas econômicas para as indústrias de corte e de leite (DUBEY et al., 2007; DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL et al., 2013). Há relatos da neosporose bovina em países de todos os continentes (DUBEY et al., 2006). Um cálculo com os dados de dez países comprovadamente afetados (Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Espanha, Estados Unidos, Holanda, México, Reino Unido e Nova Zelândia) estimou uma perda econômica anual média da ordem de US\$ 1,298 bilhão, de modo que dois terços deste montante (U\$ 842,9 milhões) provém da cadeia produtiva do leite (REICHEL et al., 2013).

1.2. Ciclo de vida e transmissão

O ciclo de vida heteroxênico de *N. caninum* (figura 1) envolve canídeos domésticos e selvagens como hospedeiros definitivos (McALLISTER et al., 1998; KING et al., 2012; GOODSWEN et al., 2013) e uma ampla variedade de hospedeiros intermediários incluindo espécies de bovinos (Figura 1, DUBEY et al., 2007; DUBEY; SCHARES, 2011; GOODSWEN et al., 2013). Sabe-se até o momento que há dois modos distintos de reprodução no ciclo de vida deste parasita: reprodução sexuada, a qual está presente apenas em canídeos (hospedeiro definitivo), como o cachorro

(*Canis lapus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), lobo cinzento (*Canis lapus*) (DUBEY et al., 2011) e dingo (*Canis lapus dingo*) (KING et al., 2010); e reprodução assexuada, que ocorre em hospedeiros intermediários como os bovinos (GOODSWEN et al., 2013).

Figura 1. Ciclo de vida heteroxênico de *N. caninum*. O ciclo de vida heteroxênico deste parasita inclui uma replicação sexuada (que ocorre no canídeo: hospedeiro definitivo) e uma replicação assexuada no hospedeiro intermediário (representado nesse caso pelo bovino). (A) No hospedeiro intermediário, a infecção pode ocorrer horizontalmente através da ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos contendo esporozoítas previamente liberados nas fezes de canídeos infectados agudamente; ou (B) verticalmente da mãe para o feto através da placenta (GOODSWEN et al., 2013). Altamente eficiente (MORÉ et al., 2009), a transmissão transplacentária pode ser exógena quando os oocistos infecciosos são ingeridos durante a gravidez ou endógena devido à recrudescência de uma infecção persistente (TREES; WILLIAMS, 2005). (C) Após a fase de proliferação rápida, N. caninum diferencia-se no estágio de bradizoítas guiescentes que residem nos cistos teciduais intracelulares, estabelecendo infecções de longos períodos (PIERGILI FIORETTI et al., 2003). (D) Durante a gestação, modificações na resposta imune da mãe favorecem a reativação do parasita e a reconversão de bradizoítas em taquizoítas, os quais podem atravessar a placenta e gerar uma infecção fetal (INNES, 2007). (E) A recrudescência de uma infecção persistente com transmissão vertical pode ocorrer sobre gestações consecutivas e pode resultar em abortamento ou no nascimento de bezerros saudáveis, mas congenitamente infectados (WILLIAMS et al., 2009). (F) Por fim, o ciclo de vida é completado quando cistos teciduais contendo bradizoítas, presentes nos tecidos do hospedeiro intermediário, são ingeridos por um hospedeiro definitivo carnívoro (GUIDO et al., 2016).



Fonte: Ilustração adaptada de GUIDO et al., 2016.

Durante o ciclo de vida deste parasita há três estágios até então descritos: esporozoítas em oocistos (figura 1A), taquizoítas (figura 1B) e bradizoítas em cistos teciduais (figura 1F). Os oocistos são excretados nas fezes dos cães (figura 1A) após a ingestão de N. caninum na forma de bradizoítas (figura 1F), tornando-se infecciosos em poucos dias (BUXTON et al., 2002). Estes oocistos correspondem à forma de resistência deste parasita no ambiente (DONAHOE et al., 2015). São presumivelmente gerados pela replicação sexual nas células epiteliais do intestino do hospedeiro definitivo e expelido nas fezes em uma forma não esporulada (não infecciosa), embora os estágios sexuais entero-epiteliais no trato alimentar do canídeo ainda não tenham sido conclusivamente demonstrados (DUBEY et al., 2004). Fora do hospedeiro, os oocistos sofrem esporulação em 24 a 72 horas e desenvolvem dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítas, tornando-os oralmente infecciosos (DUBEY et al., 2006; 2007; REICHEL et al., 2007). A infecção do hospedeiro intermediário pode ocorrer quando os oocistos esporulados são ingeridos (figura 1A, DONAHOE et al., 2015). Já no trato gastrointestinal, os esporozoítas são liberados е parasitam inicialmente células intestinais transformando-se em taquizoítas (figura 1B, HEMPHILL et al., 2006).

Os taquizoítas pertencem ao estágio de multiplicação rápido de *N. caninum*, capazes de infectar uma ampla variedade de células nucleadas, incluindo células mononucleares que ajudam na disseminação do parasita via tráfego de leucócitos (DUBEY et al., 2006; HEMPHILL et al., 2006). Durante a fase aguda da infecção, os taquizoítas podem ser encontrados em virtualmente todos os tecidos do hospedeiro. É durante este estágio que ocorrem os ciclos progressivos de replicação intracelular, lise das células infectadas, liberação de taquizoítas e infecção de células circulantes, podendo dar início a sequelas imunopatológicas, e em alguns animais, doença clínica (DUBEY et al., 2007). Em um hospedeiro imunocompetente, os taquizoítas replicam-se por cerca de 20 vezes antes de se diferenciarem em bradizoítas, o estágio de vida quiescente do parasita, que é formado sob pressão do sistema imune do hospedeiro e que produz um cisto tecidual (GOODSWEN et al., 2013).

Os cistos teciduais protegem os bradizoítas de fatores imunológicos e propiciam a persistência do parasita por longos períodos, gerando infecções assintomáticas crônicas (figura 1C) (HEMPHILL et al., 2006; DUBEY et al., 2007; DUBEY;SCHARES, 2011). A recrudescência da infecção (figura 1D) pode ser

alterada por mudanças no *status* imune do hospedeiro (imunomodulação ou imunossupressão), podendo resultar na reativação de bradizoítas (figura 1F) e conversão para taquizoítas (figura 1B) (HEMPHILL et al., 2006). Este evento é bem documentado em animais gestantes e permite a propagação de taquizoítas para outros tecidos, incluindo a sua disseminação através da placenta e infecção do feto (figura 1E) (WILLIAMS et al., 2009).

A infecção natural de N. caninum ocorre via transmissão horizontal ou vertical (DUBEY et al., 2007). A transmissão vertical (também denominada de transmissão transplacentária ou congênita) é o modo predominante no bovino (DONAHOE et al., 2015). Duas formas de transmissão vertical são conhecidas: transmissão exógena ou endógena (TREES; WILLIAMS, 2005; WILLIAMS et al., 2009). A transmissão exógena ocorre após a ingestão de oocistos pelo gado e está associado a uma série de abortamentos epidêmicos em um rebanho (WILLIAMS et al., 2009). A transmissão endógena acompanha a recrudescência da infecção em uma vaca persistentemente infectada durante a gravidez. É o principal mecanismo responsável pela manutenção do parasita dentro dos rebanhos, resultando em taxas de transmissão fetal de até 95% (DUBEY et al., 2006; WILLIAMS et al., 2009; REICHEL et al., 2013), podendo passar a infecção por gerações consecutivas de seus descendentes (DUBEY; SCHARES, 2006; DUBEY et al., 2006). No hospedeiro definitivo canídeo e outros carnívoros, a transmissão horizontal pode resultar da ingestão de tecidos provenientes dos hospedeiros intermediários infectados contendo cistos teciduais ou da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados (DUBEY et al., 2006, 2007). Já no hospedeiro intermediário a transmissão horizontal também pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos contendo esporozoítas previamente eliminados nas fezes de canídeos infectados (GOODSWEN et al., 2013).

1.3. Neosporose

A principal forma evolutiva de *N. caninum* que causa a infecção aguda da neosporose no hospedeiro intermediário é o taquizoíta, disseminado através da corrente sanguínea e sistema linfático (GOODSWEN et al., 2013). Estes taquizoítas são capazes de invadir vários tipos de células nucleadas onde se multiplicam por um

processo denominado de endodiogenia (isto é, um mecanismo de reprodução assexuada no qual duas células progenitoras são originadas a partir de uma célula mãe). As células altamente infectadas são então rompidas, liberando taquizoítas de *N. caninum*, o estágio de multiplicação rápida, que posteriormente se disseminam e infectam outras células (GUIDO et al., 2016).

Assim como outras infecções que também causam abortamento ao redor do mundo, como por exemplo, a brucelose (STEVENS et al, 1994; CORBEL, 1997) e leptospirose (MARTINS et al, 2012), *N. caninum* também tem sido identificado como um dos principais abortifacientes. Dessa forma, este parasita tem sido responsável por grandes perdas econômicas refletidas em perda da qualidade genética do rebanho, tornando assim as práticas de manejo do rebanho infectado diferentes daquelas verificadas ao redor do mundo (REICHEL et al., 2013). Estes fatores acabam comprometendo, consequentemente, as atividades de nutrição e produção de leite (kg/dia) (REICHEL et al., 2013). Embora a maioria do rebanho infectado tenha uma gestação normal, por outro lado, aqueles animais infectados são mais susceptíveis do que os não infectados, principalmente se as matrizes forem infectadas pela primeira vez no início da gestação (GOODSWEN et al., 2013; HORCAJO et al., 2016).

A transmissão horizontal de *N. caninum* envolvendo oocistos parece ocorrer raramente na natureza (HALL et al., 2005), embora a compreensão do ciclo de vida deste parasita seja inconsistente com a ampla distribuição e alta prevalência de infecções na natureza (AL-QASSAB et al., 2010). Por outro lado, a transmissão vertical de *N. caninum* é altamente eficiente e também o maior modo de transmissão deste parasita em bovinos (BARR et al., 1993; SCHARES et al., 1998; HIETALA; THURMOND, 1999). Dessa forma, uma alta proporção de vacas infectadas transmite a infecção para sua prole, a qual é responsável pela sustentação do nível da infecção no rebanho (WILLIAMS et al., 2009). Embora o mecanismo preciso da transmissão vertical (que ocorre através da placenta) ainda seja pouco compreendido, sabe-se, entretanto, que os taquizoítas migram da mãe infectada para o feto através da placenta, podendo causar infecção fetal e consequentemente, levar ao abortamento (GOODSWEN et al., 2013).

1.4. Processo invasivo e importância das proteínas de superfície SRSs

O filo Apicomplexa compreende um grande grupo de protozoários parasitas causadores de doenças em humanos e animais. A denominação deste filo está relacionada à região apical dos parasitas que contém organelas ou estruturas importantes envolvidas na invasão e desenvolvimento na célula hospedeira, denominadas de roptrias, micronemas, conóide e anel polar (GROCKIEGO; SCHWARZ, 2010). Os apicomplexas, por serem intracelulares obrigatórios, invadem as células hospedeiras por um mecanismo conservado e bem-sucedido, utilizandose de uma motilidade dependente de substrato chamada de gliding ou "deslizamento", havendo a participação de filamentos de actina dentro do parasita (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; WETZEL et al., 2003; SANTOS et al., 2009; BARGIERI et al., 2014; HEINTZELMAN, 2015). A invasão da célula hospedeira pelo estágio infectante do Apicomplexa é composta por um processo multifatorial (ilustrado na figura 2). A interação inicial entre o parasita e a célula alvo é intermediada por proteínas de superfície da família SRS (Surface Antígen Glycoprotein – Related Sequences) (HOWE; SIBLEY, 1999; LEKUTIS et al., 2001; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007) que será detalhada no próximo item. Após a interação inicial, ocorre a liberação de proteínas das micronemas, o que possibilita a reorientação e formação de ligações mais rígidas com moléculas do hospedeiro e ligação com o motor de actina/miosina do parasita, o qual fornece a força de direcionamento para a invasão da célula hospedeira (MEISSNER et al., 2002; KEELEY, SOLDATI, 2004; HUYNH et al., 2006; SANTOS et al., 2009; LENDNER; DAUGSCHIES, 2014; HEINTZELMAN, 2015; BICHET et al., 2016). A entrada do parasita ocorre após a secreção de proteínas das roptrias (RONs e ROPs), resultando na junção de movimento (MJ), que funciona como uma forquilha para a entrada do parasita na célula e forma o vacúolo parasitóforo, no qual o parasita reside (ALEXANDER et al., 2005; KESSLER et al., 2008; LOURIDO et al., 2010; BARGIERI et al., 2014). Devido a sua natureza única, este processo de invasão tem atraído uma grande quantidade de pesquisas, uma vez que fornece possibilidades para a identificação de potenciais componentes/alvos para o desenvolvimento de novas vacinas e/ou drogas antiparasitárias (SHEN; SIBLEY, 2012).

Figura 2. Etapas envolvidas no processo invasivo do Apicomplexa Toxoplasma gondii O processo multifatorial se inicia com o reconhecimento pelas proteínas de superfície do taquizoíta (ex. SAG1) e hospedeiro (1). A liberação das proteínas micronêmicas (MICs) possibilita a ligação entre ligantes e o motor de actina/miosina (MyoA) (2). O inicio da invasão ocorre com a interação entre as proteínas das roptrias (RONs e ROPs) e o antígeno de membrana apical (AMA1), formando a junção de movimento (MJ) (3) e o vacúolo parasitóforo (4) e (5). Por fim, o parasita é liberado da junção pela clivagem das proteínas micronêmicas pelas rombóides (6) e (7).



Fonte: adaptado de CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007.

1.5. Proteínas de superfície ancoradas por glicosilfosfatidilinositol

No centro do processo de invasão multifatorial, como parte do ciclo intracelular de *N. caninum*, está o estabelecimento entre a primeira interação do parasita com a célula hospedeira, realizado por proteínas de superfície da superfamília SRS ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (JUNG et al., 2004; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Sabe-se que *N. caninum* e *T. gondii* possuem genomas similares com genes altamente conservados com correspondência entre a maioria dos genes codificadores dessas proteínas de superfície no mesmo cromossomo.
Dessa forma, a superfície destes dois apicomplexas é revestida por uma família extensa de proteínas SRS podendo atuar como adesinas, cuja expressão é regulada de acordo com os estágios de desenvolvimento (REID et al., 2012). Como uma característica em comum, as proteínas dessa superfamília SRS contém uma âncora de GPI para adesão à membrana do parasita (JUNG et al., 2004; CRAWFORD et al., 2009). Este tipo de ancoragem C-terminal representa a forma de glicosilação mais comum em *Plasmodium* spp (GILSON et al., 2006). GPI é uma estrutura glicolipídica altamente complexa que se liga covalentemente a proteínas como uma modificação pós-traducional, levando à ancoragem da proteína à parte externa da membrana plasmática, sendo capaz de mediar diversas funções biológicas (figura 3) (MAEDA; KINOSHITA, 2011; DEO et al., 2013; HEIDER et al., 2016).

A estrutura principal da âncora GPI é razoavelmente conservada, contendo um ligante de fosfoetanolamina localizado na região C terminal da proteína e que está acoplado a um núcleo glicano constituído majoritariamente por resíduos de manose, glucosamina e inositol, compreendendo dessa forma o grupo principal do fosfolípido (figura 3). Entretanto, os resíduos de ácidos graxos podem variar significativamente, assim como as cadeias laterais de carboidratos (HEIDER et al., 2016). Essas proteínas ancoradas por GPI podem ser isoladas da membrana com sua âncora intacta a partir da clivagem enzimática, ou seja, através da ação de fosfolipases fosfoinositol específica B ou C (SHAROM; RADEVA, 2004). Além disso, a âncora de GPI pode mediar a associação das proteínas com esfingolipídeos especializados e microdomínios lipídicos ricos em colesterol (FUGITA; JIGAMI, 2008; LEVENTAL et al., 2010). As famílias de genes que também possuem âncora GPI, como VAR em Plasmodium falciparum e VSG em Trypanossoma brucei, expressam proteínas de forma seriada, ao contrário das SRS que possuem uma expressão regulada de acordo com seu estágio de desenvolvimento, sem sobreposição de expressão (JUNG et al., 2004; REID et al., 2012).

Figura 3. Representação esquemática de uma proteína ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI). A região C terminal da proteína está ligada a três resíduos de manose (Man) através da fosfoetanolamina seguida por glucosamina (GlcN) e a fosfoinositol (Ins) transportando os resíduos lipofílicos. O asterisco indica os possíveis sítios de cadeias adicionais e a seta indica o sítio de clivagem de fosfolipase fosfoinositol específica.



Fonte: adaptado de HEIDER et al., 2016.

1.5.1 Proteínas GPI em Apicomplexas: superfamília SRS (Surface Antigen Glycoprotein – Related Sequences) e proteínas SUSA (SAG-Unrelated Surface Antigen)

Em diversos Apicomplexas como *T. gondii*, *N. caninum*, *Cystoisospora suis* e *Sarcocystis neurona*, o grupo de proteínas contendo peptídeo sinal e âncora GPI é conhecido como superfamília SRS (**S**urface Antigen Glycoprotein – **R**elated **S**equences), anteriormente chamadas de proteínas SAG (**S**urface **A**ntigen **G**lycoprotein, JUNG et al., 2004; BLAZEJESKI et al., 2015; PALMIERI et al., 2017). Até 2008 acreditava-se que esta superfamília de proteínas era a única ancorada por GPI sobre a superfície destes apicomplexas. Entretanto uma investigação de Pollard

et al. (2008), revelou uma nova família de proteínas de superfície ancoradas por GPI, mas não relacionadas às proteínas SAG, a qual recebeu o nome de SUSA (do inglês SAG-unrelated surface antigens). Em T. gondii foram identificados 31 membros dessa nova família de proteínas SUSA, de modo que 10 deles encontramse localizados no cromossomo VI, 3 no cromossomo IX e o restante distribuídos no cromossomo XII, todos eles encontrados na forma taquizoíta (POLLARD et al., 2008). Uma investigação mais abrangente de Reid et al. (2012) envolvendo um estudo de bioinformática comparativo entre o genoma de N. caninum e T. gondii revelou não só os membros da família SUSA já identificados por Pollard et al. (2008), mas também a presença destes membros no genoma de N. caninum. Em N. caninum ocorre o mesmo número de genes SUSA distribuídos nos cromossomos VI, IX e XII, não tendo sido detectada a presença de pseudogenes como nos cromossomos VI e XII de T. gondii (REID et al., 2012). Essa família de proteínas de superfície provavelmente possui um papel tão importante quanto as proteínas da superfamília SRS, entretanto são necessários mais estudos, principalmente funcionais para poder avaliar melhor sua relevância. Já as proteínas da superfamília SRS medeiam o contato inicial entre o parasita e a célula hospedeira, permitindo o prosseguimento da invasão celular a qual deve ocorrer em 15-30 segundos para possibilitar a sobrevivência do parasita (JUNG et al, 2004). Além disso, existem evidências de que as SRSs poderiam modular a resposta imune (LEKUTIS et al, 2001) e regular a expressão diferencial de seus genes de acordo com o estágio evolutivo a fim de assegurar a persistência em seu hospedeiro (KIM et al, 2005; REID et al., 2012).

1.5.1.1 Superfamília de proteínas de superfície SRS

Um estudo de bioinformática usando o genoma de *T. gondii* da linhagem Me49 tipo II identificou 161 sequências com homologia significante à superfamília de antígenos de superfície ancorados por GPI em *Toxoplasma* (JUNG et al., 2004). A partir destes resultados houve a percepção de que a superfície deste Apicomplexa era consideravelmente mais complexa do que se imaginava (JUNG et al., 2004; WASMUTH et al., 2012). A combinação deste estudo com outras pesquisas de sequências expressas em um banco de dados de *Toxoplasma gondii* (EST) (KISSINGER et al., 2003), revelou não só a presença de ortólogos SRS em outros gêneros coccidianos, incluindo *Neospora* e *Sarcocystis* (HOWE et al., 1998, 2008; REID et al., 2012; WASMUTH et al., 2012), como também níveis de expressão relativa e distribuição dessas proteínas SRSs entre diferentes formas evolutivas de *T. gondii* (WASMUTH et al., 2012; HEHL et al., 2015). Análises através de EST, composta de uma mistura de cDNAs de diferentes formas evolutivas de *T. gondii*, identificaram padrões de expressão gênica estágio-específicas em relação a um amplo número de sequências SRSs (WASMUTH et al., 2012). Onze genes tiveram sua expressão relacionadas a taquizoítas, enquanto que quatro aparentemente ficaram restritos a bradizoítas e apenas SRS28 (SporoSAG) foi verificado em esporozoítas. Embora a expressão estrita de um gene SRS a um estágio particular do parasita pareça ser o padrão dentro desta superfamília de genes, há também uma exceção: o gene SRS25 é abundantemente expresso em taquizoítas e esporozoítas (WASMUTH et al., 2012).

Recentemente Hehl et al. (2015) mostraram diferenças existentes durante a expansão assexuada entre as formas merozoíta e taquizoíta de T. gondii. Este estudo demonstrou não só a distribuição regulada de genes SRSs dependente de estágio específico, como também uma distribuição não sobreposta de sequências SRSs na forma merozoíta de T. gondii. Análises das sequências codificadoras de 111 membros da superfamília SRS anotadas no ToxoDB (versão 8.1), reguladas durante aforma merozoíta, revelaram que mais de 52 membros desta família estavam presentes em merozoítas, enquanto que um grupo separado de 14 genes SRS foram expressos exclusivamente em taquizoítas (HEHL et al., 2015). Embora a função precisa desta superfamília de proteínas de superfície ainda continue desconhecida, sabe-se que as proteínas SRS estão envolvidas na adesão a célula hospedeira, mas que também provocam reações imunes e regulam a virulência do parasita (HEHL et al., 2015). Essas estratégias são promovidas com intuito de promover a formação de cistos teciduais nos hospedeiros intermediários e consequentemente estabelecer uma infecção latente e persistente que facilite a transmissão ao hospedeiro definitivo (HEHL et al., 2015). Análises tem mostrado que taquizoítas de T. gondii expressam diferencialmente um número de genes SRS (WASMUTH et al., 2012), e que esta diferença de expressão tem sido postulada de acordo com a habilidade de seu estágio ao invadir uma ampla variedade de células hospedeiras em relação a outros coccídeos (REID et al., 2012). Entretanto, merozoítas, os quais infectam apenas um único tipo de célula (o enterócito de felino), expressam co-dominantemente um amplo repertório de proteínas SRS de maneira dependente de seu estágio (HEHL et al., 2015). Isso pode sugerir que genes SRS restritos a merozoítas sejam menos relevantes à adesão e invasão nos enterócito, mas por outro lado, promovam o desenvolvimento e fertilização do gameta. Dada a habilidade demonstrada de proteínas SRS para promover respostas imunes, é possível que estas tenham uma função sobre a estimulação da inflamação intestinal e diarreia, para facilitar a produção e dispersão de oocistos (HEHL et al., 2015).

A análise da distribuição dos genes SRSs no genoma de *N. caninum* e *T. gondii* (figura 4) permite visualizar as subfamílias presentes em cada gene, se o gene é sintênico, ou seja, se também está presente em *T. gondii*, e o seu posicionamento dentro do cromossomo. A partir deste alinhamento cromossômico entre *N. caninum* NcLIV e *T. gondii* Me49, Reid et al. (2012) descreveram a família gênica SRS mais numerosa em *N. caninum* do que em *T. gondii*, com um total de 246 genes e 52 pseudogenes SRSs em *N. caninum*, comparado aos 109 genes e 35 pseudogenes verificados em *T. gondii* Me49, 90 genes e 57 pseudogenes em *T. gondii* GT1 e 91 genes com 67 pseudogenes na linhagem *T. gondii* VEG (REID et al., 2012; WASMUTH et al., 2012; BLAZEJEWSKI et al., 2015). Além disso, foi verificado que um único gene SRS (SRS16 (BSR4)) de *N. caninum* é expresso em um *locus* multigênico, ao passo que em *T. gondii* foram frequentemente encontrados vários (REID et al., 2012; ADOMAKO-ANKOMAH et al., 2014).

Um gene SRS consiste tipicamente de um peptídeo sinal predito, um ou dois domínios SAG, com cada domínio dispondo de 4 ou 6 resíduos de cisteína invariantes que formam pontes dissulfeto, e uma âncora GPI para ligação com a superfície do parasita (MANGER et al, 1998). Os domínios SRS foram inicialmente classificados em duas famílias de acordo com suas similaridades hierárquicas em relação às proteínas altamente abundantes SRS29B (anteriormente denominada de SAG1) e SRS34A (anteriormente denominada de SAG2A). A família SRS34A foi dividida em subfamílias de 1 a 6 (fam1 a fam6) de acordo com a similaridade de sequências entre seus domínios. Já a família SRS29B foi dividida em subfamílias 7 e

14

8 (fam7 e fam8), também de acordo com a similaridade existente entre seus domínios (figura 4, WASMUTH et al., 2012).

Figura 4. Distribuição dos genes da família SRS no cromossomos de Neospora caninum e Toxoplasma gondii. Alinhamento dos cromossomos de *N. caninum* (acima) com *T. gondii* (abaixo) mostrando a sintenia e distribuição dos genes da família SRS e as subfamílias dos domínios SAG representadas em diferentes cores (famílias 1 a 8). A seta azul representa o gene NcSRS57 com seu ortólogo em *T. gondii* e a seta laranja corresponde ao gene NcSRS67, já identificado no extrato secretado (ESA) de *N. caninum*.



Fonte: modificado de REID et al., 2012.

Sabe-se que as subfamílias 7 e 8, representadas pelas cores azul e vermelho na figura 4, predominam nos genes SRS de *N. caninum* e *T. gondii* (REID et al., 2012; BLAZEJEWSKI et al., 2015). Estudos prévios de *T. gondii* sugerem que proteínas fam7 e fam8 modulam a resposta imune e medeiam funções críticas na virulência do parasita (BLAZEJEWSKI et al., 2015). Além disso, *Toxoplasma* e *Neospora* são capazes de recrudescerem sua infecção após encistamento, e a expansão de proteínas SRS com domínios fam7 e fam8 capaz de alterar a imunidade protetiva hospedeira pode agir aumentando a carga parasitária do cisto ou alterar o comportamento do hospedeiro intermediário, promovendo a transmissão do parasita ao hospedeiro definitivo para completar seu ciclo (BLAZEJEWSKI et al., 2015).

Embora o papel biológico exato da família gênica SRS ainda seja pouco conhecido, o espectro de funções dessas proteínas tem levantado hipóteses de que a superfamília SRS esteja envolvida em subgrupos distintos, atuando como adesinas (SRS57), modulando a resposta imune (SRS34A) ou ainda possuindo alguma forma de atividade dupla (SRS29B) (WASMUTH et al., 2012). De fato, as proteínas específicas de taquizoítas SRS29B, SRS34A e SRS29C são capazes de estimularem a produção de altos níveis de anticorpos durante a fase aguda da infecção (LEKUTIS et al., 2001; WASMUTH et al., 2012). Análises iniciais com anticorpos monoclonais produzidos contra SRS29B (SAG1) e SRS34A (SAG2) em T. gondii já mostravam que o anticorpo produzido contra SRS29B inibia a adesão dos taquizoítas em cultura de células (GRIMWOOD; SMITH, 1992; MINEO et al., 1993). Por outro lado, a incubação de T. gondii com anticorpos produzidos contra SRS34A aumentou a adesão de taquizoítas à célula hospedeira (GRIMWOOD; SMITH, 1996), sugerindo assim, que essas proteínas SRS não eram funcionalmente idênticas (LEKUTIS et al., 2001). Análises com mutantes nocaute para SRS29B obtidos por recombinação homóloga revelaram uma dependência de tempo duas vezes maior para invadirem a célula hospedeira em comparação com parasitas complementados com SRS29B e controles da linhagem virulenta RH de T. gondii (LEKUTIS et al., 2001).

Mais recentemente, Wasmuth e colaboradores (WASMUTH et al., 2012), priorizaram a investigação funcional de nove genes (SRS17A, SRS17B, SRS25, SRS29B, SRS29C, SRS33, SRS34A, SRS16C e SRS35) para determinar sua função sobre a virulência da linhagem RH de *T. gondii*. Estes autores observaram um aumento substancial sobre a expressão da proteína SRS29C em mutantes nocaute duplo para SRS29B e SRS34A. Observou-se também que camundongos infectados com parasitas nocaute para SRS29B⁻ ou SRS34⁻A exibiram um aumento do tempo de sobrevivência, com um animal sobrevivente, relativo aos animais infectados com parasitas selvagens, onde todos morreram entre os dias 11 e 12. Os mesmos parasitas nocaute duplo (SRS29B e SRS34A), apresentaram uma virulência significativamente atenuada (WASMUTH et al., 2012).

Atualmente existem cinco genes pertencentes à superfamília SRS descritos em *N. caninum*, dos quais dois foram caracterizados de taquizoítas por serem muito imunogênicos e altamente reconhecidos por soros de animais infectados: NcSAG1 e NcSRS2 (também denominada de NcSRS29C) (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 1996; HOWE et al., 1998, NISHIKAWA et al, 2002; REID et al., 2012; WASMUTH et al., 2012) e três descritos a partir de bradizoítas de *N. caninum*: SAG4, BSR4 e SRS9 (FERNANDEZ-GARCIA et al, 2006, RISCO-CASTILLO et al, 2007, 2011). A nomenclatura dos genes SRS foi amplamente revisada após a análise dos genomas de *T. gondii* e *N. caninum*, e atualmente, considera-se SAG1 como SRS29B, SRS2 como SRS29C, BSR4 como SRS16C e SAG4 como SRS35A (REID et al, 2012).

1.5.1.2 N. caninum: NcSRS57 e NcSRS67

O antígeno de superfície SRS57 (ID NcLIV_060660) pertencente a superfamília de proteínas de superfície SRS, anteriormente denominado de SAG3, encontra-se localizado no cromossomo XII de *N. caninum* e *T. gondii*, dispondo de um peptídeo sinal e dois domínios SRS (MANGER et al., 1998; GAJRIA et al., 2008; REID et al, 2012) (figura 4, indicado pela seta de cor azul), podendo ocorrer nas formas taquizoíta e bradizoíta em *T. gondii* (MAEDA; KINOSHITA, 2011; DEO et al., 2013; KHANALIHA et al., 2014). Estudos prévios com *T. gondii* demonstraram claramente que a proteína de superfície SRS57(SAG3) é importante para adesão à célula hospedeira (DZIERSZINSKI et al., 2000). Mutantes de *T. gondii* nocautes para SRS57 (SAG3), resistentes à cloranfenicol, apresentaram uma redução de duas vezes a sua invasão em células hospedeiras quando comparados com parasitas selvagens (DZIERSZINSKI et al., 2000). Além disso, estes mutantes mostraram uma

infectividade atenuada, com uma redução sobre sua capacidade de causar mortalidade em camundongos, uma vez que parasitas selvagens e mutantes complementados que passaram a expressar SRS57 foram letais na mesma dose (DZIERSZINSKI et al., 2000). Dessa forma, estes resultados sugeriram que a proteína SRS57 atua como um membro do sistema de receptores de *T. gondii* agindo como ligantes, mediando o reconhecimento e adesão à célula hospedeira (DZIERSZINSKI et al., 2000; CONG et al., 2013). Trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013) identificou o antígeno SRS57 no extrato secretado de taquizoítas de *N. caninum*, com abundância relativa significativa, um fato importante para averiguar a importância dessa proteína de superfície no mecanismo de invasão deste parasita, uma vez que os dados a respeito deste antígeno de superfície em *N. caninum* ainda são totalmente desconhecidos.

Além da proteína NcSRS57, outros antígenos de superfície pertencentes à superfamília SRS também foram identificados no extrato secretado de taquizoítas de *N. caninum*, como por exemplo, a proteína NcSRS67 (ID NcLIV_060700) (indicada pela seta de cor laranja, figura 4), também dispondo de um peptídeo sinal, dois domínios SRS e uma âncora GPI (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013; GAJRIA et al., 2008). O gene codificador deste antígeno está localizado apenas no cromossomo XII de *N. caninum* e *Hammondia hammondi*, não possuindo dessa forma sintenia de conservação em *T. gondii*, um fato interessante que desperta o interesse para investigar a sua sua importância sobre a adesão e invasão de *N. caninum* à célula hospedeira. Dessa forma, em virtude da amplitude da superfamília SRS em *N. caninum* (REID et al., 2012) e sua importância sobre o estabelecimento e virulência da infecção, estes dois antígenos de superfície foram abordados nesta tese.

2. JUSTIFICATIVA

A neosporose é uma doença amplamente difundida em bovinos, cuja ausência de métodos efetivos contra o seu agente etiológico, o parasita Apicomplexa *Neospora caninum*, tem gerado sérios impactos no desempenho econômico das indústrias de leite e carne bovina (REICHEL; ELLIS, 2006; DUBEY et al., 2007), com perdas econômicas atribuídas em milhões de dólares (REICHEL; ELLIS, 2009; REICHEL et al., 2013; HORCAJO et al., 2016). Diante disso, análises econômicas

sugerem que a via vacinal possa ser a medida que apresente os menores custos efetivos no controle da neosporose (REICHEL; ELLIS, 2006), evitando a infecção, proliferação e o principal prejuízo gerado pela doença, o abortamento (INNES; VERMEULEN, 2006). A única vacina comercial desenvolvida contra esta doença (Bovilis Neoguard[®]) foi feita a partir de parasitas mortos. Porém um estudo com mais de dois mil bovinos sob condições controladas e em campo constatou uma eficácia média de 25% da vacinação (com variação de 60% até efeito negativo) (WESTON et al., 2012). Como consequência, após pouco mais de 10 anos de vida, a única vacina contra *N. caninum,* Bovilis Neoguard[®], foi retirada do mercado.

Diferentes abordagens investigativas com resultados mais promissores têm sido alcançadas através de vacinas envolvendo parasitas atenuados. Vacinas de subunidades têm sido estudadas e muitas delas abrangem componentes que estão funcionalmente envolvidos na interação física entre o parasita e sua célula hospedeira durante o processo de invasão. Neste contexto, a chave para o sucesso na prevenção da transmissão vertical pode residir na aplicação de compostos bioativos que possam limitar a proliferação e disseminação de parasitas de N. caninum, como por exemplo, a descoberta de moléculas proteicas diretamente relacionadas à invasão celular deste parasita. A clonagem e caracterização de genes que expressam proteínas de superfície da superfamília SRS em N. caninum tem sido importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na transformação e evasão da resposta imune deste parasita (RISCO-CASTILLO et al., 2011). Proteínas de superfície Apicomplexas são frequentemente em imunodominantes e de particular interesse como ferramenta de diagnóstico e/ou antígenos empregados potenciais candidatos vacinais como (BULOW; BOOTHROYD, 1991; LUNDEN et al., 1997). Sabe-se que as SRS possuem uma função crítica durante a entrada do parasita na célula hospedeira (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 1996; NISHIKAWA et al., 2000), e na manutenção deste em tecidos do hospedeiro (KIM; BOOTHROYD, 2005; KIM et al., 2007). Dessa forma, a investigação de proteínas de superfície da família SRS contribui para o entendimento e compreensão da função dessas proteínas em N. caninum e, como consequência, no filo Apicomplexa. Abordagens dessa natureza podem gerar possíveis alvos terapêuticos para o combate da neosporose, uma vez que essa parasitose ainda não possui um tratamento eficaz dos seus hospedeiros, gerando

prejuízos financeiros aos produtores de bovinos leiteiros e de corte (REICHEL et al., 2013; GUIDO et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

 Caracterizar proteínas com domínios SRS em *N. caninum*, especificamente as proteínas NcSRS67 e NcSRS57;

2) Obter panorama geral de proteínas com domínio GPI de N. caninum.

3.2 Objetivos Específicos

1) Analisar *in silico* as proteínas NcSRS67 e NcSRS57 com homólogos de outros Apicomplexas;

2) Clonar e expressar de forma heteróloga os genes NcSRS67 (ID NcLIV_060700) e NcSRS57 (ID NcLIV_060660) com domínios SRS;

 Detectar por *western blot* 1D e 2D as proteínas nativas NcSRS67 e NcSRS57 e identificá-las por espectrometria de massas;

 Investigar através de ensaio de adesão/invasão a relação das proteínas NcSRS67 e NcSRS57 sobre o processo de invasão de taquizoítas de *N. caninum* em células Vero;

5) Localizar as proteínas NcSRS67 e NcSRS57 em taquizoítas de *N. caninum* por imunofluorescência;

6) Obter o panorama geral de proteínas GPI de N. caninum;

7) Selecionar a forma nativa da proteína NcSRS57 através da técnica de *pull down* usando uma biblioteca de bacteriófagos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental envolvendo as atividades desenvolvidas durante a realização deste trabalho está representado no fluxograma abaixo (figura 5).

Figura 5. **Organização das atividades desenvolvidas**. Para facilitar a compreensão das atividades desenvolvidas durante a realização deste trabalho, as principais etapas e metodologias envolvendo as proteínas NcSRS67 e NcSRS57 de *N. caninum* estão representadas abaixo. Nc-1: linhagem de *Neospora caninum* isolada por Dubey e colaboradores (DUBEY et al., 1988). ELISA: ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Nc-LacZ: *N. caninum* transgênico expressando β-galactosidase (Nc-LacZ).



4.2 Cultura in vitro e purificação de taquizoítas de N. caninum

Taquizoítas pertencentes a linhagem Nc-1 (DUBEY et al., 1988) de *N. caninum* foram obtidos como descrito por Pereira et al. (2011) com algumas modificações. Culturas de células do epitélio renal de macaco (células Vero) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco) e 50 μ g/mL de antibiótico (kanamicina ou ampicilina), e incubadas (37°C, 5% CO₂) em garrafas de cultura T-25 cm² ou 75 cm². Taquizoítas de *N. caninum* foram mantidos em monocamadas de células Vero e subsequentemente purificados por passagem através de filtro 5- μ m, e centrifugação (3.300 x *g*, 4°C, 3 min) para remoção dos debris de células Vero. O *pellet* contendo taquizoítas foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,0 e os parasitas recuperados foram quantificados em uma câmara de Neubauer após diluição adequada.

4.3 Análise das sequências codificadoras de NcSRS67 e NcSRS57 de *N. caninum*

As sequências completas NcSRS67 (ToxoDB ID: NcLIV_060700) e NcSRS57 (ToxoDB ID: NcLIV_060660) de *N. caninum* foram submetidas a uma busca contra o banco de dados genômicos do ToxoDB versão 12.0 (GAJRIA et al., 2008). Originalmente planejado para ser um banco de dados do genoma anotado do parasita apicomplexa *Toxoplasma gondii*, atualmente o ToxoDB inclui também os dados genômicos de *N. caninum*, *Eimeria* spp, *Sarcocystis* spp e *Hammondia* spp.

As sequências SRS que apresentaram maior identidade por NcSRS67 e NcSRS57 (*Hammondia hammondi*, ToxoDB ID:HHA_450490), *Toxoplasma gondii*/TgSRS57 (ToxoDB ID:TGMAS_308020) e NcSRS29C (SRS2, ToxoDB ID:NcLIV_033250) de *N. caninum*, foram selecionadas para o alinhamento com a estrutura secundária da proteína SRS29B (anteriormente chamada de SAG1 e também conhecida como P30) de *Toxoplasma gondii*. A estrutura secundária de SRS29B foi obtida no Banco de dados de proteínas (PDB, código 1KZQ) (HE et al., 2002) e o alinhamento estrutural gerado a partir das sequências de aminoácidos das

proteínas encontradas para identificação de regiões conservadas entre elas, através do método de agrupamento hierárquico (CORPET, 1988).

Os domínios de todas as sequências envolvidas no alinhamento foram preditos com a ferramenta *Pfam* (FINN et al., 2015). As predições de identidade e similaridade foram obtidas através do software Genedoc e a imagem do alinhamento foi gerada pelo software Multalin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet). A clivagem do peptídeo sinal foi predita através do programa de predição Signal-3L (SHEN & CHOU, 2007) e a âncora de GPI foi predita em I.M.P. Bioinformatics: The GPI Prediction Server.

4.4. Procedimentos para clonagem e expressão de rNcSRS67 e rNcSRS57

4.4.1 Extração de DNA genômico de N. caninum

Aproximadamente 10^8 taquizoítas de *N. caninum* foram incubados com 500 µL de tampão de lise (Tris 40 mM; EDTA 80 mM; SDS 2%; pH 8,0) e 100 µL de proteinase K (0,1 mg/mL) por 1 hora a 37°C. Após centrifugação a 10.000 x *g* por 5 minutos, foram adicionados ao sobrenadante 500 µL de solução fenol: clorofórmio (1:1) e esta mistura foi centrifugada a 3500 x *g* por 8 minutos. À fase aquosa adicionou-se 1/10 de seu volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 vezes seu volume de etanol absoluto. A incubação para precipitação do DNA foi feita por 16 horas a - 20°C, o qual foi recuperado por centrifugação por 15 minutos. O *pellet* de DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 10.000 x *g* por 10 minutos, seco a temperatura ambiente, e dissolvido em água ultrapura autoclavada ou em tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1mM; pH 8,0). Para melhor dissolução do DNA, a solução final foi aquecida a 56°C por 1 hora, e depois armazenada a - 20°C.

4.4.2. Clonagem das sequências NcSRS67 e NcSRS57 de N. caninum

O DNA total foi isolado (item 4.4.1) de taquizoítas de *Neospora caninum* recém purificados (item 4.2). Baseado nas sequências codificadoras de NcSRS67 e NcSRS57 (sem o peptídeo sinal e sem a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI)) (http://toxodb.org./toxo/), foram desenhados *primers* específicos com auxílio do sofware Primer Select (Laser Gene, DNA Star) para amplificar os genes NcSRS67 e NcSRS57 através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os *primers forward* e reverso empregados na amplificação das sequências NcSRS67 e NcSRS57 estão representados na tabela 1. O produto de PCR foi purificado com o Kit de purificação illustra GFX PCR DNA (GE Healthcare, Reino Unido) e ligado no vetor de clonagem pGEM-T-easy (Promega), seguido por transformação através de eletroporação em células competentes *E. coli* TOP 10.

Tabela 1. Na tabela estão indicados: os *primers forward* (For) e reverso (Rev) para amplificação das sequências NcSRS67 e NcSRS57; o número em pares de bases (pb) de cada um dos *primers*; a sequência de nucleotídeos de cada *primer* e a temperatura de *melting* (TM) para cada *primer*. Os sítios de restrição estão sublinhados.

Nome	pb	Sequência	ТМ
	24		C1 1 %C
	31	5 CCCAAGCTTATIGAACTCAACGCACAGAATC 3	61.1 °C
NcSRS67RevXho	30	5' CCC <u>CTCGAG</u> AGACCCTGCATCAACTTTTC 3'	63.6 °C
NcSRS57ForBamHI	27	5'CTC <u>GGATCC</u> GCGGGACTGGCAAAGCGG 3'	60.0 °C
NcSRS57RevHindIII	30	5'TCT <u>AAGCTT</u> CAACAACGATCACAAGGGACA 3'	61.2 °C

4.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as reações em cadeia da polimerase (PCR), foi utilizado o kit de Taq polimerase k mantendo-se as concentrações dos reagentes: 1x tampão para Taq polimerase (*Taq polymerase 10x buffer*, promega, EUA); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen, EUA); 200 μM de dNTP Mix (Qiagen); 2 pmol de cada *primer* (IDT); 2,5 U da enzima Taq polimerase (Taq DNA *polymerase*, Promega, EUA); aproximadamente 100 ng de DNA; e água ultrapura autoclavada para 25 μL (amplificação para conferência) ou 50 μL (amplificação para purificação).

As reações de amplificação (do tipo *touchdown*) foram realizadas em termociclador (MasterCycler®, Eppendorf), com um ciclo a 94°C por 15 minutos para ativação da enzima HotStarTaq DNA Polymerase (Taq DNA *polymerase*, Promega, EUA). Foram 3 ciclos a diferentes temperaturas de anelamento (de maior para menor temperatura), iniciando com 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 5 ciclos de 30

segundos a 60°C, 5 ciclos de 2 minutos a 72°C, seguido de 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 5 ciclos de 30 segundos a 55°C, 5 ciclos de 2 minutos a 72°C e 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a 50°C e 25 ciclos de 2 minutos a 72°C. Por fim, foi realizada uma incubação a 72°C por 10 minutos para extensão da dupla fita de DNA. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8%, excisados do gel e purificados.

4.4.4. Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose 0,8% (*Agarose BioReagent, for molecular biology, Sigma-Aldrich*, EUA) foi realizada 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 Scintific) e o gel corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) (Amresco). As amostras foram previamente diluídas em tampão de amostra 6x Orange DNA Loading (Thermo, EUA) e o marcador de massa molecular(5,0 μL/poço) utilizado foi o Gene Ruler 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Canadá) (com pesos de 250, 500,750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10.000 pb).

4.4.5. Purificação dos fragmentos NcSRS67 e NcSRS57 a partir de gel de agarose

Os insertos NcSRS67 e NcSRS57, foram purificados do gel de agarose utilizando o Gel Band Purification Kit (GE Helthcare, Reino Unido). Os fragmentos excisados do gel com uma lâmina foram inseridos em um tubo eppendorf, ao qual foi adicionado tampão de captura (*capture buffer type 3*) na proporção de 1µL de tampão para cada micrograma de gel. Este sistema foi incubado a 60°C até a completa homogeneização do gel.

As amostras foram aplicadas em uma coluna de sílica associada a um tubo de 2 mL, obedecendo sempre um limite máximo de 600 μ L para cada conjunto. Após centrifugação deste sistema a 10.000 g por 1min, o volume eluído foi descartado e adicionado à coluna 500 μ L de tampão de lavagem (*wash buffer type 1*) e centrifugado a 10.000 x g por 1min. O filtrado final foi descartado e o conjunto centrifugado por mais 2 minutos a 10.000 x g para remoção de tampão residual. O

DNA adsorvido na coluna de sílica foi eluído com 50 μ L de água ultrapura em um tubo estéril de 1,5 mL por centrifugação a 10.000 x *g* por 2 minutos.

4.4.6. Reação de ligação das sequências NcSRS67 e NcSRS57 em plasmídeo de clonagem

As reações de ligação das sequências NcSRS57 e NcSRS67 em plasmídeo de clonagem foram feitas com 1U weiss da enzima T4 DNA Ligase (Promega, EUA), 50 ng do vetor pGEM-T-easy Vector Systems (Promega, EUA), 1 a 3 μ L do fragmento a ser inserido e água para volume final de 10 μ L . A reação de ligação foi incubada a 4°C por 24 horas e depois utilizada para a transformação de células competentes TOP 10.

4.4.7. Purificação de plasmídeos Selecionados (MiniPreps)

Os plasmídeos foram extraídos e purificados com Kit Pure YieldTM Plasmid Miniprep System (Promega, EUA). A suspensão de 5 mL (item 4.4.11) foi transferida para um tudo de 1,5 mL e centrifugada a 10.000 g por 1 min. O pellet resultante foi ressuspenso com 600 µL de água ultrapura livre de RNAase, lisado com 100 µL de tampão de lise (cell lysis buffer, que contém NaOH e um agente de solvatação SDS (dodecilsulfato de sódio)) e homogeneizado por inversão até a mudança de coloração da amostra. Em seguida a amostra foi neutralizada com 350 µL de solução neutralizadora (*neutralization solution*, constituída por íons K⁺) e invertida até tornar-se amarela com formação de precipitado, separado por centrifugação a 10.000 x g por 3 min. Cada sobrenadante foi transferido para uma minicoluna associada a um tudo coletor, centrifugado a 10.000 x g por 1min, com descarte do filtrado. As lavagens foram realizadas pela adição de 200 µL de solução de lavagem com inibidor de endotoxinas (endotoxin removal wash), centrifugação a 10.000 x g por 1min e descarte. Uma segunda lavagem foi realizada pela adição de 400 µL de solução de lavagem de coluna (column wash solution), seguida de centrifugação por 1min a 10.000 x g e descarte do tampão. A remoção de traços de tampão de lavagem foi feita por centrifugação a 10.000 x g por 2 min. Finalmente, as colunas foram transferidas para tubos estéreis, de modo que cada amostra adsorvida na

coluna recebeu 50 μ L de água deionizada, sendo incubada por 1min a temperatura ambiente e centrifugada por 2 min a 10.000 x *g*. As colunas foram descartadas e o material eluído foi submetido à digestão conforme item 4.4.8.

4.4.8. Digestão de pGEM-T-easy contendo as sequências NcSRS67 e NcSRS57

A digestão dos vetores foi realizada com tampão RED 1X (Thermo, EUA) e 10 unidades das enzimas *Bam*HI e *Hind*III no caso da sequência NcSRS57, e *Hind*III e *Xhol*, para a sequência NcSRS67 (Thermo, EUA) por 16 h a 37°C. O material digerido foi corrido em gel de agarose e depois de constatada a presença do inserto, foi feita a purificação do mesmo.

4.4.9. Sequenciamneto

As sequências NcSRS67 ou NcSRS57 ligadas em pGEM-Teasy ou em plasmídeos de expressão foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Profa. Dra. Maria Helena Goldman, na FFCLRP (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto). Os primers utilizados para o sequenciamento dos insertos em pGEM-Teasy foram T7 e SP8, enquanto que os primers utilizados no sequenciamento dos insertos em plasmídeos de expressão foram aqueles descritos na tabela 1.

4.4.10. Preparo de células eletrocompetentes

Uma colônia de células *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen[®], Thermo Fisher, EUA) ou BL21 (DE3) (Invitrogen[®], Thermo Fisher, EUA), previamente plaqueada em meio LB ágar foi repicada e incubada a 37°C em 50 mL de meio LB. Após 18 horas, 5 mL do caldo foram inoculados em 500 mL de LB e incubados a 37°C sob agitação (3.300 x g – em Incubadora de Bancada Refrigerada CT-712 R, da Cientec, Brasil) até densidade ótica (DO) a 600 nm atingir de 0,5 a 0,8 (medida realizada no equipamento Genequant, GE Healthcare, Reino Unido). Em seguida, toda a cultura foi incubada em gelo por 30 minutos e centrifugado por 15 minutos a 3000 x g a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em 500 mL de água (ultrapura esterilizada) a 4°C e

centrifugado nas mesmas condições anteriores. Feito o procedimento anterior por duas vezes, o *pellet* resultante foi homogeneizado em 20 mL de glicerol 10% esterilizado, este foi centrifugado (3000 x *g*, 15 minutos a 4°C) e o *pellet* obtido foi novamente ressuspenso em glicerol 10%, porém em 1 mL.

Para determinar se as células atingiram concentração mínima para transformação, 7,5 μ L do conteúdo obtido foram diluídos em 742,5 μ L de água ultrapura e tiveram sua OD medida a 600 nm. A quantidade de células é ideal se a OD é maior que 0,5, o que corresponde a 1 x 10⁸ UFC. Por final, aproximadamente 17 alíquotas de 55 μ L, contendo, em média ~3 x 10⁸ UFC, foram armazenadas a - 70°C.

4.4.11. Transformação por Eletroporação em *E. coli* Top10, Invitrogen

Os plasmídeos pGEM-T-easy foram inseridos em células competentes de *E.coli* (Top10, Invitrogen[®], Thermo Fisher, EUA) por eletroporação no aparelho Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, EUA). A reação de ligação (1 µL) foi adicionada em tubos eppendorfs de 1,5 mL, previamente resfriados, contendo 50 µL ($3x10^8$) de células competentes. Este conteúdo foi transferido para uma cubeta de eletroporação (2 mm BioRad, previamente resfriadas) e pulsado em aparelho GenePulser (capacitância 25 µF; resistência 200 Ω; voltagem 2,5 kV, BioRad). Após o pulso por eletroporação foram adicionados 250 µL de meio NYZ (10 g de peptona de caseína, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e água deionizada) à temperatura ambiente. Esta suspensão final foi transferida para um tubo falcon de 15 mL e incubado em shaker (CT 712R, Cientec, Brasil) por 1h a 37°C sob agitação de 4.500 x *g*.

A suspensão foi plaqueada em meio LB contendo antibiótico ampicilina (50 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, EUA). Após incubação por 16 h a 37°C, as colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em tubos falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio LB líquido e kanamicina ou ampicilina (50 μ g/mL), por aproximadamente 16 horas a 37°C e 3.300 x g. Este material foi posteriormente submetido à extração de plasmídeos.

4.4.12. Reação de ligação das sequências NcSRS67 e NcSRS57 em vetores de expressão

4.4.12.1 Construção de um novo plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO

O plasmídeo pGEM-pET28/060700 (figura 6), foi tratado com HindIII e PstI e o fragmento ligado em *frame* ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO (figura 6A), separando a sequência LacZα. O plasmídeo híbrido, denominado por nosso grupo de pesquisa como pCR-Blunt II-TOPO-His/060700 (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2016), foi desenvolvido para expressar a proteína NcSRS67, constitutivamente controlado pelo promotor Lac e contendo uma cauda de histidina 6x (figura 6B).

Figura 6. **Construção do plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO**. O fragmento NcSRS67 foi inicialmente ligado ao plasmídeo pGEM-pET28 contendo uma cauda de histidina His_{6x} e um *stop codon*. O fragmento foi tratado com HindIII e PstI e ligado *in frame* ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO (Life Technologies). (A) Representação esquemática da adaptação de pGEM-pET28 e pCR-Blunt II-TOPO para expressão de NcSRS67. (B) Mapa circular de pCR-Blunt II-TOPO-His/060700.



4.4.12.2 Ligação de NcSRS67 em pCR-Blunt II-TOPO

O plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO foi ligado à sequência NcSRS67 com 2 μ L de 10x tampão de ligação (New England BioLabs) e 1 μ L (80U) de T4 ligase (New England BioLabs) que havia sido previamente diluída em tampão de ligação 1x (1 parte da enzima para 5 partes de tampão). A amostra foi incubada em banho resfriado a 16°C por 18 horas. Após a ligação, os clones foram transformados por eletroporação em *E.coli* BL21 (DE) e plaqueados em meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl, ágar e pH 7,0), com kanamicina (50 μ g/mL). A transformação foi realizada conforme descrito no item 4.4.11. Cada colônia foi retirada isoladamente e reinoculada em 5 mL de meio LB liquído com kanamicina e os plasmídeos extraídos por Mini Prep (item 4.4.7). Para a verificação da ligação, os plasmídeos foram tratados com *Eco*RI, pois o uso de uma enzima com sítio predito além das enzimas utilizadas na ligação reforça a origem dos insertos ligados.

4.4.12.3 Ligação de NcSRS57 em pET32

O plasmídeo pET32 foi ligado à sequência NcSRS57 de acordo com o protocolo descrito no item 4.4.12.2. Após a ligação, os clones foram transformados em *E.coli* BL21 e plaqueados em meio LB com ampicilina (50 µg/mL). A transformação foi realizada do mesmo modo que o verificado no item 4.4.11. Cada colônia foi retirada isoladamente e reinoculada em 5 mL de meio LB liquído com ampicilina e os plasmídeos extraídos por Mini Prep (item 4.4.7).

4.4.13. Expressão, análise e purificação das proteínas recombinantes rNcSRS67 e rNcSRS57

4.4.13.1 Expressão de rNcSRS57

O plasmídeo pET32 ligado à sequência NcSRS57 foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3) e essa linhagem transformada por eletroporação (item 4.4.11). Após plaqueamento, uma colônia contendo o plasmídeo pET32 foi escolhida e submetida ao processo de indução em pequena escala. Para indução, a colônia foi repicada em

5 mL de caldo LB com 50 µg/mL de ampicilina e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, 500 µL da suspensão foi inoculada em placas de cultura com 6 poços (TPP), contendo 4 mL de caldo LB e 50 µg/mL de ampicilina. Estas placas foram incubadas a 37°C e 125 rpm até a densidade óptica atingir 0,5 nm (mensurada no Genequant, GE Healthcare, Reino Unido). As amostras contendo a ligação pET32/NcSRS57 (4 mL cada) foram divididas em frações induzida e não induzida com IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Promega). À primeira fração foram acrescentados 1 mM de IPTG para que a enzima T7 polimerase fosse transcrita e atuasse no reconhecimento do promotor do sistema pET32 (operon ativado pela presença de lactose ou análogos, como o IPTG). Para verificação da expressão o pellet foi ressuspenso em 700 µL de tampão ureia 8 M (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0), sonicado duas vezes e centrifugado (10.000 x g por 5 min a 4°C). As amostras extraídas foram submetidas ao teste de Bradford (item 4.6) para confirmação da presença de proteínas totais. Todas as amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE (item 4.8) e coradas com comassie blue G-250 (item 4.9.1).

4.4.13.2 Expressão de rNcSRS67

O plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO ligado à sequência NcSRS67 também foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3) e essa linhagem transformada por eletroporação (item 4.4.11). Uma colônia contendo o inserto NcSRS67 ligado ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO foi escolhida e inoculada em 4 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de kanamicina e posteriormente submetida à expressão constitutiva, não havendo a utilização de um indutor (IPTG). Como controle negativo, um promotor de tubulina de *N. caninum* foi ligado ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO. As culturas (500 µL) foram incubadas em placas de cultura com 6 poços (TPP), contendo 4 mL de caldo LB e 50 µg/mL de kanamicina por 2 h a 37°C sob agitação de (200 rpm) e posteriormente transferidas para tubos identificados e centrifugadas a 10.000 x *g* por 1 min, com descarte do sobrenadante. As etapas posteriores foram às mesmas utilizadas no item anterior (item 4.4.13.1).

4.4.13.3 Extrações solúvel e insolúvel das proteínas rNcSRS67 e rNcSRS57

As extrações das frações solúvel e insolúvel foram realizadas com o uso sequencial dos seguintes tampões: Tris-HCI (Tris-HCI 50 mM pH 7.5, 600 mM NaCl, 250 mM imidazol) e ureia nas concentrações de 0.5M, 1M, 2M, 4M e 8M (NaH₂PO₄ 100 mM; 100 mM Tris-CI; pH 8,0) para o recombinante rNcSRS67 e ureia 8M para rNcSRS57. Inicialmente, o *pellet* coletado após a expressão (item 4.4.13.2) foi ressuspenso em 700 μ L de tampão Tris-CI 50 mM e sonicado (intensidade 7 em *Sonic Dismembrator model* 100, Fischer *Scientific*). O tubo foi centrifugado (10.000 x *g* por 5 minutos a 4°C) e o sobrenadante armazenado em outro tubo de 1,5 mL. Sobre o *pellet* resultante foram adicionados 700 μ L do tampão Tris-Triton e a suspensão foi sonicada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi recolhido e o mesmo processo anterior foi repetido com o pellet, agora com o tampão Ureia 8 M. Os sobrenadantes referentes às extrações com os três tampões foram analisados (8 μ L de cada amostra) em eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE 12,5%.

4.4.13.4 Purificação das proteínas recombinantes rNcSRS67 e rNcSRS57 em resina de níquel

Para purificação das proteínas rNcSRS67 e rNcSRS57 contendo cauda de histidina foi empregada uma estratégia envolvendo a cromatografia de afinidade em resina de níquel (Ni Sepharose 6 *Fast Flow*, GE *Healthcare* ou His-Pur, Thermo Scientific), cujos íons metálicos são imobilizados pelo uso de um agente quelante capaz de disponibilizar o metal para ligar-se à proteína. Alguns aminoácidos, como a histidina, por exemplo, apresentam alta especificidade de ligação pelo Ni²⁺ imobilizado. Dessa forma, proteínas recombinantes contendo uma cauda de histidina podem ser seletivamente eluídas da resina carregada com átomos de Ni²⁺ em pH ácido e baixa concentração de imidazol.

4.4.13.4.1 Purificação em tampão desnaturante

As amostras obtidas a partir dos processos citados nos itens 4.4.13.1 e 4.4.13.2 foram aplicadas em colunas distintas (*Empty Disposable* PD-10 *Columns*, GE *Healthcare*) contendo 500 μ L de resina de Ni²⁺, previamente equilibrada com 3 mL de tampão ureia 8 M pH 8,0. As amostras contendo as proteínas recombinantes foram mantidas em contato com a resina de níquel por 10 min, favorecendo assim o contato da cauda de histidina com o Ni²⁺. Após incubação, foi recolhida uma alíquota denominada de *flow through* e o restante dispensado. A resina foi lavada com 3 mL de tampão ureia 8 M, e em seguida, realizadas três etapas de eluição de acordo com o gradiente de pH do tampão ureia. Primeiramente foi realizada a eluição com 3 mL de tampão ureia 8 M, seguida de uma eluição com 6 mL tampão ureia 8 M pH 6,3, e por final, a eluição da proteína recombinante através da adição de tampão ureia 8 M pH 4,5 em alíquotas de 500 μ L.

4.4.13.4.2 Purificação em tampão não-desnaturante

As amostras contendo proteínas recombinantes foram inseridas em colunas como descrito no item (4.4.13.4.1) pré-equilibradas com tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, 600 mM NaCl, 50 mM imidazol, pH 7,5). Após interação das amostras contendo as recombinantes com a resina de Ni²⁺ por 10 min, o conteúdo presente na coluna foi eluído, com recolhimento de uma alíquota de 500 μ L (*flow through*) e a coluna lavada 3 vezes (3 ml cada vez) com o mesmo tampão de lise. Por final, as amostras foram eluídas com um tampão de eluição nativo (Tris-HCl 50 mM, 600 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7.5) em alíquotas de 500 μ L.

4.5 Produção de anticorpos policionais contra as recombinantes rNcSRS67 e rNcSRS57

4.5.1 Declaração de ética

Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Anexo 1 – Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 13.1.361.53.9).

4.5.2. Animais

Camundongos BALB/c machos com 6-8 semanas de idade foram adquiridos do biotério do campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, São Paulo e mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Água e alimentos foram fornecidos *ad libitum*, e os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura (21+/- 2°C) e ciclos de luz (12 h) controladas.

4.5.3. Imunização de animais para obtenção de anticorpos contra rNcSRS67 e NcSRS57

Camundongos BALB/c (três animais por grupo) foram imunizados com injeções subcutâneas de 50 μ g da proteína recombinante purificadas (rNcSRS67 ou rNcSRS57) ou 50 μ g de extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (controle positivo) ou ureia 8 M (controle negativo), em mesmo volume de adjuvante completo (semana 0) e incompleto de Freund (semanas 3, 6 e 9). O extrato total de taquizoítas de *N. caninum* foi obtido por sonicação de taquizoítas intactos em tampão ureia 8 M pH 8,0. As soluções proteicas foram emulsificadas com adjuvante de Freund em mesma proporção (Rockland Immunochem, Gilbertsville, PA, EUA) para aumentar a eficiência da imunização. Na semana 10, os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) (KAWAI et al., 2011) por via intraperitoneal e submetidos a punção cardíaca para coleta do sangue, tendo a eutanásia ocorrido por hipovolemia. O sangue foi centrifugado a 10.000 x *g* por 15 min a 4°C e mantido a -20°C em alíquotas de 400 μ L.

4.6. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

Proteínas presentes em extratos proteicos e proteínas recombinantes foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foi construída uma curva de calibração com BSA (albumina sérica bovina acetilada), diluída na mesma solução em que as amostras de proteína estavam solubilizadas, nas concentrações de 0 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL e 1 mg/mL. As

amostras foram diluídas nas proporções 1/2, 1/4, 1/10 e 1/20 e, 20 µL de cada diluição de BSA e das amostras foram adicionados a 200 µL do reagente de Bradford (Bioagency) diluído 5 vezes em água e aplicados em uma placa de ELISA. A leitura espectrofotométrica foi feita em duplicata sob comprimento de onda de 595 nm, em leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid Read, BioTek Instruments, EUA).

4.7. Detecção de anticorpos por ELISA

A produção dos anticorpos ao longo das imunizações foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Em um primeiro instante, foram testadas diferentes concentrações de proteínas utilizadas, tanto para proteínas recombinantes (0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL; 0,10 µg/mL; 0,15 µg/mL), quanto para proteínas totais presentes no extrato total de N. caninum (1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL), a fim de encontrar a concentração mais adequada para se trabalhar no ensaio ELISA. Os antígenos (0,05 µg/mL das proteínas recombinantes (rNcSRS67 ou rNcSRS57) ou 5,0 µg/mL do extrato total de N. caninum) foram diluídos em tampão carbonato de sódio ou *coating buffer* (Na₂CO₃ 0,06 M pH 9,5) e incubados em placa de 96 poços (MaxiScorp, Thermo Scientific Nunc) à temperatura ambiente por 16 horas. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T (PBS contendo 0,05% Tween 20, Sigma-Aldrich, EUA) e bloqueada com PBS-GT (PBS-T contendo 2 mg/mL de gelatina suína, Sigma-Aldrich, EUA) a 37°C por 1 hora. Após lavagem por três vezes com PBS-T, os anticorpos anti-rNcSRS57 ou anti-rNcSRS67 (nas diluições seriadas 1/1000, 1/2000, 1/4000 e 1/8000 em PBS-GT) foram adicionados para detecção das formas recombinantes (rNcSRS57 ou rNcSRS67) ou nativas (extrato total de N. caninum). A placa foi incubada a 37°C por 1 hora e lavada três vezes com PBS-T. O anticorpo secundário (cabra anti-camundongo IgG conjugado à enzima peroxidase, Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado nas diluições de 1/2500, 1/5000, 1/10.000 e 1/20.000, em PBS-GT. A placa foi incubada a 37°C por 1 h e, em seguida, lavada por 3 vezes com PBS-T. Para detecção da atividade de peroxidase foi adicionado o reagente TMB (TMB, ELISA Single Solution Ready-touse, Zymed-Invitrogen) à temperatura ambiente, no escuro, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de HCI 2 M e a absorbância lida a 450 nm (Synergy H1 Hybrid Read, BioTek Instruments, EUA).

4.8. Eletroforese em Gel de Acrilamida SDS-PAGE

Para separação das amostras proteicas obtidas através dos métodos citados em 4.4.12.1 e 4.4.12.2, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida a 12,5% (sistema SE260, GE Healthcare, Reino Unido), sob voltagem fixa de 120 V e amperagem livre, em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 192 mM; SDS 0,1%). Mini géis de 10x8 cm e 0,75 mm de espessura foram preparados de acordo com o seguinte protocolo (para 2 mini géis):

Gel de corrida 12,5%

Acrilamida 40% (Bio Rad)	7,6 mL
Bisacrilamida 2% (Bio Rad)	4,1 mL
Água ultrapura	6,7 mL
1,5 M Tris pH 8.8 (Sigma-Aldrich)	6,25 mL
SDS 10% (Affymetrix)	250 µL
APS 10% (Sigma-Aldrich)	125 µL
TEMED (Thermo)	16 µL

Foi adicionado n-butanol saturado (J.T Backer, EUA) com água sobre o gel de corrida e deixado em temperatura ambiente para polimerizar. Após polimerização, o n-butanol foi desprezado e o gel foi lavado com água ultrapura para a preparação do gel de empilhamento, composto de:

Gel de empilhamento 5%

Acrilamida 40% (Bio Rad)	1,22 mL
Bis-acrilamida 2% (Bio Rad)	0,65 mL
Água ultrapura	5,5 mL
0,5 M Tris pH 6.8 (Sigma-Aldrich)	2,5 mL
SDS 10% (Affymetrix)	100 µL

APS 10% (Sigma-Aldrich.....50 μL TEMED (Thermo)...... 10 μL

As amostras foram diluídas em tampão de corrida 3x (Tris-HCl 187,5 mM pH 6,8; SDS 6%; glicerol 30%; azul de bromofenol 0,03%; DTT 26 mg/mL). Os marcadores de massa molecular foram Unstained Protein MW Marker (Thermo scientific, Lituania) em caso de géis submetidos à coloração e o marcador précorado Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo scientific, Lituania) em caso de transferência para membrana de *western blot*.

4.9. Coloração de gel de acrilamida

4.9.1. Coloração por Coomassie G

Ao término da eletroforese, o gel foi incubado com tampão fixador (40% de metanol e 10% de ácido fosfórico) por 1 h. Em seguida foi imerso em Coomassie G (0,1% Coomassie G (Sigma-Aldrich, EUA), 40% metanol, 10% ácido fosfórico) até a coloração adequada das bandas (1 a 3 dias de incubação a 50 rpm, temperatura ambiente). O gel foi devidamente selado em embalagem plástica, identificado e armazenado a 4°C.

4.9.2. Coloração com Nitrato de prata

Alguns géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo abaixo.

Soluções utilizadas:

- Solução A: 50% metanol, 10% ácido acético, 40% Milli-Q
- Solução B: 5% metanol, 95% Milli-Q
- Solução C: 0,02% (p/v) de tiossulfato de sódio pentaidratado
- Solução D: 0,2% (p/v) de nitrato de prata

 Solução E: carbonato de sódio 3%, formaldeído 0,0185%, tiossulfato de sódio pentaidratado 0,0004%

- Solução F: EDTA a 1,4%

Obs. As soluções C, D e E foram sempre preparadas no momento da utilização.

Ao término da eletroforese, os géis foram imediatamente transferidos para recipientes contendo a solução A e permaneceram nessa solução por no mínimo 1 h para fixação das proteínas no gel. Após desprezar a solução A, cuidadosamente, para não danificar os géis, foi acrescentada a solução B que permaneceu por 15 minutos sob leve agitação. Então, cada gel foi lavado 3 vezes, sendo que cada lavagem correspondeu a incubação com 200 mL de água ultrapura e agitação por 5 min. Após o esgotamento da água ultrapura, a solução C foi adicionada aos recipientes por no mínimo 2 min, cuidando para manter um pequeno volume necessário para a solução E. Desprezando-se a solução C, seguiram-se 3 lavagens rápidas com água ultrapura (cerca de 30s cada lavagem). Foi então adicionada a solução D por 25 min. Foram feitas 3 lavagens rápidas com água ultrapura, e então, foi acrescentado cerca de 100 mL da solução E, que foi descartada assim que o líquido tornou-se saturado na cor marrom (em +/- 10s). Mais 150 mL da solução E foi adicionado por outros 2 minutos. Após o descarte, novamente os géis foram incubados com mais solução E, que permaneceu em contato com os géis até que não houvesse mais revelação de spots e o background não estivesse alto, processo que não ultrapassava os 5 minutos. A solução F foi acrescentada para bloquear a reação. Depois de 10 minutos, a solução F foi desprezada e os géis foram lavados uma única vez com água ultrapura . Após estes processos, os géis foram devidamente selados em embalagem plástica, identificados e armazenados a 4ºC.

4.10. Eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 2D)

A separação de proteínas por eletroforese bidimensional permite a determinação de seus pesos moleculares e pontos isoelétricos (pl). Na primeira dimensão, as proteínas são submetidas a uma focalização isoelétrica, que permite que as proteínas migrem por um gradiente de pH imobilizado em gel (*strip*), por atuação de um campo elétrico, até atingirem o pH em que sua carga se iguala a zero, correspondente ao seu pl. Após essa separação, as proteínas têm suas cargas igualadas e suas pontes dissulfeto reduzidas para a separação por peso molecular, que corresponde à segunda dimensão.

4.10.1. Primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF)

O tampão de corrida para a IEF corresponde à solução de reidratação (7 M de ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS, 20 mM DTT e 2% de mistura de anfólitos carreadores (pH 3-11NL, não linear, *DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare, Reino Unido)). As amostras proteicas de *N. caninum* a serem analisadas foram extraídas de pellet recém-purificado de aproximadamente 1 x 10⁸ taquizoítas e as proteínas de células Vero foram extraídas de células provenientes de cultura confluente em garrafa pequena. Para isso, foram adicionados ao pellet 500 µL de tampão de reidratação. Os pellets foram ressuspensos no tampão adicionado e os tubos foram centrifugados em seguida a 9.500 x *g* por 5 minutos. Para hidratar as *strips*, 125 µL de cada extrato (*N. caninum* e Vero) foram utilizados, equivalente a 5 x 10⁷ taquizoítas ou mais. A esse volume foram adicionados DTT (final de 0,2 mM; Promega) e IPG *buffer* 3-11 NL (10 µL; GE *Healthcare*).

A corrida de primeira dimensão foi feita em *strips* de gradiente imobilizado (IPG) em pH 3-11NL de 7 cm (Immobiline[™] DryStrip, GE Healthcare, Reino Unido). Os 125 µL da solução preparada foram utilizados para reidratar cada *strip* de 7 cm (*Rehydrate Immobiline DryStrip gel* 3-11 NL, da GE *Healthcare*) . A *strip* foi mantida em uma bandeja de reidratação (*DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare, Reino Unido) posicionada em contato com a amostra contida em solução de reidratação, coberta com óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare, Reino Unido) e incubada a temperatura ambiente por 16 horas. No dia seguinte, as *strips* foram transferidas para o suporte de cerâmica do aparelho (Manifold), que foi acoplado ao equipamento Ettan IPGPhor3 (GE Healthcare, Reino Unido), cobertas com óleo mineral e submetidas às seguintes etapas de voltagem: 30 min a 300 V, 30 min a 1000 V, 1h e 20 min a 5000 V seguida de 8000 V até um total de 5-6,5 Kvh por *strip* de 7 cm. Após a corrida de IEF, as *strips* foram congeladas à -70°C ou diretamente submetidas à eletroforese bidimensional.

4.10.2. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (géis 2D)

As *strips* foram equilibradas em solução contendo SDS e ureia (solução de equilíbrio contendo 50 mM Tris, 6 M ureia, 2% SDS, 30% glicerol, pH 8.8) contendo

primeiramente DTT (100 mg/10 mL) por 15 min sob leve agitação, e posteriormente, iodoacetamida (250 mg/10 mL) por outros 15 min sob leve agitação.

A segunda dimensão foi feita em géis SDS de poliacrilamida em equipamentos SE260 (GE Healthcare, Reino Unido) preparados previamente no dia anterior de acordo com o protocolo a seguir: (para 2 mini géis):

Gel de corrida 12,5%

Bisarilamida 2% (Bio Rad)	Acrilamida 40% (Bio Rad)	7,6 mL
Água ultrapura6,7 n 1,5 M Tris pH 8.8 (Sigma-Aldrich)6,25 r SDS 10% (Affymetrix)250 μ APS 10% (Sigma-Aldrich)125μL TEMED (Thermo)16 μL	Bisarilamida 2% (Bio Rad)	4,1 mL
1,5 M Tris pH 8.8 (Sigma-Aldrich) 6,25 r SDS 10% (Affymetrix)250 μ APS 10% (Sigma-Aldrich)125μL TEMED (Thermo)16 μL	Água ultrapura	6,7 mL
SDS 10% (Affymetrix)250 μ APS 10% (Sigma-Aldrich)125μL TEMED (Thermo)16 μL	1,5 M Tris pH 8.8 (Sigma-Aldrich)	6,25 mL
APS 10% (Sigma-Aldrich)125μL TEMED (Thermo)16 μL	SDS 10% (Affymetrix)	250 µL
TEMED (Thermo)16 μL	APS 10% (Sigma-Aldrich)	125µL
	TEMED (Thermo)	16 µL

Com uma pipeta Pasteur, o gel foi montado entre placas de vidro (SE600), cuidando para que não houvesse formação de bolhas. Foi colocado n-butanol saturado com água sobre o gel de corrida e deixado em temperatura ambiente para polimerizar (no mínimo por 2 horas). Após polimerização, o n-butanol foi desprezado e o gel foi lavado com água ultrapura e coberto com solução de conservação de gel (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%).

Os géis foram protegidos com parafilme e mantidos a 4°C para uso no dia seguinte. As *strips* e o marcador de massa molecular (Thermo Scientific, Lituania) foram cuidadosamente aplicados. Os géis foram selados com solução selante de agarose (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, agarose 0,5% e traços de azul de bromofenol) previamente aquecida 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 mini gel por 15 minutos para possibilitar a entrada lenta e homogênea da amostra, completando o

processo com 20 mA por mini gel até o azul de bromofenol atingir a parte inferior do gel (realizado no aparelho SE 260, GE). Este gel foi posteriormente corado por Coomassie G (item 4.9.1) ou prata (item 4.9.2) ou então utilizado para *western blot*.

4.10.3 Estimativa do pl de proteínas

Para determinar o ponto isoelétrico de spots dispostos em diferentes intervalos de pH não linear (3-11 NL) em géis *Immobiline DryStrip*, foi traçada uma curva do comprimento do gel *Immobiline DryStrip* versus o gradiente de pH, como mostrado abaixo na figura 7.

Figura 7. Perfil de gradiente de pH calculado a partir de géis *Immobiline DrySTrip* em função do comprimento dos géis para determinação do ponto isoelétrico (pl) de proteínas representadas através de spots. Gráfico utilizado para cálculo de pl a partir de strip 3-11 NL. Gráfico extraído do Manual Data File 2-D Electrophoresis – Immobiline DryStrips Gel (GE Healthcare, Reino Unido).



4.11. Aquisição de imagens

As imagens adquiridas a partir dos géis e filmes dos *westerns blots* foram escaneadas (Image Scanner, GE Healthcare, Reino Unido) sob a utilização do software LabScan (GE Healthcare, Reino Unido).

4.12. Western blot

Membrana de PVDF (0,45 µm, Millipore) foi previamente hidratada em metanol por 5 minutos. No equipamento de transferência sistema semi-seco (TE PWR 77, GE), o gel de acrilamida (1D ou 2D) foi posicionado sobre a membrana de PVDF e ambos foram acomodados entre folhas de papel filtro (Bio Rad) umedecidas em tampão de transferência (Tris 0,25 M; glicina 0,2 M; SDS 0,001%; metanol 15%). A transferência ocorreu a 0,81 mA/cm² de membrana por 1 hora e 15 minutos. Após a transferência, as membranas tiveram suas proteínas coradas reversivelmente com DB71 (Direct Blue 71 Aldrich 0,08% em 40% de metanol e 10% de ácido acético) por 5 minutos sob agitação. Foram marcadas as posições do marcador molecular e início e fim da corrida. As membranas foram, então, descoradas com tampão de descoloração (bicarbonato de sódio 0,15 M; etanol 50%) e foram lavadas com PBS-T por 5 minutos. Após a lavagem, elas foram bloqueadas em PBS-GT a temperatura ambiente sob agitação. Após 1 hora, foram feitas três lavagens de 5 minutos cada com PBS-T e as membranas foram, então, incubadas com o anticorpo policional anti-rNcSRS67 ou anti-rNcSRS57 nas diluições de 1/200.000 ou 1/60.000, respectivamente (em PBS-GT) por 18 horas a 25°C. As membranas foram lavadas novamente três vezes por 5 minutos em PBS-T e incubadas com o anticorpo conjugado de camundongo acoplado à peroxidase (Sigma-Aldrich; 1/2.000) em PBS-GT.

Para a revelação, as membranas foram expostas à mistura dos reagentes ativadores de peroxidase (Luminol, *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce) em temperatura ambiente por 5 minutos. A quimioluminescência foi detectada por exposição a filme radiográfico (ORTHO CP-G Plus, AGFA 18x24 cm) em um cassete para exposição a filmes autoradiográficos. Após exposição em períodos variados (de segundos a minutos, dependendo da intensidade da reação), o filme foi imerso por 1 minuto em solução de revelação (Exsil MX), seguido de imersão em água e, por fim, 1 minuto de imersão em solução de fixação (Exsil MX).

4.13. Espectrometria de massas

4.13.1 Digestão de bandas e spots para análise em MALDI

As bandas ou spots de interesse foram excisados a partir de géis 1D e 2D e lavadas três vezes em 25 mM NH₄HCO₃ pH 8,0 em 50% v/v de acetonitrila (ACN) por 15 minutos cada lavagem, desidratadas em 100% de ACN e secas em concentrador a vácuo (Concentrador Labconco Corporation Centrivap, EUA). Após desidratação, os fragmentos de gel 1D foram reduzidos e alquilados: os fragmentos de gel foram reidratados com 20 mM de DTT em 50 mM de NH₄HCO₃ e incubados por 40 min a 55°C. O líquido excedente foi removido e substituído por 55 mM de iodoacetamida (IAA) em 50 mM de NH₄HCO₃. O líquido excedente foi novamente removido e os fragmentos de banda lavados com 25 mM de NH₄HCO₃ e secos em concentrador a vácuo (Concentrador Labconco Corporation Centrivap, EUA). Os fragmentos de banda 1D ou spots foram ressuspensos em solução de tripsina 25 ng/µL (Trypsin Gold modificada, Promega) e incubados por 16-24 hrs a 37°C. A solução de tripsina contendo os peptídeos foi transferida para outro tubo e os géis submetidos a duas lavagens com 100% de ACN, secos em concentrador a vácuo e lavados duas vezes com ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% (v/v) em 50% de ACN. A solução resultante dessas lavagens foi reunida com a solução de peptídeos e o volume total seco em concentrador a vácuo (Concentrador Labconco Corporation Centrivap, EUA).

4.13.1.1 Análises por MALDI

As amostras foram diluídas 1:1 em ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em 50% ACN e 0.1% TFA) e aplicadas em duplicata sobre uma placa do MALDI. Uma solução de polietileno glicol (PEG) diluída em matriz (1:1) foi empregada como calibrante e os peptídeos foram analisados através de lonização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI TOF/TOF-Bruker (Centro de Cromatografia e Espectrometria de Massas do NPPNS-FCFRP/USP)). Os dados obtidos a partir da fragmentação por MS/MS (*Software Flex Control 3.3*, Bruker), foram tratados (*Software Flex Analysis 3.3, Bruker*), convertidos em MGF (*Biotools 3.2*) e posteriormente confrontados contra um banco de dados de proteínas preditas de *N. caninum* (www.matrixscience.com) disponível *on line* em uma plataforma do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) dentro do banco de dados ToxoDB-28, acessado através do *software* Mascot versão 2.3.02 (Matrix Science). A carbometilação da cisteína e a oxidação da metionina foram adotadas como modificações fixas e variáveis, respectivamente.

4.13. 2 Digestão de fragmentos de gel para análises por Synapt G2

A amostra (banda) foi submetida à lavagem com solução de descoloração (50% v/v de ACN e 25 mM de NH₄HCO₃) até total retirada do corante Coomassie G. Após desidratação com 100% de ACN, foi realizada redução e alquilação como descrito no item 4.13.1. Os fragmentos foram ressuspensos com solução de 20 ng. μ L⁻¹ de tripsina modificada (Promega V5111) em 50 mM de NH₄HCO₃. Após a reidratação total, os fragmentos foram parcialmente cobertos com 25 mM de NH₄HCO₃ e a digestão, realizada a 37°C por 16 horas.

4.13.2.1 Análise por LC-MS/MS (Synapt G2)

As amostras foram ressuspensas em 20 uL de Formiato de amônio 20 mM pH10. Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters), acoplado ao sistema Acquity UPLC MClass, com tecnologia 1D Simulado (Waters), contendo uma coluna Trap 2D Symmetry C18 (5 µm, 180 µm x 20 mm), com fluxo de 0,300 µL/min do Laboratório Multiusuários Centralizado Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia ESALQ/USP. Os espectros de massas analisados no Synapt G2 foram processados utilizando o software Protein Lynx Global Server (PLGS) versão 3.1 com o banco de dados reverso (NcaninumLIV e TgondiiME49) do ToxoDB-28 versão 12.0 (GAJRIA et al., 2008). Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.
4.14. Ensaio de invasão/adesão

A metodologia do ensaio de invasão empregando N. caninum expressando beta-galactosidase foi descrita por Pereira et al. (2014). Taquizoítas Lac-Z purificados conforme item 4.2 (2x10⁵ parasitas/poco) foram previamente incubados com os seguintes antissoros, todos diluídos 1/200: rNcSRS67, rNcSRS57, extrato total de taquizoítas, associação de rNcSRS67 com rNcSRS57 ou pré-imune (soro obtido de animais não imunizados). Após 1 h de incubação a 37°C, estes parasitas foram lavados 3 vezes com PBS e aplicados em triplicata sobre monocamadas confluentes de células Vero em placas de cultura celular de 24 poços (Test Plat, TPP), permanecendo por 2 h a 37°C. As células foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas com tampão de lise (4-2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico, 100 mM HEPES, 1mM MgSO₄, Triton 1%, 5 mM Ditiotreitol, DTT, pH 8,0) a 50°C por 1 h. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g, 4°C por 10 min e 20 µL do sobrenadante foi diluído em 140 μL de tampão de lise e 40 μL de CPRG (Clorophenol Red β-D-Galactopiranoside, 6 mM, Roche) em triplicata. A reação foi mensurada após 18 horas a 37°C em 570 nm (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, EUA). A absorbância x número de taquizoítas foram plotados e analisados por regressão linear através do software GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, La Jolla, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados no mínimo três vezes independentemente e executados em diferentes dias.

4.15. Imunofluorescência

Taquizoítas de *N. caninum* recém purificados (item 4.2) foram inoculados em poços delimitados com uma caneta (*Liquid Blocker, Super Pap Pen*, Japão) sobre lâminas revestidas com poli-lisina, lavados com PBS e fixados com 3,65% de formaldeído (*Formaldehyde Solution, for molecular biology 36,5%*, Sigma-Aldrich, EUA) em PBS por 1 h a 25°C. Após três lavagens, os taquizoítas foram incubados com soro policional anti-rNcSRS67 (1/5.000) ou rNcSRS57 (1/2.000) por 45 minutos, seguido por três lavagens em PBS. O anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes[®]) foi diluído a 1/50 e o núcleo marcado com iodeto de propídeo (Santa Cruz Biotechnology[®]).

Fotomicrografias foram obtidas com uma objetiva 100x usando óleo de imersão em microscópio confocal (Leica SP8 Laser Scanning Confocal Microscope, Leica Microsystems, Alemanha) conectado a uma câmera digital do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/USP. Todas as imagens foram capturadas (software LAS AF version 3.2.0.9652), agrupadas e processadas através do programa imagem J 1.41 (National Institutes of Health, EUA. Os cortes ópticos foram feitos sob baixas intensidades de laser, o que contribuiu para obtenção de imagens com resolução adequada e sem a presença de background.

4.16. Teste de ancoragem por GPI de NcSRS57

Taquizoítas de N. caninum (2x10⁷ taquizoítas) recém-purificados (item 4.2) foram lavados 3 vezes com PBS e 1 vez com tampão fosfolipase C fosfatidilinosiltol (PI-PLC) (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.75 M sacarose, 10 mM glicose) (POLLARD et al., 2008). Os parasitas foram ressuspensos em 50 µL de tampão PI-PLC e tratados com 1 unidade (U) de fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC) (Molecular Probes) a 37°C por 2,5 h em tubo de 1,5 mL (figura 8). Em paralelo, como grupo controle, taquizoítas purificados foram mantidos nas mesmas condições citadas anteriormente, porém sem adição da enzima PI-PLC. Os parasitas tratados e controles foram coletados por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O pellet contendo taquizoítas foi lavado 3 vezes em tampão PI-PLC, e aplicado às lâminas para serem processados em um ensaio de imunofluorescência (item 4.15). Parte do sobrenadante foi submetido à SDS-PAGE 1D corado por Coomassie G (item 4.9.1) e as bandas excisadas para tripsinização e posterior identificação por espectrometria de massas. A outra parte do sobrenadante foi aplicada em gel SDS-PAGE seguido de análise através de um sistema de Western blot por quimioluminescência de acordo com o protocolo descrito no item 4.12, usando o soro produzido contra rNcSRS57 (1/1000).

Figura 8. Representação esquemática das etapas envolvidas no teste de ancoragem por glicosilfosfatidilinositol (GPI) da proteína NcSRS57 de Nesopora caninum. Taquizoítas purificados de *N. caninum* (2x10⁷) foram tratados ou não com a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol; os sobrenadantes foram aplicados em gel SDS-PAGE e posteriormente submetidos às técnicas de *western blot* ou espectrometria de massas; os pellets contendo taquizoítas foram aplicados sobre lâminas e submetidos à técnica de imunofluorescência.



4.17 Panorama geral de proteínas GPI de N. caninum

Taquizoitas de *N.caninum* (item 4.2) foram submetidos à extração de proteínas GPI com a enzima PI-PLC (item 4.16). Neste ensaio foram utilizadas amostras distintas, uma com taquizoítas íntegros recém purificados, e a outra com taquizoítas íntegros previamente congelados e descongelados para o tratamento. Em paralelo a cada grupo foi realizado o controle com células Vero também submetidas a ação da enzima PI-PLC.

As amostras de proteínas GPI e o controle Vero foram ressuspensas em tampão de reidratação e submetidas à focalização isoelétrica (item 4.10.1) e SDS-PAGE 2D, (item 4.10.2). Os spots foram digeridos (item 4.13.1) e submetidos à espectrometria de massas (MS/MS) (item 4.13.1.1).

4.18. Amplificação de bacteriófagos ligantes de rNcSRS57

A biblioteca de fagos M13 (cada fago contendo sequências únicas de peptídeos) foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Marcelo Jacobs-Lorena, da Universidade do Arizona, EUA (GHOSH et al., 2001). Esta biblioteca é constituída por dodecapeptídeos (diferentes peptídeos (10 a 12 peptídeos/mL) contendo cada peptídeo, doze resíduos de aminoácidos) aleatórios fusionados à região N-terminal gerada a partir do bacteriófago filamentoso f88.4 revestido pela proteína VIII (BONNYCASTLE et al., 1996). A biblioteca inicial, compreendendo cerca de 7,5x10⁶ células transfectadas independentes, foi amplificada em 1 litro de meio NZY (1% de NZ amina, 5% de extrato de levedura,10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose) (SAMBROOK et al., 1989) contendo 20 µg/mL de tetraciclina (o fago f88.4 confere resistência à tetraciclina quando está no interior de seu hospedeiro). Os fagos parcialmente secretados pelas células foram parcialmente purificados por precipitação em 1,0 mL de PEG 8000 20%, dissolvidos em TBS (solução salina de Tris tamponado, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), mantidos por 16 h a 4°C e posteriormente centrifugados a 10.000 g, produzindo um número estimado de 1.3x10¹⁴ unidades transdutoras de bactérias (TU)/mL (SMITH & SCOTT, 1993).

4.18.1 Obtenção da cultura de E. coli M91

Uma colônia de *E. coli* M91 em ágar LB sem antibióticos, foi transferida para 5 mL de meio LB e incubada overnight a 37° C e 150 rpm. Uma alíquota de 100 µl dessa suspensão foi incubada em 5 mL de meio LB sem antibiótico até a OD atingir ~ 1.0. Antes de interagir com a biblioteca de fagos, a suspensão contendo *E. coli* M91 foi incubada por 10 min em banho maria para regeneração do *Pili* bacteriano (apêndice filiforme da superfície).

4.18.2 Seleção de bacteriófagos com afinidade a NcSRS57

Um esquema representativo de um ciclo de seleção de fagos ligantes de rNcSRS57 está representado abaixo (figura 9). Para o desenvolvimento deste método, foi realizado inicialmente aderência da proteína rNcSRS57 (5 ug/mL) diluída

em 10 µM em coating buffer (item 4.7) em placa com 6 poços (Thermo Scientific) por 18 horas a 4°C. Cada poço foi lavado três vezes com PBS, seguido de bloqueio com BSA 1% em PBS por 1 hora. Após três lavagens com PBS, 300 µL de uma suspensão de bacteriófagos selvagens (item 4.18) foi adicionado ao poço e incubado por 1 hora a 4°C. Os poços foram lavados 10 vezes com PBS para a retirada dos fagos não ligantes, seguido da adição de 1 mL de cultura de E. coli (M91) em LB (item 4.18.1). A placa foi incubada por 15 minutos a 37°C para que os fagos cujos capsídeos continham peptídeo ligante de rNcSRS57 invadissem as bactérias. A partir dessa cultura foram obtidas duas alíquotas: uma com 50 µL da própria cultura e outra com diluição 1/100 em PBS. Essas alíquotas foram então plaqueadas em meio LB ágar seletivo contendo 50 µg/mL de tetraciclina (Sigma-Aldrich, EUA). A tetraciclina é utilizada uma vez que o material genético dos bacteriófagos que infectam as bactérias confere às mesmas resistência a este antibiótico. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. As culturas selecionadas em meio sólido (4 colônias), foram expandidas em 5 mL de meio LB líquido seletivo (contendo 50 µg/mL de tetraciclina) por 18 horas a 37°C. As culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 3 minutos e o sobrenadante foi reservado. Paralelamente, a cultura restante na placa de 6 poços teve mais 4 mL de meio LB adicionados, seguidos de incubação sob agitação a 37°C. Após 15 minutos, foi adicionado tetraciclina (50 µg/mL) e a placa foi incubada por 18 horas a 37°C sob agitação. No dia seguinte, essa cultura teve as células sedimentadas a 10.000 g por 3 minutos e o sobrenadante contendo os bacteriófagos (SOBRENADANTE BAC) foi armazenado a 4°C até o uso. Os bacteriófagos foram precipitados dos sobrenadantes das culturas com adição de uma solução de polietilenoglicol (PEG 20%) (Sigma-Aldrich, EUA) e NaCl 2,5 M na proporção 1:5 e incubados por um tempo mínimo de 18 e máximo de 48 horas a 4°C (PRECIPITADO BAC).

figura 9. Representação esquemática de um ciclo de seleção de fagos ligantes de rNcSRS57 a partir de uma biblioteca de bacteriófagos M13. (1) Biblioteca de phage display constituída por peptídeos aleatórios gerados a partir de oligonucleotídeos (2) Proteína de interesse imobilizada sobre uma superfície sólida e incubada com a biblioteca de fagos. A ligação dos fagos ocorre através de interações entre o peptídeo disposto na superfície do fago e a proteína aderida a superfície fixa, de modo que as interações não especificas são desprezadas. (3) Os fagos não ligantes são lavados e (4) aqueles fagos de

interesse que se ligaram são amplificados e usados em repetidos ciclos de seleção (3-5 ciclos).



Fonte: Esquema adaptado de (SUNDELL; IVARSSON, 2014).

4.18.3. ELISA para avaliação da afinidade dos fagos à rNcSRS57

Os bacteriófagos precipitados (PRECIPITADO BAC) das culturas provenientes da seleção de colônias ou a cultura contendo o *pool* de bacteriófagos (SOBRENADANTE BAC) ligantes de rNcSRS57 (item 4.18.2) foram ressuspensos em 450 μ L de *coating buffer* (item 4.7). Os bacteriófagos (PRECIPITADO BAC ou SOBRENADANTE BAC) (grupo 1) ou 5 μ g/mL de rNcSRS57 (grupo 2, controle) ou anticorpo anti-rNcSRS57 (grupo 3, controle) foram diluídos em *coating buffer* e incubados em placas de 96 poços (MaxiScorp, Thermo Scientific Nunc). Para isso, as soluções de bacteriófagos em tampão alcalino foram adicionadas (100 μ L), em duplicata, em placa de 96 poços e incubada por 16 horas à temperatura ambiente. Após aderência à placa, foi realizado um ensaio de ELISA diferente do convencional,

pois envolveu uma etapa inicial de aderência de fagos com afinidade pelo antígeno rNcSRS57 à placa (figura 10). A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e bloqueada com PBS-GT a 37°C por 1 h. Após lavagem por três vezes com PBS-T, os poços foram incubados por 1 h a 37°C com 5 µg/mL de rNcSRS57 em PBS-GT. Após lavagem por três vezes com PBS-T, foi feita incubação com soro anti-rNcSRS57 (1:2.000), lavagem por 3 vezes com PBS-T e incubação com anticorpo secundário (cabra anti-camundongo IgG conjugado à enzima peroxidase,Sigma-Aldrich, EUA) (1:5.000). A revelação foi feita com solução TMB por 10 minutos e a placa foi submetida a leitura a 450 nm, como descrito no item 4.7.

figura 10. Representação esquemática de um ensaio ELISA utilizando bacteriófagos ligantes de rNcSRS57. (1) Suspensão contendo bacteriófagos M13 selecionados a partir da interação com rNcSRS57. (2) Bacteriófago M13 contendo peptidío específico e ligado a uma superfície fixa. (3) Interação entre o epítopo de um antigeno (ex. rNcSRS57) e o peptídeo disposto na superfície do fago. (4) anticorpo policional de camundongo produzido contra o antígeno (rNcSRS57) e (5) anticorpo anti-camundongo conjugado a peroxidase. A atividade da peroxidase é determinada mediante adição do reagente TMB à temperatura ambiente e absorbância lida a 450 nm, semelhante ao ensaio ELISA convencional.



Fonte: BEZERRA, (2017)

4.18.4. Pull down associado a phage display

Inicialmente, 10 ou 50 mL de cultura de *E. coli* M91 infectada com bacteriófagos ligantes de rNcSRS57 (obtidos no item 4.18.1) foram incubadas por 18 horas e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. Foi retirado o sobrenadante e os

bacteriófagos presentes nesta fração foram precipitados por um tempo de 16 horas após adição de PEG 8000 20% em tampão de lise (25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton x-100 e 5% glicerol) na proporção 1:5 (v/v), quando foram centrifugados a 10.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* de bacteriófagos também foi ressuspenso em tampão de lise. Para evitar a presença de moléculas inespecíficas entre os bacteriófagos ligantes de rNcSRS57, os mesmos foram submetidos a filtração em filtro de 0,22 μm e o filtrado (500 μL) utilizado no ensaio posterior de pull-down.

Para realização do ensaio de *pull-down*, 200 µL da suspensão de bacteriófagos ligantes de rNcSRS57 (filtrado obtido anteriormente) foram adicionados a 300 µL de extrato total de *N. caninum*. Para obter este extrato, duas garrafas médias de cultura de taquizoítas de *N. caninum* foram purificadas (item 4.2) e os taquizoítas (2x10⁸) foram lisados com tampão de lise (25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% triton x-100 e 5% glicerol) em gelo por 1 hora. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado no ensaio de *pull-down*. A mistura de extrato total e bacteriófagos foi incubada a 22°C por 1 hora sob agitação de 300 rpm. Após incubação, os bacteriófagos foram precipitados mediante adição de 120 µL de solução de PEG 20% por pelo menos 1 hora a 22°C. A reação foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos e sobrenadante e *pellet* foram submetidos a SDS-PAGE 1D e *western blot*.

4.19. Análise estatística

Os dados obtidos dos ensaios ELISA e de invasão foram plotados como porcentagem correspondentes a média \pm desvio padrão e analisados com análise de variância (ANOVA) empregando o teste de Bonferroni para comparação entre os diferentes grupos experimentais com nível de significância de 5% (α =0.05). Em cada caso, os valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas através do programa Graph Pad PRISM 5.0 (Graph Pad, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Análise in silico das sequências NcSRS67 e NcSRS57 de N. caninum

Foi realizada comparação entre as sequências NcSRS67 e NcSRS57 de *N. caninum* e também com outras SAG/SRSs de coccídios como *T. gondii* e *Hammondia hammondi* (figura 11 e tabela 2). NcSRS67 e NcSRS57 possuem maior identidade com a SRS de *H. hammondi* (HHA_450490) e TgSRS57 de *T. gondii*, respectivamente. Entre si, NcSRS67 e NcSRS57 possuem 41/57% de identidade/similaridade, a terceira maior semelhança na comparação das sequências utilizadas para o alinhamento estrutural (tabela 2). Por outro lado, NcSRS29C foi a proteína com menor similaridade tanto com NcSRS67 quanto com NcSRS57 (tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das sequências de aminoácidos de proteínas de superfície da superfamília SRS/SAG de coccídios. Porcentagens de identidade e similaridade (%) das sequências NcSRS67 e NcSRS57 de *Neospora caninum* com as sequências HHA_450490 de *Hammondia hammondi*, NcSRS29C de *N. caninum* e TgSRS57 de *Toxoplasma gondii*.

		NcSRS57	TgSRS57	NcSRS29C	HHA_450490	NcSRS67
TgSAG1	Identidade	19	20	21	16	22
	Similaridade	36	31	37	27	38
NcSRS57	Identidade		46	18	24	41
	Similaridade		61	35	33	57
TgSRS57	Identidade			21	17	35
	Similaridade			36	26	49
NcSRS29C	Identidade				12	19
	Similaridade				22	35
HHA_450490	Identidade					42
	Similaridade					51

NcSRS67 e NcSRS57 possuem 351 e 357 resíduos de aminoácidos, respectivamente, com domínios hidrofóbicos nas extremidades N e C terminal, sendo um peptídeo sinal predito na porção amino terminal e uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) no terminal carboxílico. O peptídeo sinal foi predito entre os resíduos $M^1 - A^{37}$ de NcSRS67 e $M^1 - A^{46}$ de NcSRS57 (figura 11). Existe ainda a predição para dois domínios D1 e D2 de NcSRS67 (127 e 120 resíduos de aminoácidos, respectivamente) e de NcSRS57 (123 e 118 resíduos de aminoácidos). Os domínios correspondem a partes conservadas de proteínas SRS, cujas funções ainda são investigadas. Sabe-se que nas proteínas de T.gondii BSR4 e TgSRS29B (SAG1) os domínios atuam como um acesso da proteína a um ligante da célula hospedeira e também são primordiais na multimerização (CRAWFORD et al., 2009; 2010). Foi possível observar ainda, com exceção da sequência de H. hammondi, a presença de alguns resíduos de aminoácidos inteiramente conservados nos domínios SAG/SRSs, incluindo seis cisteínas no domínio D1 e outras seis no domínio D2, formando assim, três pontes dissulfeto em cada um destes domínios (Figura 11).

Figura 11. Alinhamento das seguências de aminoácidos de proteínas de superfície da superfamília SRS/SAG de coccídios. Foram alinhadas as proteínas SRS de Neospora caninum NcSRS67 (ToxoDB ID: NcLIV_060700), NcSRS57 (ToxoDB ID: NcLIV_060660), NcSRS29C (ToxoDB ID: NcLIV_033250), Toxoplasma gondii TgSRS57 (ToxoDB ID: TGMAS_308020) e Hammondia hammond (ToxoDB ID: HHA_450490), respectivamente. Os resíduos de aminoácidos estritamente conservados estão em branco sobre um plano de fundo preto. Os resíduos parcialmente conservados estão em preto sobre um plano de fundo branco delimitados por uma linha preta. Os resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto estão representados pelos números pretos abaixo do alinhamento. As setas verticais indicam os sítios preditos de clivagem do peptídeo sinal e da âncora de GPI da sequência NcSRS67. Os domínios de proteínas SRS/SAG (D1 e D2) estão indicados pelas barras de cor preta na parte superior do alinhamento. As folhas β dos domínios D1 e D2 estão identificadas pelas setas horizontais. Os espirais inseridos entre as folhas β, representam as hélices ao longo da sequência e as letras TT indicam os locais de dobramento da sequência. Os elementos de estrutura secundária mostrados no alinhamento abaixo, correspondente à sequência TgSAG1, também denominada de TgSRS29B, são derivados da estrutura cristalina da proteína SAG1/SRS29B de T. gondii (PDB 1KZQ) (He et al., 2002).

M-93 C1				-	Peptídeo sina	al
TgSAGI						i
TgSAG1 NcSRS67 NcSRS57 TgSRS57 NcSRS29C HHA_450490	MSLSFHK .MFACPCSSG MQLWRRRAAG MAT MSSSFNI	TSPRQRKQCT PAGLAKRAP PASLGRQSLP HACVVRRKAD KTPSHRQTGT	RQIYGVAFP GRILFLVWF LGCFFAAFG AACFAKLSA QQSCGVVFS	SFVAVLFFVV L.VLSVLLVTC LCVLSAILGTC SQSCLTAKSVI SPAAAFFLFI	AESVQIFVEAKGER GNNVSLVEAKKRNV GEHGLFVAAGKSRSI NRSVSVFALLFGVV AGSAQRFAEASGER	SDPPLV LGTLKPLG TKKYFGTLESIG KITYFGTLTQKA LAVGVSGAPFKS LGTLKYLG
TgSAG1	β1	β2	→ тт	β3	ΓΤ → β4 η1 2222 ΤΤ	β5 ➡ ΤΤ 60
TgSAG1 NcSRS67 NcSRS57 TgSRS57 NcSRS29C HHA_450490	ANQVVICPDK KN.RYSCVQE PN.SYRCSSPQ PN.WYRCSST ENEKFICLPK DN.RYSCVQE	KSTA DGTGPNPGVG EVAEEVVG RAKEEVVG QGNADQW DGTGANPGVG	AVILTPTEN SIELNAQNP AVVLSVKAP HVTLNKEHP VALVYDSQH FVKLDAQNP	HFTLKCPI KLFLLCVG(EMSIECRE DMTIECVDGI SITFACI QLFFFCVG(2	KTALTEPPTLAYSPI QENEFMPLDGATSQ: .GGEFMPLDGA.KR LGGEFLPLEGATSS DGGTPLPSKLISEDI QDNNFMPVDGAAAF:	NRQ IC P A GIT LA.VCPMSATIK YPRVCSVSAIDK YPRVCHUAKDK DGL IVC HUASDGE LE.VCPLTAATK 3
TgSAG1	TT Q	η2 η .ee.	^{3β6} ⊥2→ Dom	ínio 1	η4 <u>Ι</u>	38 η5 <u>000</u> 120
TgSAG1 NcSRS67 NcSRS57 TgSRS57 NcSRS29C HHA_450490	SSC TSKAVTI AECDRNSTPI TDCDRNSQLI GDCERNKGFI DECEKNAAPI SECDSGKTPI 3	SS LIP EAEDS KN FLP RATER TE YLP KAQDI TD YIP GAKQY ST FLP GAKKE KT <u>FLP</u> YAADS	WWIGDSASL MERTLVLD WYTETFVDD WYKIEKVQN WVIGTLQQG WLDETLVPD	DTAGIKI SSDSKFVI NATYKFI NGEQSVLYKF IKI TLDHKLVI	TVPIEK FPVITQIF TIPPNGFPPARQOF KIPSDGFPPQKQQF TVPWIFLPPAKQQF TVPADGFPPVRQQF TVPADGFPVRQQF	VVGC IKGDDAQS KLGC.RAKGH.Y KVGC.RYIGNEY KVGC.RYPNHEY KVGC.KA.GKNV KLGC.GAKLGHY
TgSAG1	<u>β9</u>	β10 β11 → TT →		β12 ——→ тт	$\beta 13$ $TT \rightarrow \beta 14$	TT
TgSAG1 NcSRS67 NcSRS57 TgSRS57 NcSRS29C HHA_450490	CMVIVTVQAR CMLIVTVDPF CFIIVTVEPA CFVEVTVEPA CFVEVTVEPT CLUNVYVQSR CMLILTVEPF 1	ASSVVNNVAR SAAVDGORAN AAVVTROKAT PPMVEGKRVT ESEVTGOVAH RAVVRGOKAI	CSYGADSTL CAYSLPDPV CGYSEAEPV CGYSESGPV CAYSSNVRI CAYSASESG 4	GPVKLSAEGP SLQLSMSEEK NLELSMSEDN NLEVDLSKDA R.PTTVNPEN NLQLSMSVEK	TMTLVCGKDGVKV sitticCGKQHFPQ ssiaigCGENHFPQ sfietrCGEQHHPQ sgvtitcCGPDGKAF ssiasfAGNTTFPN 5	PQD.NNQYCSGT PSTYNLNYCAGS PSTYSLQYCSGQ PSTYLQYCSGD PDTYNNHHCT SRRTSCRTVRDR 6
TqSAG1	ΤΤ	5 η6 ▶ <u>οοο</u>	β17	β18	β19	
TgSAG1 NcSRS67 NcSRS57 TgSRS57 NcSRS29C HHA_450490	TLTGCNEK SVDPDQCAAS SVDPQHCVAQ SVDPQKCSPQ ELDECKER LWIHTGAQPS	SFKDILPKLT SMTEIFPTFS HMTKLFTNFS SLTNIFYDYS PYSAVFPGFS P	ENPWQGNAS ASWWKGKSN TKWWKGKPN SSWWKGKLN SSFWTGEAS	SDK <mark>G</mark> ATLTIKI SEQ G AVFTIPI SPA G IVFTIPI GVA G ATLTIPI GVA G ATLTIPI	KEAFPAESKSVIIG KGHFPSRATHFLVG EGEFPTKPTTFLVG PGGFPEEDKSFLVG KDQFPSTAQTIYLG	240 TGGSPEKHH.C SEKVDAGSF.C SSTVDAGPF.C SLTVDGPPF.C TGHPDDKQVTC
TgSAG1	<u>β20</u>				Âncora GPI	
TgSAG1 NcSRS67 NcSRS57 TgSRS57 NcSRS29C HHA_450490	TVKLEFAGAA NVKVSVAA NVRVNVAAR. NVKVRVAGNP VVPVNIEEVA	RKWGRGGGGH KPAGAGS	GSAK A SQEA PGSGGSQPE NPGGGSQPD	SAAGTASHVS TVTTTRAPSNO VGAERPSGTLY TDGETQAGTES QSSEKRDGEQV	280 IFAMVIGLIGSIAA GAESWRTDFAFVLS VSSASAPGIAFLSL SSAGASSRMASVAL VNKGKPPIGGSGGA	CVA AFALHLSTA VIVVGLHTVA AFLLGLLVHVAA TTGKQNASQNAK

5.2. Clonagem de NcSRS67 e NcSRS57

Com a retirada das sequências sinais N-terminal (peptídeo sinal) e GPI (Cterminal) em seus sítios de clivagem preditos, as formas maduras de NcSRS67 e NcSRS57 ficam constituídas por 290 resíduos de aminoácidos com massa molecular predita de 30.61 kDa e 282 aminoácidos e 31.14 kDa, respectivamente. As formas maduras de NcSRS67 e NcSRS57 foram amplificadas usando primers específicos representados em vermelho (Figura 12).

Figura 12. Sequências de aminoácidos das proteínas NcSRS67 e NcSRS57. Sequências de aminoácidos de NcSRS67 (A) e NcSRS57 (B). Grifado em cinza, estão representadas as regiões de peptídeo sinal (PS); em vermelho, as localizações dos *primers forward* e reverso utilizados para amplificar as sequências; em amarelo, as regiões correspondentes às âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Abaixo das sequências de aminoácidos de NcSRS67 e NcSRS57 estão as informações de pesos moleculares correspondentes as suas sequências completas, sem PS e sem a âncora de GPI e suas respectivas sequências amplificadas com a cauda de histidina (His).

A) MSLSFHKTSPRQRKQCTRQIYGVAFPSFVAVLFFVVAESVQIFVEAKGERLGTLKPLGKN RYSCVQEDGTGPNPGVGSIELNAQNPKLFLLCVGQENEFMPLDGATSQLAVCPMSATTKAEC DRNSTPLKNFLPRATERWMERTLVLDSSDSKFVLTIPPNGFPPARQQFKLGCRAKGHYCMLT VTVDPFSAAVDGQRANCAYSLPDPVSLQLSMSEEKNSITILCGKQHFPQPSTYNLNYCAGSS VDPDQCAASSMTEIFPTFSASWWKGKSNSEQGAVFTIPKGHFPSRATHFLVGCSEKVDAGSF CNVKVSVAAATVTTTRAPS<mark>NGAESWRTDFAFVLSAFALHLSTA</mark>

B) MFACPCSSGPAGLAKRSAPGRILFLVWFLVLSVLLVTGNNVSLVEAKKRNVTKKYFGTLE STGPNSYRCSPQEVAEEVVGAVVLSVKAPEMSIECREGGEFMPLDGAKRYPRVCSVSATD KTDCDRNSQLLTEYLPKAQDLWYTETFVDDNATYKFKIPSDGFPPQKQQFKVGCRYTGNE YCFITVTVEPAAAVVTRQKATCGYSEAEPVNLELSMSEDNNSIAIQCGENHFPQPSTYSL QYCSGQSVDPQHCVAQHMTKLFTNFSTKWWKGKPNSPAGTVFTIPEGEFPTKPTTFLVGC SSTVDAGPFCNVRVNVAARSQEAVGAER**PSGTLVSSASAPGIAFLSLVIVVGLHTVA**

Proteína NcSRS67: predito 38.13 kDa

NcSRS67 sem PS e sem GPI: predito 30.61 kDa

Fragmento NcSRS67 amplificado: 29 kDa NcSRS67 + 0.8 kDa da cauda His

Proteína NcSRS57: predito 38.67 kDa

NcSRS57 sem PS e sem GPI: predito 31.14 kDa

Fragmento NcSRS57 amplificado: 31 kDa NcSRS57+ 0.8 kDa da cauda His A amplificação da sequência gênica de NcSRS67 obtida a partir de DNA genômico de *N. caninum* revelou um fragmento pouco abaixo de 750 pb, conforme o predito de 687 pb (Figura 13A). O fragmento foi clonado em vetor pGEM-T-easy (Figura 13B) e ligado ao plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO-His/060700 (Figura 13C). O sequenciamento demonstrou que a sequência de nucleotídeos amplificada a partir da linhagem Nc-1 coincidiu (100% de identidade) com o gene putativo NcSRS67 (presente no ToxoDB (NcLIV_060700)) pertencente à linhagem Liverpool.

Figura 13. **Amplificação por PCR e clonagem do gene NcSRS67 de** *N. caninum*. Gel de agarose (0,8%). M=Marcador de massa molecular (em pares de bases pb). (A) A sequência NcSRS67 foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico de *N. caninum*, resultando em um fragmento de tamanho esperado (687 pb) (poço 1). (B) Digestão (com as enzimas HindIII e Xhol) do vetor de clonagem pGEM-T-easy (3015 pb) (poço 1; símbolo: & pGEM-T-easy) contendo o fragmento NcSRS67 (poço 1; símbolo: # fragmento NcSRS67). (C) Digestão do plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO-His/060700 (3700 pb) (com as enzimas de restrição HindIII e Xhol) contendo a sequência NcSRS67 (poço 1; símbolos: & plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO-His/060700 (3700 pb); # sequência NcSRS67 e * fragmento predito (clivagem por Xhol) do plasmídeo de expressão pCR-Blunt II-TOPO-His/060700).



A amplificação de NcSRS57, também obtida a partir de DNA genômico de *N. caninum*, gerou um fragmento pouco acima de 1000 pb, conforme o predito de 1074 pb (figura 14A). Este fragmento foi clonado em vetor pGEM-T-easy (figura 14B) e posteriormente ligado ao plasmídeo de expressão pET32 (figura 14C).

Figura 14. **Amplificação por PCR e clonagem do gene NcSRS57 de** *N. caninum*. Gel de agarose (0,8%). M=Marcador de massa molecular (em pares de bases pb). (A) A sequência NcSRS57 foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de *N. caninum,* resultando em um fragmento de tamanho esperado (1074 pb) (poço 1). (B) Digestão (com as enzimas BamHI e HindIII) do vetor de clonagem pGEM-T-easy (3015 pb) (poço 1; símbolo: & pGEM-T-easy) contendo o fragmento NcSRS57 (poço 1; símbolo: # fragmento NcSRS57). (C) Digestão do plasmídeo de expressão pET32 (com as enzimas de restrição BamHI e HindIII) contendo a sequência NcSRS57 (poço 1; símbolos: * plasmídeo de expressão pET32 (5900 pb) e # sequência NcSRS57).



5.3. Expressão, teste de solubilidade e purificação das proteínas SRS

5.3.1 Expressão, teste de solubilidade e purificação de rNcSRS67

A proteína recombinante rNcSRS67 foi expressa com cauda de histidina (His_{6x}) em *E. coli* BL21, e apresentou um massa molecular de aproximadamente 33 kDa (30.6 kDa predito) como determinado por SDS-PAGE (figura 15, poços 6 e 7, símbolo *), ao contrário do que foi observado no extrato total de *E. coli* contendo apenas um promotor de tubulina de *N. caninum* ligado ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x} (figura 16, poço 1). rNcSRS67 não foi detectada no extrato solúvel mediante utilização dos tampões Tris-HCl ou Triton 2% (figura 15, poços 1 e 2). A presença desta recombinante foi muito baixa quando solubilizada em tampões de 0,5, 1 e 2 M de ureia (figura 15, poços 3 a 5). rNcSRS67 foi predominante na extração com ureia acima de 4 M (figura 15, poços 6 e 7). Dessa forma, ficou evidente, portanto, o padrão de expressão nos corpos de inclusão de rNcSRS67.

Figura 15. **Expressão e teste de solubilidade da proteína recombinante rNcSRS67**. Gel SDS-PAGE (12,5%) corado por Coomassie G com extratos de BL21 com plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x} contendo o fragmento NcSRS67 sem IPTG. Poço 1: amostra solubilizada em tampão Tris-HCI 50 mM; poço 2: amostra solubilizada em tampão Triton 2%; poços 3, 4, 5, 6 e 7: amostras solubilizadas em tampão ureia 0,5, 1, 2, 4 e 8 M, respetivamente. Poços 6 e 7: proteína recombinante rNcSRS67. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 20, 25, 30, 50 e 70.



A recombinante rNcSRS67 comparada com seu controle de expressão (figura 16, poços 2 e 1, respectivamente), foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ (figura 16, poços 4 a 6) e usada para imunizar animais para produção de antissoro policional. A fração contendo extrato total de BL21 solubilizada em tampão ureia 6,5 M não se ligou à resina de Ni²⁺ (figura 16, poço 3). O plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x} contendo o fragmento rNcSRS67 em BL21 induzido ou não com IPTG apresentou o mesmo padrão de expressão, demonstrando dessa forma que ocorreu autoindução (dados não mostrados). Embora a recombinante

rNcSRS67 tenha sido obtida sob condições nativas (forma solúvel) após uma lavagem adicional com tampão nativo (Tris-HCI 50 mM, 600 mM NaCI, 50 mM imidazol, pH 7,5) e eluída com tampão de eluição nativo (Tris-HCI 50 mM, 600 mM NaCI, 250 mM imidazol, pH 7,5) (dados não mostrados), optou-se por realizar a solubilização da forma insolúvel desta proteína sob condições desnaturantes através de métodos para solubilização dos corpos de inclusão, de modo que a sonicação em tampão ureia 8 M foi o método que exibiu, comparativamente, maior quantidade de proteína (figura 16, poços 4 a 6).

Figura 16. Expressão e purificação da proteína recombinante rNcSRS67 de *N. caninum*. Gel SDS-PAGE (12,5%) corado com Coomassie G. A proteína rNcSRS67 foi expressa constitutivamente (sem IPTG) por 2 horas a 37°C e foi solubilizada em tampão desnaturante ureia 8 M pH 4,5 ou tampão nativo (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 600 mM NaCl, 250 mM imidazol) apresentando-se como uma banda de aproximadamente 33 kDa (30.6 kDa predito). Poço 1: controle da expressão de rNcSRS67 (Plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x} contendo uma região promotora de tubulina de *N. caninum* e sem a sequência NcSRS67); poço 2: proteína recombinante rNcSRS67 ligada ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x} e solubilizada em tampão ureia 8 M, representada como uma banda de 33 kDa; poço 3: extrato total de BL21 não ligado à resina de níquel (Ni²⁺); poços 4, 5 e 6: Plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO-His_{6x}/NcSRS67 expresso constitutivamente como um fragmento de aproximadamente 33 kDa purificado sob condições desnaturantes. Símbolo: # recombinante rNcSRS67 que interagiu com a resina de Ni²⁺. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 20, 25, 30, 50 e 70.



5.3.2 Expressão, teste de solubilidade e purificação de rNcSRS57

A expressão induzida com IPTG da recombinante rNcSRS57 em *E. coli* BL21 foi visualizada como uma banda mais intensa de 19,5 kDa (figura 17 poço 3), quando comparada ao controle da expressão sem IPTG (figura 17, poço 4). Dessa forma, o fragmento rNcSRS57 foi expresso com massa molecular abaixo do predito de 31.14 kDa (sem o peptídeo sinal e sem a âncora de GPI). O fragmento recombinante rNcSRS57 ligado ao plasmídeo pET32 induzido ou não com ITPG (1 mM) não foi visualizado no extrato solúvel quando submetido à ação de um gradiente Tris-HCI 50 mM (figura 17, poços 1 e 2). Dessa forma, rNcSRS57 permaneceu predominante nos corpos de inclusão obtidos no extrato total por sonicação em tampão ureia 8 M na concentração de 1 mM de IPTG (figura 17, poço 3).

Figura 17. **Expressão da proteína recombinante rNcSRS57**. Gel SDS-PAGE (12,5%) corado com Coomassie G com extrato de BL21 com plasmídeo pET32 contendo o fragmento NcSRS57 induzido ou não com 1 mM de IPTG por 2 horas a 37°C. Poços 1 e 2: amostras induzida (IND) e não induzida (NI), respectivamente, solubilizadas em tampão Tris-HCl 50 mM; poços 3 e 4: amostras induzida (IND) e não induzida (IND) e não induzida (NID) e não e nas



rNcSRS57 foi expressa com um massa molecular abaixo do predito, possivelmente devido a uma mudança de fase de leitura do ribossomo, avançando uma base na direção 5', gerando consequentemente uma mudança de códon, no caso, um stop códon oculto (figura 18). Entretanto, a busca por 'BLAST realizado com o sequenciamento do fragmento clonado (contendo 1074 pb) ligado ao plasmídeo de expressão pET32 (figura 14), revelou identidade com o gene (ID NcLIV_060660) depositado no banco de dados Toxo DB. Isso corroborou para a hipótese de mudança de códon, de modo que houve um truncamento da expressão de NcSRS57.

Figura 18. **Representação de parte do fragmento NcSRS57 traduzido em BL21**. O escorregamento de sítios específicos do ribossomo entre 122º e 123º pb na sequência NcSRS57, levou a uma mudança de códon e consequentemente a interrupção da tradução e expressão da sequência íntegra do recombinante rNcSRS57. Dessa forma apenas parte deste fragmento contendo 92 pb (NcSRS57₃₁₋₁₂₂) foi expresso com uma maior abundância em pET32 sob indução de 1mM de IPTG. A região indicada por asteriscos à esquerda da sequência, representa o início da sequência NcSRS57 que contém 30 pb; a região pontilhada à direita da sequência, representa o fragmento restante de NcSRS57 até o *primer* reverso; a barra preta localizada acima dos nucleotídeos, representa o fragmento de NcSRS57 que foi traduzido; a barra vermelha indica o *primer foward*; os números 31 e 122 na sequência, indicam a base inicial e final, respectivamente, do fragmento traduzido em maior abundância, e os nucleotídeos em vermelho indica a sequência reconhecida como *stop códon*. A letra i representa o que seria a leitura normal do códon durante o processo de tradução e i + 1 representa a mudança de fase que ocorreu, gerando um stop códon oculto.



Baseado na expressão da proteína recombinante e no sequenciamento do plasmídeo, a banda de 19,5 kDa corresponde a 3.1 kDa da proteína NcSRS57, com 11.80 kDa correspondente a tireodoxina e 5.92 correspondente a associação de trombinas, enteroquinases e cauda de histidina.

A purificação da rNcSRS57 em resina de níquel (figura 19, poços 1 a 5) revelou não só a banda de 19,5 kDa (figura 19, poço 4, símbolo #), como também uma outra banda com massa molecularde aproximadamente 40 kDa, próxima ao massa molecularpredito da sua forma nativa que é de 38.67 kDa (figura 19, poço 4, símbolo &), e a mesma massa molecular correspondente a esta mesma proteína em *T. gondii* (KANALINHA et al., 2014; SUDAN et al., 2015).

Figura 19. **Purificação da proteína recombinante rNcSRS57**. Gel SDS-PAGE (12,5%) corado por Coomassie G. A proteína rNcSRS57 foi expressa sob ação de um indutor (IPTG, 1 mM) por 2 horas a 37°C e solubilizada em tampão desnaturante ureia 8 M pH 4,5 e purificada em coluna de Ni²⁺, apresentando-se como uma banda de aproximadamente 17 kDa (predito 31.14 kDa). O retângulo vermelho indica diferentes alíquotas contendo rNcSRS57 purificadas em coluna de Ni²⁺. Poços 1 a 3: alíquotas eluídas com 250 mM imidazol em ureia 8 M pH 4,5 contendo rNcSRS57 e outros produtos de BL21; poço 4; alíquota eluída com 250 mM de imidazol em ureia 8 M pH 4,5 contendo a maior proporção de outros produtos de BL21; seta inferior: banda com massa molecular de 19,5 kDa (submetida à identificação por espectrometria de massas); seta superior: banda com massa molecular de aproximadamente 40 kDa (massa molecular predita 38.67 kDa); poço 5; alíquota eluída com 250 mM de imidazol em ureia 8 M pH 4,5 contendo a manor proporção de rNcSRS57. M: Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40 e 50.



5.4. Identificação das proteínas recombinantes por espectrometria de massas

5.4.1 Identificação de rNcSRS67

A banda correspondente à proteína rNcSRS67 (figura 16, poço 6) foi submetida a tripsinização e a fragmentação inicial do tipo MS resultou em vários picos com diferentes intensidades (figura 20). Dentre estes picos obtidos, foi possível selecionar aquele de maior intensidade cuja relação massa/carga foi de 1525,891 e posteriormente fragmentá-lo para o espectro do tipo MS/MS.

Figura 20. Espectro de fragmentação (MS) dos peptídeos trípticos mais intensos obtidos para a proteína recombinante rNcSRS67 de *N. caninum*. O peptídeo de maior intensidade indicado pela seta vermelha foi posteriormente submetido à fragmentação por MS/MS possibilitando a identificação da proteína NcLIV_060700 através de um banco de dados curado do Mascot.



O espectro de fragmentação (MS/MS) do pico de maior intensidade representado na figura 20 gerou um *hit* significativo (Score 42), com massa molecular predita de 38845 Da e o seguinte peptídeo K.FVLTIPPNGFPPAR.Q, correspondente a 7% do gene NcSRS67 (depositado no banco de dados ToxoDB com a denominação de NcLIV_060700), confirmando dessa forma, a expressão constitutiva dessa proteína (Figura 21).

Figura 21. Identificação da proteína recombinante rNcSRS67 de *N. caninum* por MS/MS (score 42). Os dados MS/MS obtidos da análise da banda purificada de rNcSRS67 foram analisados em um banco de dados predito de proteínas de *N. caninum* usando o sofware Mascot versão 2.3.02 (Matrix Science). A carbamidometilação da cisteína e a oxidação da metionina foram definidas como modificações variáveis e fixas, respectivamente.



5.4.2 Identificação de rNcSRS57

A análise por espectrometria de massas da banda representada na figura 19 (poço 4, símbolo #), contra um bando de dados curado do Toxo DB-28 contendo proteínas de *N. caninum*, não gerou identificações. Entretanto, a análise da mesma amostra em um banco de dados predito de proteínas do SwissProt, gerou hit significativo com score de 308, massa de 11913 Da e os seguintes peptídeos R.GIPTLLLFK.N, K.IIHLTDDSFDTDVLK.A, K.MIAPILDEIADEYQGK.L, confirmando dessa forma a identificação de uma tiorredoxina de *E. coli* (figura 22).

Figura 22. Análise da proteína recombinante rNcSRS57 de *N. caninum* por MS/MS (score 308). Os dados foram obtidos contra um banco de dados predito de proteínas do SwissProt, disponível online (<u>www.matrixscience.com</u>), usando o sofware Mascot versão 2.3.02 (Matrix Science). A carbamidometilação da cisteína e a oxidação da metionina foram definidas como modificações variáveis e fixas, respectivamente.



5.5. Reatividade dos anticorpos policionais por ensaio imunoenzimático (ELISA)

5.5.1 Reatividade do anticorpo policional anti-rNcSRS67

O soro produzido contra a recombinante rNcSRS67 foi avaliado quanto a capacidade de reconhecer a proteína nativa devido a mesma sequência primária de aminoácidos. Foi observada uma forte reação com a sua respectiva forma recombinante (figura 23A e 23C), porém os anticorpos não reagiram com sua forma nativa presente no extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (figuras 23B e 23D).

Figura 23. Avaliação da reatividade do soro policional anti-rNcSRS67 por ELISA. (A) e (C) Proteína recombinante rNcSRS67 incubada com soros produzidos contra rNcSRS67 (barra preta), extrato total de *N. caninum* (barra quadriculada) ou ureia (barra branca) nas diluições seriadas de 1:1000; 1:2.000; 1:4.000 e 1:8.000. (A) Conjugado 1:2.500 e (C) conjugado 1:20.000. (B) e (D) Extrato total de *N. caninum* incubado com soro produzido contra rNcSRS67 (barra preta), extrato total de *N. caninum* (barra quadriculada) ou controle negativo ureia (barra branca) nas diluições seriadas de 1:1000; 1:2.000; 1:4.000 e 1:8.000. (B) Conjugado 1:2.000; 1:4.000 e 1:8.000. (B) Conjugado 1:5.000 e (D) conjugado 1:10.000. * indica p < 0,05 em relação ao soro controle (anti-ureia).



Antígeno: Recombinante anti-rNcSRS67



5.5.2 Reatividade do anticorpo policional anti-rNcSRS57

Semelhantemente ao que foi verificado para o anticorpo policional produzido contra a recombinante rNcSRS67, o soro anti-rNcSRS57 reagiu fortemente com a sua respectiva forma recombinante (figura 24A e 24C), porém, também reagiu com sua forma nativa presente no extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (figuras 24B e 24D).

Figura 24. **Avaliação da reatividade do anticorpo policional anti-rNcSRS57 por ELISA**. (A) e (C) Proteína recombinante rNcSRS57 incubada com soro produzido contra rNcSRS57 (barra preta), extrato total de *N. caninum* (barra quadriculada) ou ureia (barra branca) nas diluições seriadas de 1:1000; 1:2.000; 1:4.000 e 1:8.000. (A) Conjugado 1:2.500 e (C) conjugado 1:20.000. (B) e (D) Extrato total de *N. caninum* incubado com soro produzido contra rNcSRS57 (barra preta), extrato total de *N. caninum* (barra quadriculada) ou ureia (barra du le rncSRS57 (barra preta), extrato total de *N. caninum* (barra quadriculada) ou ureia (barra branca) nas diluições seriadas de 1:1000; 1:2.000; 1:4.000 e 1:8.000. (B) Conjugado 1:5.000 e (D) conjugado 1:10.000. * indica p < 0,05 em relação ao soro controle (anti-ureia).



Antígeno: Recombinante anti-rNcSRS57

Antígeno: Extrato total

5.6 Análise das proteínas NcSRS67 e NcSRS57 por SDS-PAGE, *western blot* (WB) 1D e 2D, e espectrometria de massas

5.6.1 Western blot 1D da proteína NcSRS67

Ao contrário da falta de reatividade com as proteínas nativas ao ELISA, ao *western blot* o anticorpo policional anti-rNcSRS67 detectou as formas nativa e recombinante dessa proteína: a recombinante com massa molecular de 33 kDa (figura 25, poço C) e a nativa, com peso de 35 kDa (próximo aos 38 kDa predito, figura 25, poço B). Ainda foi possível observar que o soro anti-rNcSRS67 não reagiu com o extrato total de células Vero, o controle negativo (figura 25, poço A), demonstrando dessa forma que a produção de anticorpos contra proteínas de Vero não foi significativa.

Figura 25. Reatividade do soro policional anti-rNcSRS67 com as proteínas nativa e recombinante rNcSRS67. O *western blot* foi feito em gel SDS-PAGE 12,5% e revelado em filme radiográfico. Soro anti-rNcSRS67 foi incubado com os seguintes extratos: (A) Extrato total de células Vero (1/5.000, conjugado 1/2.000). (B) Extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (1/5.000, conjugado 1/2.000). (C) Proteína recombinante rNcSRS67 (1/200.000, conjugado 1/2.000). Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 35 e 50.



5.6.2 Western blot 2D de NcSRS67

Apesar de detectada uma única banda de 35 kDa no *western blot* 1D (figura 25B), por *western blot* 2D foram observados dois spots distintos no extrato total de taquizoítas de *N. caninum* com 36,7 e 35,8 kDa e ponto isoelétrico (pl) de aproximadamente 5.3 (pl predito 7.11 sem peptídeo sinal (figura 26A, setas 1 e 2, respectivamente). Além disso, foi possível observar também a presença de um fileira horizontal de spots com pl variando entre 5.4 e 6.0, aproximadamente, e massa

molecular na faixa de 35 kDa (figura 26A, sinal representado acima da linha horizontal). Alguns spots de Vero foram reconhecidos pelo soro anti-rNcSRS67 (figura 26B), entretanto nenhum coincidiu com os spots preditos para NcSRS67 no extrato total de *N. caninum*.

Figura 26. **Detecção da proteína nativa NcSRS67**. *Western blot* 2D foi realizado em gel SDS-PAGE 12,5%, *strips* IPG 7 cm com pH 3-11 NL e revelado em filme radiográfico. O soro anti-rNcSRS67 foi utilizado sobre extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (A, 1/5.000) e controle sobre extrato total de células Vero (B). Seta 1: spot com massa molecularestimado em 36,7 kDa; seta 2: spot com massa molecular estimada em 35,8 kDa. (A) Linha horizontal: spots em fileira o. Em (B) estão representados os spots de Vero que reagiram com o anticorpo produzido contra rNcSRS67, delimitados por círculos.. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40 e 50.



5.6.3 Western blot 1D da proteína NcSRS57

A proteína recombinante rNcSRS57 foi revelada sob a forma de duas bandas, uma delas com massa molecular de 19,5 kDa, contendo possivelmente um fragmento de 3,1 kDa desta recombinante (conforme esquematizado na figura 18 após sequenciamento do plasmídeo) e uma outra banda com peso de 40 kDa (predito 31.14 kDa sem peptídeo sinal e sem âncora GPI, figura 27C). A forma nativa de NcSRS57 foi revelada como uma banda mais intensa de 43 kDa (peso predito 38.67 kDa), havendo também a revelação de outras bandas de 12, 15, 17 e 100 kDa (figura 27B). No controle com extrato total de células Vero não houve reação com a banda correspondente à NcSRS57 nativa, apenas reação com outras bandas de pesos moleculares distintos (15, 30, 38, 45 e 70 kDa, figura 27A).

Figura 27. Reatividade do soro policional anti-rNcSRS57 com as proteínas nativa e recombinante rNcSRS57. O *western blot* foi feito em gel SDS-PAGE 12,5% e revelado em filme radiográfico. Soro anti-rNcSRS57 foi incubado com os seguintes extratos: (A) Extrato total de células Vero (1/5.000). (B) Extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (1/5.000). (C) Proteína recombinante rNcSRS57 (1/60.000, conjugado 1/2.000). Os símbolos *, & e #, representam a proteína nativa NcSRS57, a proteína recombinante rNcSRS57 e um fragmento de aproximadamente 3.1 kDa desta recombinante expresso em pET32, respectivamente. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 50, 70 e 100.



5.6.4 Western blot 2D de NcSRS57

Condizente com o resultado que foi observado através de *western blot* 1D, a análise por *western blot* 2D da forma nativa deste mesmo antígeno revelou dois

spots: um com massa molecular de aproximadamente 43 kDa e o outro com massa molecular estimada em 19,5 kDa, delimitados pelos retângulos 1 e 2, respectivamente (figura 28A). Estes spots apresentaram pl de aproximadamente 8.3 e 7.6 (figura 28A, spots 1 e 2, respectivamente). Além disso, à semelhança do que foi observado no *western blot* 2D correspondente a análise da proteína NcSRS67 (Figura 26A), o *western blot* 2D da proteína NcSRS57 também revelou um sinal sob a forma de uma fileira de spots, mas abaixo de 35 kDa e ponto isoelétrico (pl) estimado entre 6.0 e 7.5 (figura 28A, indicado por uma linha horizontal). Foi possível observar também que alguns spots de Vero foram reconhecidos pelo soro anti-rNcSRS57, de modo que um deles (delimitado pelo círculo com o número 3) apresentou massa molecular (19,5 kDa) equivalente ao peso do spot 2 no extrato total de *N. caninum* (figura 28B), indicando que seja de proteínas Vero.

Figura 28. **Detecção da proteína nativa NcSRS57**. *Western blot* 2D foi realizado em gel SDS-PAGE 12,5%, *strips* IPG 7 cm com pH 3-11 NL e revelado em filme radiográfico. Foram utilizados o soro anti-rNcSRS57 sobre extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (A, 1/1000) e controle sobre extrato total de células Vero (B). (A) Retângulo 1: spot com massa molecular estimada em 43 kDa; retângulo 2: spot com massa molecular estimada em 19,5 kDa; Linha horizontal: spots em fileira. Em (B) estão representados os spots de Vero que reagiram com o anticorpo produzido contra rNcSRS57, delimitados por círculos. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40 e 50.



5.7 Eletroforese bidimensional (2D) para identificação de NcSRS67

A digestão tríptica de 13 spots localizados em regiões próximas de onde foi verificado o sinal da forma nativa do antígeno NcSRS67 (western blot 2D, figura 26A) revelou a identificação de 11 proteínas diferentes (figura 29), porém não foi obtida identificação da forma nativa de NcSRS67. Por outro lado, foi possível identificar outras proteínas de superfície da superfamília SRS, como as proteínas NcSRS29B (SAG1) e NcSRS29C (SRS2), além de revelar também a identificação de proteínas provenientes de estruturas internas de *N. caninum* (tabela 3).

Figura 29. **SDS-PAGE bidimensional (2D) do extrato total de taquizoítas (ET) de** *N. caninum* e controle de células Vero para detecção da proteína nativa NcSRS67. (A) ET de *N. caninum*. (B) Controle de células Vero (controle negativo). No gel (A) estão representados os spots numerados de 1-13 que foram excisados e submetidos à digestão tríptica para identificação das proteínas de *N. caninum* por espectrometria de massas. Gel SDS-PAGE 12,5%, *strips* IPG 7 cm com pH 3-11 NL. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40 e 50.



Além das proteínas SRS mais abundantes em *N. caninum* (SRS29C e SRS29B), foram identificadas também outras proteínas não relacionadas, como Tg MLC1 (Miosina putativa cadeia leve) e MIC6 (Proteína micronêmica), dentre outras (tabela 3).

Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) dos spots marcados na figura 29A. Na tabela estão indicados: número do spot tripsinizado; o nome da proteína identificada de acordo com o banco de dados ToxoDB; a massa molecular predita da proteína; o score de identificação baseado nos parâmetros do programa Mascot; o peptídeo identificado por (MS/MS) e o número de acesso da proteína no banco de dados ToxoDB.

Spot	Nome proteína	Massa (Da)	Score	Peptídeo	N° Acesso ToxoDB
	Proteína SRS (NcSRS29B)	33800	79	K.SVSSPEVYCTVQVEAER.A	NcLIV_033230
1	Proteína hipotética	125633	29	R.LDAHAGVGGETEGELSLAE VTR.L	NcLIV_035480
2	Proteína SRS (NcSRS29B)	33800	79	K.SVSSPEVYCTVQVEAER.A	NcLIV_033230
	Proteína SRS (NcSRS29B)	33800	322	1.K.FSADWWQGKPDTK.D 2.K.CPDNSTAVPAALGYPTNR. T	NcLIV_033230
				3.K.SVSSPEVYCTVQVEAER.A	
3	Proteína homóloga 14-3-3	30850	253	1.K.ATETAEAELPSTHPIR.L 2.R.DNLTLWTSDLQADQQQQ EGGEKPAEQADQ	NcLIV_024820
4	Proteína SRS (NcSRS29B)	33800	48	K.SVSSPEVYCTVQVEAER.A	NcLIV_033230
	Produto não especificado	22595	303	1.K.TVASEDSALGNSEEQYVE GTVNGSSDPEQER.A 2.R.AYAGVSNYDGDDDAAGN PVDSDVTDDAITDGEWPR.V	NcLIV_021640
5	Proteína hipotética	21082	103	3.K.LPTESYVAPPVWIR.R	NcLIV_035220
	Catepsina L, relacionada	47002	62	4.K.NSWGSGWGR.D	NcLIV_004380
				1.K.TVASEDSALGNSEEQYVE GTVNGSSDPEQER.A	
6	Produto não especificado	22595	353	2.K.TVASEDSALGNSEEQYVE GTVNGSSDPEQER.A	NcLIV_021640
				3.R.AYAGVSNYDGDDDAAGN PVDSDVTDDAITDGEWPR.V	
7	Miosina putativa cadeia leve TgMLC1	24941	95	R.ESADAYGDVCDSPSCR.Q	NcLIV_029420

8	Produto não especificado	22595	393	1.K.TVASEDSALGNSEEQYVE GTVNGSSDPEQER.A 2.R.AYAGVSNYDGDDDAAGN	NcLIV_021640
8	Produto não especificado	20577	84	3.R.GYTSYGEPPVAVGTSEEY VNSSELAGSR.D	NcLIV_052880
9	Proteína hipotética conservada	39625	149	1.R.FPEDYTGIEFPFK.T 2.K.EFESFAVSMLTDNGEVLR. F	NcLIV_034020
10	Proteína micronêmica putativa MIC6	35162	125	R.TLEWSLCENNACGPANAVQ ECR.P	NcLIV_061760
11	Proteína SRS (NcSRS29C)	42896	59	K.NVCLLNVYVQSR.E	NcLIV_033250
40	Proteína SRS (NcSRS29C)	42896	67	R.LRPITVNPENNGVTLICGPD GK.A	NcLIV_033250
12	Nova proteína (Zgc:66430), relacionada	32301	37	K.IPGFWCR.C	NcLIV_041100
13	Proteína relacionada à Rcn2-prov,	39265	123	1.R.FPEDYTGIEFPFK.T 2.K.EFESFAVSMLTDNGEVLR. F	NcLIV_030420

5.8. Ensaio de invasão/adesão in vitro

Os efeitos inibitórios dos soros policionais anti-rNcSRS67, anti-rNcSRS57 e a associação destes sobre a invasão/adesão de taquizoítas foram investigados *in vitro*. A ação destes soros resultou em uma inibição de 20% para o anticorpo anti-rNcSRS67, 16% para o anticorpo anti-rNcSRS57 e 11% para a associação destes dois anticorpos. O soro obtido antes da primeira imunização com as recombinantes rNcSRS67 ou rNcSRS57 (controle pré-imune), inibiu a invasão em 4%. Por outro lado, observou-se também que o soro anti-extrato total de Nc, o soro obtido de animais imunizados com extrato total de taquizoítas de *N. caninum*, superou o efeito inibitório de todos os outros soros investigados neste trabalho, atingindo 26% de inibição sobre a invasão/adesão de taquizoítas às células Vero (figura 30).

Figura 30. Inibição dos soros policionais anti-NcSRS67 e anti-NcSRS57 sobre a invasão/adesão in vitro de taquizoítas de *N. caninum*. Taquizoítas NcLacZ foram incubados com diferentes soros (1/100) por 1 h antes da invasão/adesão de células Vero. Após lavagem em PBS, os parasitas foram incubados por 2 h para invasão celular. Os taquizoítas que invadiram/aderiram foram avaliados por absorbância x número de taquizoítas em 570 nm. A coluna branca representa o soro de camundongos obtido antes do primeiro procedimento de imunização (pré-imune), a coluna preta representa o soro anti-rNcSRS67, a coluna em xadrez representa o soro anti-rNcSRS57 e a coluna pontilhada representa a associação dos soros anti-rNcSRS67/anti-rNcSRS57 e a coluna com ranhuras representa o soro anti-extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Os valores foram representados como média \pm desvio padrão. Valores de *P*<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. **P*<0.05 em comparação ao soro pré-imune. Os valores representados no gráfico são provenientes de 3 diferentes ensaios independentes realizados em diferentes dias.



5.9. Localização de NcSRS67 e NcSRS57 em taquizoítas de N. caninum

A proteína NcSRS67 foi localizada sobre parte da superfície de taquizoítas de *N. caninum* (figura 31A) quando comparado com taquizoítas incubados com soro produzido contra extrato total de taquizoítas, o qual foi capaz de marcar toda a superfície do parasita (figura 31B). A proteína nativa NcSRS57, em contraste ao que foi observado para a proteína NcSRS67, foi localizada em toda a superfície dos taquizoítas de *N. caninum* (figura 32A) e, semelhantemente ao que foi observado na figura 31B, os parasitas incubados com soro produzido contra extrato total (controle

positivo) apresentaram toda a sua superfície marcada (figura 32B). Nos dois casos, nenhuma fluorescência foi detectada quando o soro controle (anti-ureia) foi usado como controle sobre taquizoítas apenas do núcleo pelo iodeto de propídeo (figura 31C e 32C).

Figura 31. Localização por imunofluorescência de NcSRS67 sobre a superfície de taquizoítas de *N. caninum*. Microscopia confocal realizada em taquizoítas extracelulares de *N. caninum* não permeabilizados e fixados em lâmina, os quais foram incubados com soros policlonais de camundongos anti-rNcSRS67 (A) ou anti-extrato total de taquizoítas (B) ou anti-ureia, usado como controle negativo (C) e visualizados com anticorpo secundário Alexa Fluor[®] 488 anti-camundongo IgG. Da esquerda para a direita, a primeira coluna representa o contraste de fase; a segunda coluna, a marcação do núcleo com iodeto de propídeo; a terceira coluna, a marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e a quarta coluna, a sobreposição entre a marcação com iodeto de propídeo e Alexa Fluor 488. Barra = 5 μ m.



Figura 32. Localização por imunofluorescência de NcSRS57 sobre a superfície de taquizoítas modificados de *N. caninum*. Taquizoítas extracelulares não permeabilizados e fixados em lâmina foram marcados com soros de camundongos anti-rNcSRS57 (A) ou anti-extrato total de taquizoítas (B) ou anti-ureia, usado como controle negativo (C) e visualizados com anticorpo secundário Alexa Fluor[®] 488 anti-camundongo IgG. Da esquerda para a direita, a primeira coluna representa o contraste de fase; a segunda coluna, a marcação do núcleo com iodeto de propídeo; a terceira coluna, a marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e a quarta coluna, a sobreposição entre a marcação com iodeto de propídeo; a terceira secundário entre a marcação com iodeto de propídeo; barra = 5 μ m.



5.10. Teste de ancoragem por GPI de NcSRS57 e outras SRSs através da clivagem com fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC)

A localização da forma nativa de NcSRS57 sobre a superfície de taquizoítas de *N. caninum* é condizente com proteínas de superfície ancoradas à GPI. Para checar esta hipótese, taquizoítas foram tratados com fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC) e comparados com um grupo não tratado (controle). A proteína NcSRS57 foi detectada sobre a superfície daqueles taquizoítas incubados com anticorpo produzido contra rNcSRS57 e não tratados com PI-PLC (figura 33A), diferente do que foi observado no grupo de taquizoítas tratados com PI-PLC, onde houve a remoção quase que integralmente da marcação fluorescente, indicando associação da proteína NcSRS57 à superfície dos taquizoítas (figura 33B).

Figura 33. Efeito do tratamento de taquizoítas de *N. caninum* com fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC). (A) taquizoítas extracelulares não tratados com PI-PLC, fixados em lâmina e visualizados com anticorpo anti-rNcSRS57/Alexa Fluor 488. (B) taquizoítas extracelulares tratados com PI-PLC por 2 horas, fixados em lâmina e visualizados com anticorpo anti-rNcSRS57/Alexa Fluor 488. A primeira coluna representa as imagens de contraste de fase; a segunda coluna mostra a marcação do núcleo com iodeto de propídeo em vermelho; a terceira coluna mostra a marcação da proteína NcSRS57 com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 em verde e a quarta coluna representa as imagens sobrepostas citadas anteriormente. Barra = 5 μ m.



Com intuito de identificar a forma nativa da proteína NcSRS57, o sobrenadante de taquizoítas digeridos com PI-PLC foi aplicado em um gel SDS-PAGE revelando uma banda de aproximadamente 35 kDa (figura 34A, poço 2). A análise dessa mesma amostra por *western blot* com anticorpo anti-rNcSRS57, também revelou uma banda com massa molecular de aproximadamente 35 kDa, próximo a massa molecular predita da proteína NcSRS57 (predito 31.14 kDa sem peptídeo sinal e sem a âncora GPI) (figura 34B, poço 2). Por outro lado, nenhuma banda de proteína foi detectada no sobrenadante de taquizoítas não digeridos com a enzima PI-PLC (figura 34B, poço 1).

Figura 34. Análise dos sobrenadantes obtidos a partir do extrato total de taquizoítas incubados ou não com a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC). (A) SDS-PAGE 1D 12,5%, corado com Coomassie G; o sinal negativo (-) representa o sobrenadante de taquizoítas de *N. caninum* obtido sem o tratamento com PI-PLC e o sinal (+), representa o sobrenadante de taquizoítas obtido após o tratamento com a enzima. (B) *Western blot* a partir de gel SDS-PAGE 1D 12,5% e revelado em filme radiográfico; (-) revelação resultante da amostra 25A, poço 1; (+) revelação resultante da amostra 25A, poço 2. Marcador de massa molecular à esquerda indicando 10, 15, 25, 35, 40 e 50 quilodáltons (kDa).



A digestão tríptica da banda representada na figura 34A (poço 2), seguida de análise por espectrometria de massas (MS/MS) e buscas contra os bancos de dados de *N. caninum* e *T. gondii*, gerou a identificação de sete proteínas de *N. caninum*
(tabela 4). Dentre as proteínas identificadas em *N. caninum*, duas delas foram de via metabólica envolvidas no processo de glicólise (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase), uma proteína homóloga 14-3-3, uma proteína codificadora do fator de alongamento 1 alfa, uma proteína codificadora de um produto não especificado e uma das SRS mais abundantes em *N. caninum*, a proteína NcSRS29B (SAG1) (tabela 4).

Tabela 4. Proteínas de *N. caninum* identificadas por espectrometria de massas (*Synapt G2*) a partir da tripsinização da banda representada na figura 34A, poço 2. Na tabela estão indicados: o nome da proteína identificada de acordo com o banco de dados ToxoDB; a massa molecular predita da proteína; o score de identificação baseado nos parâmetros do *software Protein Lynx Global Server* (PLGS); o peptídeo identificado por (MS/MS) e o número de acesso da proteína no banco de dados ToxoDB.

Nome proteína	Massa (Da)	Score	Peptídeo	N° Acesso ToxoDB
14-3-3 proteina homóloga	30869,37	410	ATETAEAELPSTHPIR NLLSVAYK LSVAYK TAEAELPSTHPIR	NcLIV_024820
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	36818,26	326	SAGVNIIPASTGAAK VPVADVSVVDLTCK YEDIVAAVK	NcLIV_041940
Malato desidrogenase (NAD) (precursor)	36158,74	218	FIQDGIVTEQQLK YVADALSVSPR SVDDVVALNK NDLLPFNSK	NcLIV_032330
Proteína SRS (SRS29B)/SAG1	33821,32	121	SFDVGCVSSDASK LTIPEASFPTTSK	NcLIV_033230
Produto não especificado	67108,05	118	EGEYSEFTFGR GFEPPETTDPSR EASAYDDLVSR GPSAIVFEATDR	NcLIV_001970
Fator de alongamento 1 alfa	49392,12	64	IGGIGTVPVGR LPLQDVYK	NcLIV_001670
Fator de alongamento 1 alfa	49392,12	64	IGGIGTVPVGR LPLQDVYK	NcLIV_014180

5.11. Seleção de bacteriófagos com afinidade pela proteína rNcSRS57

Ainda em busca da identificação da forma nativa da proteína NcSRS57 nativa, foi realizado um ensaio entre uma biblioteca de bacteriófagos e a recombinante

rNcSRS57. Desta forma, pretendeu-se selecionar fagos contendo peptídeos ligantes de rNcSRS57. Após quatro rounds de seleção dos bacteriófagos com maior afinidade pela proteína rNcSRS57 (PRECIPITADO BAC, item 4.18.2), quatro clones de fagos foram randomicamente selecionados para detecção. Os clones selecionados a partir da interação entre a biblioteca inicial de fagos com a proteína rNcSRS57 (grupo 1) apresentaram reatividade com aproximadamente o dobro da densidade ótica apresentada pelo grupo controle (grupo 2, grupo contendo apenas rNcSRS57) em um ensaio ELISA (figura 35, grupo 1 comparado com grupo 2 ou grupo 3). O quarto clone (grupo 1), foi o que apresentou maior afinidade pela proteína rNcSRS57, com absorbância de 1,93 nm contra 0,84 nm do grupo controle (grupo 2) (figura 35).

Figura 35. Ensaio ELISA para determinação de atividade entre fago e a proteína rNcSRS57. A proteína recombinante purificada rNcSRS57 ligada a uma biblioteca de fagos contendo peptídeos com maior afinidade por este antígeno de superfície foi detectada com anticorpo anti-rNcSRS57 (1:2.000) conjugado com anticorpo anti-camundongo IgG-Peroxidase (1:5.000). As colunas em preto representam o pool gerado ao final de guatro seleções entre uma biblioteca de fagos M13 e a recombinante rNcSRS57 replicados em E. coli M91. As colunas em branco representam a primeira colônia selecionada a partir do pool obtido ao fim de quatro seleções. As colunas em xadrez representam a segunda colônia selecionada. As colunas pontilhadas representam a terceira colônia selecionada e as colunas com ranhuras representam a quarta colônia selecionada. As amostras foram divididas em 3 grupos experimentais indicados pelos números 1, 2 e 3 acima do conjunto de barras. Grupo 1: biblioteca de fagos contendo peptídeos com maior afinidade por rNcSRS57; grupo 2: rNcSRS57 ligado a anticorpo anti-rNcSRS57 (controle); grupo 3: amostra contendo apenas anticorpo anti-rNcSRS57 (controle). Os dados estão representados como valores médios das amostras em duplicata e as barras de erro indicam os desvios padrão das médias. Valores de P<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. * indica P < 0.05 em comparação aos grupos controle 2 ou 3.



5.12. Tentativa de isolamento da proteína NcSRS57 associada a fagos/rNcSRS57

5.12.1 Ensaio de pull down

A interação entre a proteína rNcSRS57 com fagos contendo sequências únicas de peptídeos ligantes desse antígeno recombinante foi investigada por ensaio ELISA (figura 35). A imobilização de fagos resultantes de quatro seleções com a recombinante rNcSRS57 permitiu testar a capacidade destes fagos em reter a proteína nativa NcSRS57 no extrato total de taquizoítas de *N. caninum* (figura 36, poço 2 e 3). A partir disso, observou-se em gel SDS-PAGE a presença de uma banda mais intensa (figura 36, poço 2) em comparação com os grupos controles (figura 36, poços 1, 4, 5 e 6). Esta banda apresenta massa molecular de aproximadamente 50 kDa em contraste com 38,67 kDa, o massa molecular predita de NcSRS57 nativa. Dessa forma, o próximo passo será obter o sequenciamento e identificação do fago do peptídeo ligante e a análise por MS/MS da banda da proteína obtida ao final do *pull down*.

Figura 36. Ensaio de *pull down* da interação de fagos contendo peptídeos ligantes de rNcSRS57 com a proteína nativa NcSRS57 de *N. caninum*. Bacteriófagos ligantes de rNcSRS57 selecionados em *E. coli* M91 foram incubados com extrato total de taquizoítas . Poço 1: fagos selecionados por rNcSRS57 e não submetidos ao contato com extrato total de taquizoítas (controle). Poço 2: *pellet* contendo fagos selecionados por rNcSRS57 e incubados com extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Poço 3: sobrenadante contendo fagos selecionados por rNcSRS57 e incubados com extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Poço 3: sobrenadante contendo fagos selecionados por rNcSRS57 e incubados com extrato total de taquizoítas. Poço 4: fagos selvagens não selecionados por rNcSRS57 (controle). Poço 5: *pellet* contendo fagos selvagens incubados com extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Poço 6: sobrenadante contendo fagos selvagens incubados com extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Poço 6: sobrenadante contendo fagos selvagens incubados com extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Todas as amostras foram aplicadas em SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie G. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 50, 70 e 100.



5.12.2 Determinação da Interação entre fagos selecionados por rNcSRS57 com NcSRS57 nativa através de *western blot*

As amostras obtidas do pull down (figura 36) foram utilizadas no western blot. Na comparação entre fagos selecionados por rNcSRS57 em contato com extrato total de N. caninum (figura 37, poços 2 e 3) e fagos selvagens que também interagiram com extrato total de N. caninum (figura 37, poço 5) foi observado um padrão bastante semelhante de bandas reativas. Entretanto, foi possível notar uma diferença de reatividade entre estes dois grupos. Duas bandas presentes apenas nos fagos selecionados por rNcSRS57 em contato com extrato total de N. caninum foram detectadas com pesos moleculares próximos de 35 kDa (figura 37, poços 2 e 3), revelando inversão de sinal, sendo uma delas com peso abaixo de 35 kDa (figura 37, poço 2, símbolo *) e outra com 35 kDa (figura 37, poço 3, símbolo #). Essas bandas não foram visualizadas ao gel corado (figura 36), mas a reação ao western blot se mostrou bastante intensa, gerando o padrão de sinal inverso. Além disso, foi possível observar também uma banda específica com massa molecular de 22,5 kDa (figura 37, poço 2). Os controles representados por fagos selecionados por rNcSRS57 que não interagiram com extrato total de *N. caninum* e fagos selvagens (figura 37, poços 1 e 4), não apresentaram bandas com características citadas anteriormente em relação às demais amostras.

Figura 37. *Western blot* das amostras obtidas ao ensaio de *pull down*. O *western blot* foi feito em gel SDS-PAGE 12,5% e revelado em filme radiográfico. Poço 1: fagos selecionados por rNcSRS57 solubilizados em tampão de lise (controle); poços 2 e 3: *pellet* ou sobrenadante, respectivamente, de fagos selecionados por rNcSRS57 solubilizados em tampão de lise contendo extrato total de taquizoítas de *N. caninum*; poço 2, símbolo *: banda com massa molecular abaixo de 35 kDa; poço 3, símbolo #: banda com peso de 35 kDa; poço 4: fagos selvagens solubilizados em tampão de lise (controle); poços 5 e 6: *pellet* ou sobrenadante de fagos selvagens solubilizados em tampão de lise contendo extrato total de taquizoítas em tampão de lise contendo extrato total de taquizoítas em tampão de lise (controle); poços 5 e 6: *pellet* ou sobrenadante de fagos selvagens solubilizados em tampão de lise contendo extrato total de taquizoítas de *N. caninum*. Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40 e 50.



5.13. Análise em gel 2D de proteínas de superfície obtidas de taquizoítas de *N. caninum* tratados com PI-PLC

Com o intuito de obter uma análise geral das possíveis proteínas de superfície ancoradas por GPI à membrana de taquizoítas de *N. caninum*, foi realizada uma abordagem empregando a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol específica (PI-PLC), que cliva a ligação covalente entre a âncora GPI e a porção C-terminal da proteína.

5.13.1 Taquizoítas recém-purificados

A análise em gel bidimensional (gel 2D) do sobrenadante obtido após o tratamento de taquizoítas recém-purificados com PI-PLC, confrontada paralelamente

com um controle de células Vero, revelou quatro spots (setas 1 a 4 em azul, figura 38A). A digestão tríptica desses quatro spots sucedida de análises por espectrometria de massas gerou a identificação da proteína de via metabólica, chamada de malato desidrogenase (NAD), apenas dos spots 3 e 4 (tabela 5).

Figura 38. Proteínas extraídas de taquizoítas de *N. caninum* recém-purificados mediante o tratamento com a enzima fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC). (A) proteínas obtidas do sobrenadante de taquizoítas recém-purificados de *N. caninum* tratados com PI-PLC. (B) Proteínas obtidas do sobrenadante de células Vero tratadas com PI-PLC (controle negativo). Gel SDS-PAGE 2D 12,5%, corado com nitrato de prata, *strips* de 7 cm (3-11 NL) e Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40 e 50. (kDa).



Tabela 5. Proteínas de *N. caninum* identificadas por espectrometria de massas a partir da tripsinização dos spots representados na figura 38A. Na tabela estão indicados: o nome da proteína identificada de cordo com o banco de dados ToxoDB; a massa molecular predita da proteína; o score de identificação baseado nos parâmetros do programa Mascot; o peptídeo identificado por (MS/MS) e o número de acesso da proteína no banco de dados ToxoDB.

Spot	Nome proteína	Massa (Da)	Score	Peptídeo	N° Acesso ToxoDB
				K.DMFIGLPAVIGGAGIER.V	Net IV 032330
3	Malato desidrogenase (NAD)	36135	175	R.DVQATVIGTHGDCMVPLV R.Y	
4	Malato desidrogenase (NAD)	36135	75	K.DMFIGLPAVIGGAGIER.V	NcLIV_032330

5.13.2 Taquizoítas descongelados

A análise do sobrenadante de taquizoitas descongelados, também submetidos ao mesmo tratamento com a enzima PI-PLC, revelou uma quantidade maior de spots como pode ser observado na figura 39A, provavelmente devido à lise gerada pela expansão do volume intracelular com o congelamento dos taquizoitas ou até mesmo devido ao choque térmico a que estes parasitas foram subemetidos, representados pelos números de cor azul e discriminados daqueles spots de células Vero (figura 39B).

Figura 39. Proteínas extraídas de taquizoítas descongelados de *N. caninum* mediante o tratamento com PI-PLC. (A) Proteínas obtidas a partir do sobrenadante de taquizoítas descongelados de *N. caninum* e tratados com PI-PLC. (B) Proteínas obtidas a partir do sobrenadante de células Vero descongeladas e tratadas com PI-PLC (controle negativo). Gel SDS-PAGE 2D 12,5%, corado com nitrato de prata, *strips* de 7 cm (3-11 NL) e Marcador de massa molecular à esquerda indicados em quilodáltons (kDa): 10, 15, 25, 35, 40, 50 e 70.



A tripsinização dos spots obtidos a partir de amostras de taquizoítas descongelados gerou a identificação de duas proteínas representadas na tabela 6. O maior destes spots, representado como 6 e 7 azul (figura 39A), gerou a identificação da proteína de superfície SRS29C (SRS2). O spot 14 (azul) também revelou a

identificação de uma proteína da superfamília SRS muito abundante em *N. caninum*, SRS29B (SAG1) (tabela 6 e figura 39A).

Tabela 6. Proteínas de *N. caninum* identificadas por espectrometria de massas a partir da tripsinização dos spots representados na figura 39A. Na tabela estão indicados: o nome da proteína identificada de cordo com o banco de dados ToxoDB; a massa molecular predita da proteína; o score de identificação baseado nos parâmetros do programa Mascot; o peptídeo identificado por (MS/MS) e o número de acesso da proteína no banco de dados ToxoDB.

Spot	Nome proteína	Massa (Da)	Score	Peptídeo	N° Acesso ToxoDB
6 e 7	Proteína SRS (SRS29C)/SRS2	42896	117	K.NVCLLNVYVQSR.E R.LRPITVNPENNGVTLICGP DGK.A	NcLIV_033250
14	Proteína SRS (SRS29B)/SAG1	33800	227	K.CPDNSTAVPAALGYPTNR. T K.SVSSPEVYCTVQVEAER.A	NcLIV_033230

6 DISCUSSÃO

Dois novos genes do cromossomo XII codificadores de proteínas de superfície da superfamília SAG/SRS pertencentes à linhagem Nc-1 do Apicomplexa Neospora caninum (DUBEY et al., 1988) foram identificados, clonados e expressos, possibilitando assim, a localização e caracterização de seus produtos sobre o processo de adesão/invasão deste parasita à célula hospedeira. Estas proteínas, denominadas de NcSRS67 e NcSRS57, são compostas por um peptídeo sinal para secreção, um domínio característico de direcionamento para a superfície deste parasita e dois domínios SRS (GAJRIA et al., 2008; REID et al., 2012). NcSRS67 não apresenta sintenia com Toxoplasma gondii, possuindo ortólogo apenas em Hammondia hammondi. Isso a torna bastante distinta de outras proteínas da superfamília SRS, como por exemplo, a própria proteína NcSRS57 (SAG3) que possui sintenia com T. gondii (REID et al., 2012; WASMUTH et al., 2012). Trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa estimou a presença de NcSRS57 e NcSRS67 no extrato secretado (ESA) de taquizoítas de *N. caninum* com abundâncias relativas (AR) de 0.87 e 0.05, respectivamente, em comparação com outras proteínas de superfície, como SRS2 (NcSRS29C) AR = 14.26 e SAG1(NcSRS29B) AR = 1.42 (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013; POLLO-OLIVEIRA, 2013). Este estudo vem somar aos trabalhos dos grupos do Prof Jonathan M. Wastling (REID et al., 2012) e do Prof Michael E. Grigg; (WASMUTH et al., 2012) a anotação correta de SRSs em N. Essas investigações forneceram 0 modelo necessário caninum. para questionamentos experimentais a respeito da evolução desta superfamília de antígenos de superfície, seus ligantes celulares, diferenças de regulação de expressão estágio-específica e papel destas proteínas na patogênese deste parasita.

As estruturas secundárias das proteínas NcSRS67 e NcSRS57 foram comparadas com TgSAG1, pois essa foi a primeira SRS a ter sua estrutura cristalográfica desvendada (HE et al., 2002). As proteínas maduras NcSRS67 e NcSRS57 possuem doze resíduos de cisteína conservados distribuídas igualmente em dois domínios SRS (chamados de D1 e D2), compostos primariamente por sanduiches de folhas β e α hélices associadas entre si por três pontes dissulfeto (HE

et al., 2002). D1 e D2 formam, portanto, seis pontes dissulfeto também observadas em outros antígenos SRS de N. caninum e T. gondii (HOWE et al., 1998; HE et al., 2002; CASTILLO et al., 2007; CRAWFORD et al., 2009; CASTILLO et al., 2011). A conservação das pontes dissulfeto intramoleculares nos antígenos SRS sugere um padrão de dobramento similar (HOWE et al., 1999; CASTILLO et al., 2011). Dobramento este que pode ser crucial para a adesão das proteínas SRS à receptores da célula hospedeira e, consequentemente, na interação com a resposta imune hospedeira (AJIOKA & SOLDATI, 2007; CASTILLO et al., 2011), já verificado em SRS57 (SAG3) e SRS29B (SAG1), respectivamente, em T. gondii (LEKUTIS et al., 2001). Esta família de proteínas SRS parece ter surgido por divergência de um ancestral comum sob forte seleção para conservação de sua arquitetura topológica global, com conservação de cisteínas e padrões de hidrofobicidade, mantendo uma estrutura secundária particular (MANGER et al., 1998). Crawford et al. (2009), em experimentos de cristalografia e difração de raio X do antígeno de superfície de bradizoíta (BSR4) de *T. gondii*, propôs explicações para o arranjo dos resíduos de cisteína na estrutura desta proteína. As pontes dissulfeto fornecem estabilidade à estrutura do núcleo e um nível de compactação aos domínios que formam a proteína (CRAWFORD et al., 2009). As posições das três pontes dissulfeto no domínio D1, as quais atuam como determinantes primários para o dobramento SRS, são especialmente conservadas entre SporoSAG, SAG1 e BSR4 em T. gondii (CRAWFORD et al., 2010), assim como nas proteínas NcSRS67 e NcSRS57 deste trabalho. Além disso, a estrutura cristalina de TgSAG1 revelou que os domínios D1 localizado na posição N-terminal com aproximadamente 130 aminoácidos e D2 localizado em C-terminal com aproximadamente 120 aminoácidos formam um sulco contínuo e profundo, contendo resíduos de aminoácidos positivamente carregados (HE et al., 2002). Este sulco básico formado pelos domínios parece ser conservado entre proteínas SRSs ancoradas por GPI em parasitas, e pode servir potencialmente como um sítio de ligação proteoglicano sulfatado sobre a superfície de células alvo (HE et al., 2002; GRAILLE et al., 2005).

A investigação de proteínas de superfície da superfamília SRS em *N. caninum* e *T. gondii* tem sido importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos no processamento e evasão da resposta imune deste parasita (CASTILLO et al., 2011). Proteínas SRS em Apicomplexa são frequentemente imunodominantes e de

particular interesse como ferramenta diagnóstica e/ou antígenos usados como potenciais candidatos vacinais (ANGUS et al., 2000; LAGUÍA et al., 2010; SUN et al., 2011; YUAN et al., 2011; LALEK et al., 2015). Ainda não existe vacina para o controle da neosporose, pois a única vacina comercial até então existente (Bovilis Neoguard; Intervet International B.V., Boxmeer, Países baixos), registrada para uso em rebanhos bovinos na Nova Zelândia em 2001 e depois em diversos outros países, mostrou-se de baixa eficácia (WESTON et al., 2012) e foi retirada do mercado recentemente (REICHEL et al., 2015). Esta vacina era constituída de taquizoítas inativados (taquizoítas mortos), a qual exibiu proteção moderada em ensaios de campo, não apresentando prevenção de abortamento estatisticamente significante, gerando uma eficácia de apenas 25% e sugerindo um aumento sobre o risco de morte embrionária precoce (WESTON et al., 2012).

A resposta imune produzida após imunizações com extrato total de *N. caninum* gera proteção em modelos murinos (INNES et al., 2002). A obtenção de extrato total para a fabricação de vacinas, porém, a torna inviável, pois, além da variabilidade entre lotes de produção, possui antígenos que não conferem proteção, alguns podendo ser imunossupressivos levando a um conjunto de resposta imune que pode ser indesejável (CHO et al., 2005). Por outro lado, a produção de vacinas através da tecnologia do DNA recombinante (antígenos recombinantes) é potencialmente mais específica na indução da resposta imunológica, pois apresenta apenas antígenos imunogênicos selecionados em vez de todas as proteínas do parasita (SHAAP et al., 2007; CHING et al., 2016).

Neste contexto, o primeiro passo para a produção de antígenos vacinais é a expressão heteróloga em *Escherichia coli* (CHEN, 2012) devido às suas altas taxas de crescimento (SOARES et al., 2003; BANEXY; MUJACIC, 2004), fácil manutenção (ROSANO & CECCARELLI, 2014) e habilidade para expressar níveis de proteínas heterólogas (RAI; PADH, 2001). Nosso plasmídeo híbrido (pCR-Blunt II-TOPO-His) (PEREIRA; YATSUDA, 2013) expressou a sequência NcSRS67 constitutivamente ligada à porção N-terminal (2,1 kDa) formado pelo códon de iniciação do LacZα, fusionado à sequência codificadora original ccdB (BEZERRA et al., 2017) e confirmada por espectrometria de massas. A simplicidade de obtenção e um meio livre de indutor constituem notórias vantagens do sistema pCR-Blunt II-TOPO-His comparado ao sistema induzido, como o utilizado na expressão de NcSRS57

(pET32). rNcSRS57 foi desenhada com base nos domínios SRSs, sem o peptídeo sinal e sem a âncora de GPI e, após expressão, apresentou massa molecular abaixo do esperado. O sequenciamento deste fragmento ligado ao plasmídeo recombinante pET32 revelou uma pequena sequência de nucleotídeos responsável pela codificação de um pequeno fragmento de NcSRS57 com peso de aproximadamente 3,1 kDa, quando o predito seria 31.14 kDa. Isso pode ter ocorrido pela presença de um stop códon oculto entre o 122º e 126º pb da sequência. De acordo com (BERTRAND et al., 2015), eventos como este podem ser decorrentes de decodificação errônea de traducão. durante o processo causado pelo escorregamento do RNAt no complexo ribossomo-RNAm, levando a perda de complementariedade do RNAt, com perturbação de via mecânica do ribossomo. Alterações no RNAt podem resultar em mudança de códons (do inglês frameshifting) em um sítio particular e produzir dois produtos proteicos a partir de uma sequência codificadora ou um produto proteico a partir de duas fases de leitura (SINGH; PARDASANI, 2009). Além disso, essa mudança de códon pode ser definida como traduções proteicas iniciadas no segundo (mudança de códon +1) ou no terceiro (mudança de códon -1) nucleotídeo do códon (SINGH; PARDASANI, 2009), havendo até seis diferentes possibilidades de formar códons de parada, como pode ser observado na figura 40 (MORGENS et at., 2013). Diante deste contexto, nós acreditamos que o pequeno fragmento de NcSRS57 expresso em pET32, tenha ocorrido como consequência de uma mudança de códon. Esse evento pode ser visualizado na figura 18, porém ao invés de arginina como indicado o aminoácido da posição i, no caso deste trabalho, foi uma asparagina (AAT). Desta forma, obtivemos rNcSRS57 em duas fases de leitura, a indicada como i (normal) e a i+1 (mudança de códon), sendo a produção da forma i+1 (3,1 kDa) muito mais abundante do que a i (31.14 kDa). A forma completa (i) só foi observada ao western blot.

Figura 40. Exemplos de *stop codon* ocultos. Representação esquemática de seis diferentes maneiras nas quais um códon da arginina AGT na posição i pode formar *stop codon* com códons na posição i+1 ou i-1. Stop códons ocultos estão representados pelas letras maiúsculas em vermelho. X representa alguma base para os códons nas posições i-1 e i+1.



Fonte: Modificado de MORGENS et al., 2013.

Os antissoros policionais produzidos contra rNcSRS67 e rNcSRS57 reconheceram as suas proteínas recombinantes, e reagiram com suas formas nativas presentes no extrato proteico de *N. caninum* em *western blot* mas não ao ELISA. Uma possível explicação para este evento pode estar correlacionada a uma abundância relativa baixa quando comparadas a outras proteínas de superfície (POLLO-OLIVEIRA, 2013), provavelmente em concentração insuficiente para sua detecção no extrato bruto ou extrato secretado deste parasita. Já ao *western blot* 2D para detecção das formas nativas de NcSRS67 e NcSRS57 (figuras 26A e 28A, respectivamente), houve revelação de spots que podem ser isoformas dessas proteínas. No caso da NcSRS67 o spot com maior massa molecular (aproximadamente 36,7 kDa), pode representar a forma precursora de NcSRS67 que contém um peptídeo sinal na porção N-terminal e aquele com menor massa molecular (aproximadamente 35,8 kDa) pode ser a forma madura de NcSRS67.

Outra hipótese é que tenha ocorrido reconhecimento cruzado de NcSRS29C pelo anticorpo anti-rNcSRS67, uma vez que a digestão tríptica dos spots localizados na região onde foi verificado o sinal da forma nativa de NcSRS67, revelou a identificação de NcSRS29C por MS/MS (tabela 3). Além disso, o pl (~ 5.3) correspondente ao spot representado pela seta 1 (figura 26A), é próximo ao pl predito para NcSRS29C (predito 5.12). O fato de NcSRS67 apresentar uma abundância relativa muito baixa (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013), também pode ter contribuído para a sobreposição de spots de outras proteínas SRSs em SDS-PAGE. Os spots de NcSRS57 com pesos moleculares de aproximadamente 19,5 e 43 kDa (figura 28A), podem ser resultantes da interação do soro anti-rNcSRS57 com as formas nativas da proteína Tiorredoxina (Trx) e NcSRS57 de N. caninum, estando coerentes com seus pesos preditos. Além disso, a presença de um fileira horizontal de spots na altura de aproximadamente 35 kDa e pl estimado entre 6.0 e 7.5 (referente a NcSRS57), e entre 5.4 e 6.0 (referente a NcSRS67) nos western blot 2D com os anticorpos anti-rNcSRS57 e anti-rNcSRS67 sugere a presença de uma superfamília SRS com domínios conservados entre si (CRAWFORD et al., 2009; CRAWFORD et al., 2010) ou proteínas excretórias/secretórias já verificadas no extrato secretado (ESA) da linhagem de T. gondii (JIANG et al., 2016).

Neste trabalho foi empregado um ensaio de adesão/invasão utilizando taquizoítas de *N. caninum* expressando β-galactosidade (PEREIRA et al., 2014). Este ensaio é adequado para determinar se as proteínas de superfície NcSRS67 e NcSRS57 tem alguma atuação no processo de invasão. Como proteínas superficiais, as SRS/SAG, assim como NcSRS29B (SAG1) e NcSRS29C (SRS2) possuem uma função crítica durante o processo de invasão sobre à célula hospedeira, agindo putativamente sobre a aderência, e o nível de invasão reflete indiretamente na eficácia da adesão (CANNAS et al., 2003; HALDORSON et al., 2006; PINITKIATISAKUL et al., 2007; CUI et al., 2012). Dessa forma, os soros policionais produzidos contra rNcSRS67 e rNcSRS57 inibiram 20 e 16%, respectivamente a adesão/invasão sobre as células hospedeiras, indicando que essas proteínas participam em certo grau da ligação à célula hospedeira, como parte de uma família extensiva de proteínas SRS (LV et al., 2015). Em *T. gondii*, motivos selecionados de proteínas fundamentais para adesão/invasão como SRS29B (SAG1), MIC3 e MIC2 foram avaliados quanto as suas propriedades protetivas e

imunogênicas em vacinações, revelando excelente estabilidade térmica, uma característica que é frequentemente necessária quando o antígeno é utilizado em uma forma solúvel em sistemas automatizados (JONGERT et al., 2008). A associação dos anticorpos anti- NcSRS67 e NcSRS57 inibiu menos a invasão (11%) em comparação aos soros isolados. Isso poderia indicar que as proteínas SRS67 e SRS57 possuem funções redundantes, com os anticorpos competindo pelos sítios de ligação no parasita o que explica parte do fenômeno observado.

Com relação à localização por imunofluorescência, NcSRS57 abrangeu toda a superfície deste parasita, à semelhança de outras proteínas SRS específicas de taquizoítas, como TgSRS57(SAG3) (HEMPHILL et al., 1997), NcSRS2 (LIMA JUNIOR et al., 2007), TgSRS29B (SAG1) (SONDA et al., 1998), NcIMP1 (CUI et al., 2012), TgSRS29C (TgSRS2) e TgSRS3 (sequência relacionada a SAG1) de T. gondii (MANGER et al., 1998), ou específicas de bradizoítas como NcSRS35 (SAG4) (GARCIA et al., 2006) e NcBSR4 (CASTILLO et al., 2007). De forma oposta, NcSRS67 foi parcialmente localizada sobre a superfície de taquizoítas extracelulares de N. caninum, abrangendo uma área superficial do taquizoíta significativamente menor que aquela recoberta por NcSRS57. O fato do peptídeo sinal do antígeno NcSRS67 não ser totalmente consolidado por alguns programas de predição de peptídeo sinal, como o SignalP 4.1, pode indicar uma via de secreção ineficiente dessa proteína (BEZERRA et al., 2017). A expressão dinâmica de NcSRS67 também pode ocorrer durante a vida do taquizoíta, mas apenas experimentos de lapso de tempo com uma proteína marcada por fluorescência pode confirmar esta hipótese (BEZERRA et al., 2017).

A adesão de proteínas de superfície através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) localizada sobre a membrana externa da bicamada lipídica de parasitas apicomplexas como *Plasmodium* spp, *T.gondii, Cryptosporidium parvum* e *N. caninum*, representa uma estratégia importante para a sobrevivência e ciclo de vida destes parasitas (NISHIKAWA et al., 2002; GROCKIEGO & SCHWARZ, 2010). Ao contrário de proteínas de superfície que estão ancoradas a membrana por um domínio transmembrana, as proteínas ancoradas por GPI estão ligadas à membrana celular via seu componente lipídico. Dessa forma, a âncora GPI pode ser enzimaticamente removida por ação da enzima PI-PLC, convertendo a proteína em sua forma solúvel em água e liberando-a no meio extracelular. Rodriguez e

colaboradores (RODRIGUEZ et al., 2014) investigaram a significância de proteínas ancoradas por GPI no processo de invasão do apicomplexa Babesia bovis ao eritrócito. A clivagem de antígenos ancorados por GPI no estágio de merozoítas através da enzima fosfolipase C fosfatidilinositol específica (PI-PLC), inibiu a invasão deste parasita sobre eritrócitos, demonstrando assim, a importância dessa classe de moléculas para a propagação do ciclo de vida deste parasita (RODRIGUEZ et al., 2014) Existe a hipótese das proteínas SRS serem compactadas sobre a superfície do parasita. SRS29B (SAG1) de T. gondii constitui cerca de 3 a 5% da proteína celular total, equivalente a 1.5x10⁶ a 2.5x10⁶ cópias/célula, podendo ter uma função crucial na modulação imune ou atenuação da virulência (LEKUTIS et al., 2001). Em nossa investigação, a superfície de taquizoítas de N. caninum foi submetida à ação da enzima PI-PLC para verificar em microscopia confocal o efeito da clivagem e para identificar proteínas SRS no sobrenadante. Acredita-se que a marcação que permaneceu após a digestão enzimática esteja relacionada à proeminência de ligações estabelecidas por proteoglicanos da célula hospedeira e a superfície celular dos taquizoítas (JACQUET et al., 2001). Já as proteínas presentes no sobrenadante foram obtidas tanto de taquizoítas recém-purificados como de taquizoítas descongelados. Duas proteínas de superfície mais abundantes em N. caninum, SRS29B (SAG1) e SRS29C (SRS2) foram identificadas. Uma análise proteômica do tipo highthroughput (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013; POLLO-OLIVEIRA, 2013) gerou a identificação de doze proteínas pertencentes à superfamília SRS, dentre elas, as proteínas SRS29B (SAG1) e SRS29C (SRS2), e também as proteínas que foram foco em nosso trabalho, SRS67(NcLIV_060700) e SRS57 (SAG3). Na análise quantitativa relativa, as proteínas com maior e menor abundâncias foram a NcSRS29C e a NcSRS67, respectivamente (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013; POLLO-OLIVEIRA, 2013). Por outro lado, a determinação de uma banda por western blot também obtida a partir da clivagem com a enzima PI-PLC e resultante da reação com soro policional produzido contra rNcSRS57 pode estar relacionada a um alto grau de reatividade cruzada entre este soro policional e a proteína SRS29B (SAG1), sugerindo assim, a presença de potenciais epítopos de reação cruzada entre essas duas proteínas, bem como um estreito relacionamento entre suas estruturas e funções, com distribuição conservativa de resíduos de cisteínas e triptofano, assim

como diversos motivos semelhantes entre si (DELAUW et al., 1994; DZIERSZINSKI et al., 2000).

Em meio a este contexto de identificação de novas moléculas bioativas, métodos refinados, como por exemplo, *phage display*, tem sido desenvolvidos e aprimorados para identificação e caracterização de importantes proteínas ou interações parasito-hospedeiro. Esta tecnologia fornece uma ferramenta inestimável na seleção de diversas bibliotecas de bacteriófagos com intuito de identificar proteínas, selecionar moléculas que apresentem alta afinidade por um parasita e que possam ser exploradas no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ou vacinas (RHAIEM & HOUIMEL et al., 2016). Nosso estudo, na tentativa de isolar NcSRS57, selecionou uma biblioteca de bacteriófagos para peptídeos ligantes à rNcSRS57, seguido da precipitação dessas moléculas de interesse através de ensaios de *pull down* com extrato total de Nc. Existe a possibilidade da forma madura de NcSRS57 ter sido isolada como uma banda de aproximadamente 34 kDa (31.14 predito), porém a identificação só poderá ser confirmada por MS/MS.

As proteínas SRS estão dispostas sobre a superfície do parasita e associadas à superfície externa da membrana através de uma âncora GPI, atuando sobre a adesão do parasita à célula hospedeira e na regulação da imunidade hospedeira para estabelecer a infecção crônica (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; CRAWFORD et al., 2009; REID et al., 2012; WASMUTH et al., 2012). Os resultados apresentados neste trabalho iniciaram a identificação e caracterização de novas proteínas de superfície pertencentes à superfamília SRS do Apicomplexa N. caninum, entre elas NcSRS67 com ortólogo em H. hammondi e NcSRS57 com ortólogo em T. gondii. O fato da associação entre os anticorpos anti-rNcSRS67 e anti-rNcSRS57 ter apresentado uma menor porcentagem de inibição sobre adesão/invasão (11%) em relação a estes anticorpos separados, não inviabiliza o emprego das recombinantes rNcSRS67 e rNcSRS57 (separadamente) na composição de uma possível vacina multicomponente numa futura prevenção contra a neosporose. Estes recombinantes poderiam ser associadas a outras proteínas como proteínas de grânulos densos, proteínas de micronemas e até mesmo a proteínas abundantes de superfície, como SRS29B (SAG1) (WU et al., 2012). Um estudo com uma vacina multicomponente composta por DNA de GRA1 e SRS29B (SAG1) de T. gondii foi capaz de induzir respostas humoral e celular, e aumentar o efeito protetivo contra uma infecção letal causado por este parasita (WU et al., 2012). Dessa forma a caracterização molecular iniciada neste trabalho com as proteínas da família SRS, NcSRS67 e NcSRS57 abre o caminho para estudos mais detalhados para se avaliar quais os motivos essenciais para invasão à célula hospedeira presentes nestes dois antígenos e a eficiência dos mesmos em ensaios *in vivo* de imunização.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para o entendimento de duas proteínas de superfície (SRS) em *N. caninum* e, como consequência, no filo Apicomplexa. A caracterização permitiu a identificação e localização de NcSRS67 e NcSRS57 sobre a superfície de taquizoítas, ampliando o conhecimento sobre essas proteínas *in vitro*. Essas proteínas podem ter uma função crítica durante à adesão e invasão de taquizoítas de *N. caninum* à célula hospedeira, podendo colaborar futuramente, para a elucidação de mecanismos-chave envolvidos no processo de invasão desse parasita à célula hospedeira.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOMAKO-ANKOMAH, Y.; WIER, G.M.; BORGES, A.L.; WAND, H.E.; BOYLE, J.P. Differential Locus Expansion Distinguishes Toxoplasmatinae Species and Closely Related Strains of *Toxoplasma gondii*. **mBio**, v.5 n.1, e01003, 2014.

AJIOKA, J.K.; SOLDATI, D. Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology. Ebook. Horizon Bioscience (Standart Copyright Licence), p.127-132, 2007.

ALEXANDER, D.L.; MITAL, J.; WARD, G.E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J.C. Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v.1, n.2, p.137-149, 2005.

ALMERIAI, S.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.303–309, 2013.

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

BANEXY, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v.22, p.1399-1408, 2004.

BARGIERI, D.; LEGAL, V.; ANDENMATTEN, N.; TARDIEUX, I.; MEISSSNER, M.; MÉNARD, R. Host cell invasion by apicomplexan parasites: the junction conundrum. **PLoS Pathogens**, v.10, n.9, 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1004273.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A.E.; DUBEY, J.P.; ARDANS, A.A. Congenital Neospora infection in calves born from that previously aborted Neospora-infected fetuses: Four cases (1990-1992). Journal of the Veterinary Medical Association, v.202, p.113-117, 1993.

BARROS, J. C.; NETO, L. F. F.; CUNHAI, R. C.; ANDREOTTI, R. Diagnóstico da perda econômica causada pela neosporose na reprodução de novilhas de corte. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, Suplemento 1, p.1943-1954, 2011.

BERTRAND, R.L.; HAMEED, M.A.; SORENSEN, J.L. Limitations of the 'ambush hypothesis at single-gene scale: what codon biases are to blame?. **Molecular Genetics and Genomics**, v.290, p.493-504, 2015.

BEZERRA, M.A.; PEREIRA, L.M.; BONONI, A.; BIELLA, C.A.; BARONI, L.; POLLO-OLIVEIRA, L.; YATSUDA, A.P. Constitutive expression and characterization of a surface SRS (NcSRS67) protein of *Neospora caninum* with no orthologue in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v.66, p.173-180, 2017.

BICHET, M.; TOUQUET, B.; GONZALEZ, V.; FLORENT, I.; MEISSNER, M.; TARDIEUX, I. Genetic ompairement of parasite myosin motors uncovers the

contribution of host cell membrane dynamics to *Toxoplasma* invesion forces. **BMC Biology**, v.14, n.1, 2016.

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

BJORKMAN, C.; LUNDEN, A. Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of Neospora and Toxoplasma infections. **International Journal for Parasitology**. v.28, n.1, p.187-193, 1998.

BLOWEY, R.W. Fertility and its control. In R. W. Blowey, A veterinary book for dairy farmers, (3th ed.). (p. 231-278). Ipswish: Old Pond Publishing, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, p.248-254, 1976.

BULOW, R.; BOOTHROYD, J.C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. **Journal of Immunology**, v.10, n.141, p.3584-3591, 1991.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.18, n.12, p.546–552, 2002.

CALDOW, G.; GRAY, D. Fetal loss. In A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd & R. G. Eddy, Bovine medicine diseases and husbandry of cattle, (2nd ed.), p.577-593, Oxford: Blackwell Science, 2004.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; EPERON, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, v.126 (Pt4), p.303–312, 2003.

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

CASTILLO, R.V.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; ZABALLOS, A.; AGUADO-MARTINEZ, A.; HEMPHILL A.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Molecular characterisation of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v.37, n.8-9, p.887-896, 2007.

CASTILLO, R.V.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; JIMÉNEZ-RUIZ, E.; RODRÍGUEZ-MARCOS.; ALVEREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, LM. Identification of a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in *Neospora caninum* and characterization of the novel SRS9 gene. **Parasitology**, v.138, n.14, p.1832-1842, 2011.

Chen, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1102-1107, 2012.

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, n.1, p.19-25, 2005.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ALVAREZ-GARCIA, 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, p.1194 - 1198, 2002. Doi: 10.1128/JCM.40.4.1194-1198.2002.

CONG, H.; ZHANG, M.; XIN, Q.; WANG, Z.; LI, Y.; ZHAO, Q.; ZHOU, H.; HE, S. Compound DNA vaccine enconding SAG1/SAG3 with A₂/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v.6, n.63, p.1-8, 2013.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.2, p.213-221, 1997.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.; GONDIM, L.F.; WALD, V. Nosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.195-202, 2002.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.10881-10890, 1988.

CRAWFORD, J.; GRUJIC, O.; BRUIC, E.; CZJZEK, M.; GRIGG, M.E.; BOULANGER, M.J. Structural characterization of the bradyzoite surface antigen (BSR4) from *Toxoplasma gondii*, a unique addition to the surface antigen glycoprotein 1-related superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.9192-9198, 2009.

CRAWFORD, J.; LAMB, E.; WASMUTH, J.; GRUJIC, O.; GRIGG, M.E.; BOULANGER, M.J. Structural and Functional Characterization of SporoSAG: A SAG2-RELATED SURFACE ANTIGEN FROM *TOXOPLASMA GONDII*. The Journal of Biological Chemistry, v. 285, n.16, p.12063-12070, 2010.

CUI, X.; LEI, T.; YANG, D.Y.; HAO, P.; LIU, Q. Identification and characterization of a novel *Neospora caninum* immune mapped protein 1. **Parasitology**, v.139, p.998 - 1004, 2012.

DA SILVA ANDRADE, G.; BRUHN, F.R.; ROCHA, C.M.; DE SÁ GUIMARÃES, A.; GOUVEIA, A.M.; GUIMARÃES, A.M. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in sheep in the state Minas Gerais, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.188, n.1-2, p.168-171, 2012.

D'ANGELO, J.G.; BORDON, C.; POSNER, G.H.; YOLKEN, R.; JONES-BRANDO, L. Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii in vitro* at multiple steps in the lytic cycle. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n.1, p.146-150, 2009.

DAVISON, H.C.; GUY, F.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1683-1689, 1999.

DEO, V.K.; YOSHIMATSU, K.; OTSUKI, T.; DONG, J.; KATO, T.; PARK, E.Y. Display of *Neospora caninum* surface protein related sequence 2 on *Rous sarcoma* virus-derived gag protein virus-like particles. **Journal of Biotechnology**, v.165, n.1, p. 69-75, 2013.

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

DONAHOE, S.L.; LINDSAY, S.A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for parasitology**, v.4, p.216-238, 2015.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; LIPSCOMB, T.P. Neosporosis in cats. Veterinary Pathology, v. 27, n.5, p.335-339, 1990.

DUBEY, J.P.; DE LAHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. Appl. **Parasitology**, v.34, p.532-534, 1993.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *N. caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, n.1-2, p.1-59, 1996.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WONDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. Journal of Comparative Pathology. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, n.4, p.7-89, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.1-34, 2006.

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

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BLERKAS, 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 coccidian. **International Journal for Parasitology**, v.32 n.8, p.929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; Schares, G.; Ortega-Mora, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.323-367, 2007.

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

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. **Veterinary Parasitology**, 180, n.1–2, p.90–108, 2011.

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

ESPERANDIM, V.R.; DA SILVA FERREIRA, D.; TOLDO, M.P.; SARAIVA, J.; AUGUSTO, M.B.; DE ALBUQUERQUE, S. New method for quantification of Trypanosoma cruzi in animal's tissue in the chronic phase experimental Chagas' disease. **Parasitology Research**, v.106, n.6, p.1471-1473, 2010.

FERNANDEZ-GARCIA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ZABALLOS, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.146, n.1, p.89-97, 2006.

FINN, R.D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R.Y.; EDDY, S.R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A.L.; POTTER, S.C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SALAZAR, G.A.; TATE, J.; BATEMEN, A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p.279-285. 2015.

FUGITA, M.; JIGAME, Y. Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1780, p.410–420, 2008.

FUKUNAGA, K.; TAKI, M. Practical tips for construction of custom peptide libraries and affinity selection by using commercially available phage display cloning systems. **Journal of Nucleic Acids**, v.2012, Article ID 295719, p.1-9, 2012.

GAJRIA, B.; BAHL, A.; BRESTELLI, J.; DOMMER, J.; FISHER, S.; GAO, X.; HEIGES, M.; IODICE, J.; KISSINGER, J.C.; MACKEY, A.J.; PINNEY, D.F.; ROOS, D.S.; STOECKERT, Jr.C.J.; WANG, H.; BRUNK, B.P. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. **Nucleic Acids Research**, 2008; v.36, p.553-556.

GARCIA, A.F.; CASTILLO, V.R.; ZABALLOS, A.; GARCIA, G.A.; MORA, L.M.O. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.146, n.1, p.89-97, 2006.

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, p.161–167, 2008.

GHOSH,A.K.; RIBOLLA, E.M.; JACOBS-LORENA, M. Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America**, v.98, n.23, p.13278-13281, 2001.

GILSON, P.R.; NEBL, T.; VUKCEVIC, D.; MORITZ, R.L; SARGEANT, T.; SPEED, T.P.; SCHOFIELD, L.; CRABB, B.S. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol Cell Proteomics**, v.5, n.7, p.1286-1299, 2006.

GIORDANO, R.J.; ANOBOM, C.D.; CARDÓ-VILA, M.; VALENTE, A.P.; PASQUALINI, R.; ALMEIDA, F.C.; ARAP, W. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. **Chemico-Biological Interactions**, v.12, n.10, p.1075-1083, 2005.

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

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.2, p.159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v.22, p.247-252, 2006.

GONDIM, L.F.; LINDSAY, D.S.; MCALLISTER, M.M. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *N. caninum* and *N. hughesi* indirect fluorescent antibody tests. **Journal of Parasitology**, v.95, n.1, p.86-88, 2009.

GOVERNO FEDERAL: PORTAL BRASIL. Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado. 09 Out. 2015. Disponível em: < <u>http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-</u> <u>cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado</u>>. Acesso em: 10 Jan. 2017.

GRAILLE, M.; STURA, E.A.; BOSSUS, M.; MULLER, B.H.; LETOURNEUR, O.; POIROT, N.B.; SIBAÏ, G.; GAUTHIER, M.; ROLLAND, D.; LE, D.M.H.; DUCANCEL, F. Crystal Structure of the Complex between the Monomeric Form of *Toxoplasma*

gondii Surface Antigen 1 (SAG1) and a Monoclonal Antibody that Mimics the Human Immune Response. **Journal of Molecular Biology**, v.354, p.447-458, 2005. GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I.; MILNE, E.; INNES, E.A. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.32, n.2, p.131-143, 2016.

HALDORSON, G.J.; STANTON, J.B.; MATHISON, B.A.; SUAREZ, C.E.; BASZLER, T.V. *Neospora caninum*: Antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. **Experimetal Parasitology**, v.112, p.172–178, 2006.

HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231-241, 2005.

He, X.L., Grigg, M.E., Boothroyd, J.C., Garcia, K.C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.9, p.606-611, 2002.

HEHL, A.B.; BASSO, W.U.; LIPPUNER, C.; RAMAKRISHNAN, C.; OKONIEWSKI, M.; WALKER, R.A.; GRIGG, M.E.; SMITH, N.C.; DEPLAZES, P. Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. **BMC Genomics**. v.16, n.1, 2015, doi: 10.1186/s12864-015-1225-x.

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

HEIDER, S.; DANGERFIELD, J.A.; METZNER, C. Biomedical applications of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Journal of Lipid Research**, v.57, p.1778-1788, 2016.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**, v.82, n.6, p. 497-504, 1996.

HEMPHILL, A.; FELLEISEN, R.; CONNOLLY, B.; GOTTSTEN, B.; HENTRICH, B.; MÜLLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major Neospora canunum tachyzoite surface protein. **Parasitology**, v.115, p.581-590, 1997.

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. Advances in **Parasitology**, v.43, p.47-104, 1999a.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.8, p.1175-1188, 1999b.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A.; KELLER, N.; RIESEN, M.; GUETG, N.; SRINIVASAN, S.; ALAEDDINE, F. Tissue culture and explant

approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. **Microscopy and Microanalysis**, v.10, n.5, p.602–620, 2004.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.133, (Pt 3), p. 261–278, 2006.

HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**. v.29, v.10, p.1669-1676, 1999.

HOFF, J. Methods of blood collection in the mouse. Lab Animal. v.29, n.10, p.47-53, 2000.

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

HOWE, D.K.; MERCIER, C.; MESSINA, M.; SIBLEY, L.D. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.86, n.1, p.29-36, 1997.

HOWE, D.K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSY, D.; SIBLEY, L.D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora cninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.66 n.11, p. 5322-8, 1998.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology, v.29, n.10, p. 1489-1496, 1999.

HOWE, D.K.; GAJI, R.Y.; MARSH, A.E.; PATIL, B.A.; SAVILLE, W.J.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; GRANSTROM, D.E. Strains of Sarcocystis neurona exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. International Journal for Parasitology, v.38, n.6, p.623-631, 2008.

HUYNH, M.H.; HARPER, J.M.; CARRUTHERS, V.B. Preparing for na invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes. **Parasitology Research**, v.98, n.5, p.389-395, 2006.

INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.; CONRAD, P.A. Immune responses to *N. caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, n.11, p.497-504, 2002.

INNES, E.A.; VERMEULEN, A.N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Parasitology**, v.133, p.145-168, 2006.

INNES, E.A. The host–parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.134, (Pt 13), p.1903-1910, 2007.

INNES, E.A.; BARTLEY, P.M.; ROCCHI, M.; BENAVIDAS-SILVAN, J.; BURRELLS, A.; HOTCHKISS, E.; CHIANINI, F.; CANTON, G.; KATZER, F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: Dead oralive? **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.155-163, 2011.

JACQUET, A.; COULON, L.; NÈVE, J.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; BOLLEN, A.; JURADO, M.; BIEMANS, R. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.116, n.1, p.35-44, 2001.

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

JONGERT, E.; VERHELST, D.; ABADY, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. Protective Th1 immune responses against toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart. **Vaccine**. v.26, n. 41, p.5289-5295, 2008.

JUNG, C.; LEE, C.Y.; GRIGG, M.E. The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.3, p.285-96, 2004.

KARIMI, M.; MIRSHEKARI, H.; BARSI, S.M.M.; BAHRAMI, S.; MOGHOOFEI, M.; HAMBLIN, M.R. Bacteriophages and phage-inspired nanocarries for targeted delivery of therapeutic cargos. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.106, p.45-62.

KARSTEN, V.; QI, H.; BECKERS, C.J.; REDDY, A.; DUBREMETZ, J.F.; WEBSTER, P.; JOINER, K.A. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. **Journal of Cell Biology**, v.141,n.6, p.1323-33, 1998.

KAWAI, S.; TAKAGI, Y.; KANEKO, S.; KUROSAWA, T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. **Experimental Animals**, v.60, n.5, p.481-487, 2011.

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

KESSLER, H.; HERM-GOTZ, A.; HEGGE, S.; RAUCH, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Microneme protein 8—a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. Journal of Cell Science, v.121, p.947–956, 2008.

KHANALINHA, K.; MOTAZEDIAN, M.H.; KAZEMI, B.; SHAHRIARI, B.; BANDEHPOUR, M.; SHARIFNIYA, Z. Evaluation of Recombinant SAG1, SAG2, and

SAG3 Antigens for Serodiagnosis of Toxoplasmosis. The Korean Journal of Parasitology, v.52, n.2, p.137-142, 2014.

KIM, S.K.; BOOTHROYD, J.C. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. **The Journal of Immunology**. v.174, n.12, p.8038-8048, 2005.

KIM, S.K.; KARASOV, A.; BOOTHROYD, J.C. Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain and in host control of parasite replication in the intestine. **Infecttion and Immunity**. v.75, n.4, p.1626–1634, 2007.

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

KING, J.S.; BROWN, G.K.; JENKINS, D.J.; ELLIS, J.T.; FLEMING, P.J.; WINDSOR, P.A.; SLAPETA, J. Oocysts and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. **Veterinary Parasitology**. v.187, n.1-2, p.85-92, 2012.

KISSINGER, J.C.; GARJRIA, B.; LI, L.; PAULSEN, I.T.; ROOS, D.S. Toxo DB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. **Nucleic Acids Research**. v.31, n.1, p.234-236, 2003.

LOURIDO, S.; SHUMAN, J.; ZHANG, C.; SHOKAT, K.M.; HUI, R.; SIBLEY, L.D. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. **Nature**. v.465, n.7296, p.359-362, 2010.

LEKUTS, C.; FERGUSON, D.J.; GRIGG, M.E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J.C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**. v.31,n.12, p.1285-92, 2001.

LEE, J. I.; KIM, I. H. Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performances and the economic impact. **Journal of Veterinary Science**, v.8, n.3, p.283- 288, 2007.

LEVENTAL, I.; GRZYBEK, M.; SIMONS, K. Greasing their way: Lipid modifications determine protein association with membrane rafts. **Biochemistry**, v.49, n.30, p.6305–6316, 2010.

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

LOBATO, J.; SILVA, D.A.; MINEO, T.W.; AMARAL, J.D.; SEGUNDO, G.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency vírus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.13, n.1, p.84-89, 2006.

LOPES, M. A.; CARVALHO, F. M. Custo de produção do gado de corte. Lavras: Editora UFLA, 2002. (Boletim técnico, n.47). Disponível em: http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/boletim/bol_47.pdf>.

LOVETT, J.L.; HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.107,n.1, p.33-43, 2000.

LUNDEN, A.; PARMLEY, S.F.; BENGTSSON, K.L.; ARAUJO, F.G. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**. v.83, n.1, p.6-9, 1997.

LV, Q.; XING, S.; GONG, P.; CHANG, L.; BIAN, Z. A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. **Experimental Parasitology**. v.148, p.56-65, 2015.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Imunodiagnóstico em medicina veterinária. **Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, 360 p, 2001.

MAEDA,Y.; KINOSHITA, T. Structural, remodeling trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Progress in Lipid Research**, v.50, n.4, p.411-24, 2011.

MALIK, P.; TERRY, T.D.; GOWDA, L.R.; LANGARA, A.; PETUKHOV, M.F.; WELSH, L.C.; MARVIN, D.A.; PERHAM, R.N. Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n.1, p.9-21, 1996.

MANGER, I.D.; HEHL, A.B.; BOOTHROYD, J.C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**, v.66, n.5, p.2237-2244, 1998.

MARQUES FA, HEADLEY AS, FIGUEREDO-PEREIRA V, TARODA A, BARROS LD, CUNHA IA, MUNHOZ K, BUGNI FM, ZULPO DL, IGARASHI M, VIDOTTO O, GUIMARÃES JS JR, GARCIA JL. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (Bos indicus). **Parasitology Research**, v.108, n.4, p.1015-1019, 2011.

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, C. K.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro. Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v.44, n.4, p.773-777, 2012.

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

MCCAFFERTY, J.; SCHOFIELD, D. Identification of optimal protein binders through the use of large genetically encoded display libraries. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.26, p.16-24, 2015.

MCCANN, C.M.; VYSE, A.J.; SALMON. R.L.; THOMAS, D.; WILLIAMS, D.J.; MCGARRY, J.W.; PEBODY, R.; TREES, A.J. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.6, p.978-980, 2008.

MEISNNER, M.; SCHLUTER, D.; SOLDATI, D. Role do *Toxoplasma Gondii* myosin in powering parasite glinding and host cell invasion. **Science**, v.298, n.5594, 837-840, 2002.

MICHELS, I. L.. A bovinocultura de corte brasileira e o mercado externo: regiões sanitárias e a cadeia produtiva da carne bovina de Mato Grosso do Sul. 321f. Tese (Doutorado em Geografia Humana) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Departamento de Geografia, São Paulo, 2000.

MINEO, J. R, McLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I.A.; ELY, K.H.; KASPER, L.H.. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v.150, n.9, p.3951–3964, 1993.

MINERVINO, A.H.; CASSINELLI, A.B.; LIMA, J.T.; SOARES, H.S.; MALHEIROS, A.F.; MARCILI, A.; GENNARI, S.M. Prevalence of Anti-*Neospora caninum* and Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Dogs From Two Different Indigenous Communities in the Brazilian Amazon Region. **Journal of Parasitology**, v.98, n.6, p.1276-1278, 2012.

MOORE, D.P.; DRAGHI, M.G.; CAMPERO, C.M.; CETRÁ, B., ODEÉN, A.C.; ALCARAZ, E.; SPÄTH, E.A.J. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in beef bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.4, p.247–252, 2003.

MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BEALTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical trans-mission for Sarcocystis cruzi and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.51-54, 2009.

MORGENS, D.W.; CHANG, C.H.; CAVALCANTI, R.O. Ambushing the ambush hypothesis: predicting and evaluating off-frame codon frequences in Prokaryotic Genomes. **BMC Genomics**, v.14, n.418, p.1-8, 2013.

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, n.3-4, p.149-158, 2003.

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

NETO, H. Maiores rebanhos bovinos em 2014. Scot Consultoria[®]. 30 Set. 2014. Disponível em: <<u>https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/todas-noticias/36510/maiores-rebanhos-bovinos-em-2014.htm</u>> Acesso em: 10 Jan. 2017.

NGO, H.M.; HOPPE, H.C.; JOINER, K.A. Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. **Trends in Cell Biology**, v.10, n.2, p.67-72, 2000.

NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Delivery of *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus. **Parasitology Reseach**, v.86, n.11, p.934-939, 2000.

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; MAKALA, L.; XUAN, X.; NAGASAWA, H. *Neospora caninum* NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.3-4, p.191-201, 2002.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTEGARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.301-308, 2003.

PARKINSON, T. Infertility and subfertility in the cow: structural and functional abnormalities, management deficiencies and non-specific infections. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England. **Veterinary reproduction and obstetrics**. (9th ed.). p.393-475. London: Saunders Elsevier, 2009.

PEREIRA, L.M., CANDIDO-SILVA, J.A., De VRIES, E., YATSUDA, A.P. A new thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum* (NcMIC2-like1). **Parasitology**, v.138, n.3, p.287-297, 2011.

PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G.; BRAZILIAN COFFEE GENOME PROJECT CONSORTIUM. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of Coffea arabica and Coffea canephora. **BMC Plant Biology**. v.11, n.30, p.1-22, 2011.

PEREIRA, L.M.; YATSUDA, A.P. Comparision of an ELISA assay for the detection of adhesive/invasive *Neospora caninum* tachyzoites. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n.1, p.36-43, 2014.

PIERGILI FIORETTI, D.; PASQUALI, P.; DIAFERIA, M.; MANGILI, V.; ROSIGNOLI, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. **Journal of Veterinary medicine B Infectious diseases and Veterinary Public Health**. v. 50, n.8, p.399-404, 2003.

PINITKIATISAKUL, S.; FRIEDMAN, M.; WIKMAN, M.; MATTSSON, J.G.; LUNDÉN, A. Immunogenicity and protective effect against murine cerebral neosporosis of recombinant NcSRS2 in different iscom formulations. **Vaccine**, v.25, n.18, p.3658–3668, 2007.

PRINCE, J. B.; AUER, K. L.; KUSKINSON, J.; PARMLEY, S. F.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.43, n.1, p.97-106, 1990.

POLLO-OLIVEIRA, L.; POST, H.; ACENCIO, M.L.; LEMKE, N.; TOORN, H.V.D.; TRAGANTE, V.; HECK, A.J.R.; ALTELAAR, A.F.M.; YATSUDA, A.P. Unravelling the *Neospora caninum* secretome through the secreted fraction (ESA) and quantification of the discharged tachyzoite using high-resolution mass spectrometry-based proteomics. **Parasites & Vectors**, v.6, n.1, p.1-14, 2013.

POLLO-OLIVEIRA, L. *Neospora caninum*: estudo do secretoma e caracterização molecular de três proteínas com domínios Apple. Tese (doutorado). **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, São Paulo. 249f, 2013.

QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; SEIJAS-CARBALLEDO, A.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. In: Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v.30, p.877–924, 2000.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Current Science**, v.80, p.1121-1128, 2001.

REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense?. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.1-2, p.23–34, 2006.

REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. *Neospora caninum* – How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, v.39, n.11, p.1173-1187, 2009.

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

REID, A.J.; VERMONT, S. J.; COTTON, J. A.; HARRIS, D.; HILL-CAWTHORNE, G.A.; KÖNEM-WAISMAN, S.; LATHAM, S.M.; MOURIER, T.; NORTON, R.; QUAIL, M. A.; SANDERS, M.; SHANMUGAM, D.; SOHAL, A.; WASMUTH, J. D.; BRUNK, B.; GRIGG, M.E.; HOWARD, J. C.; PARKINSON, J.; ROOS, D.S.; TREES, A. J.; BERRIMEN, M.; PAIN, A.; WASTLING, J. M. Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathogens**, v.8, n.3, p.1-15, 2012.

RHAIEM, R.B.; HOUIMEL, M. Targeting Leishmania major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Tropica**, v.159, p.11-19, 2016.

RODRIGUEZ, A.E.; CHRISTENSEN-FLORIN, M.; FLORES, D.A.; ECHAIDE, I.; SUAREZ, C.E.; SCHNITTGER, L. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protein repertoire of *Babesia bovis* and its significance for erythrocyte invasion. **Ticks and Tick-borne Disease**, v.5, n.3, p.343-348, 2014.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli:* advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n.172, p.1-17, 2014.

JIMÉNEZ-RUIZ, E.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; SALMAN, H.; IRACHE, J. M.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly- ϵ -caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccine**, v.30, n.33, p.4983-4992, 2012.

SANTOS, J.M.; LEBRUM, M.; DAHER, W.; SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J.F. Apicomplexan cytoskeleton and motors: Key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. **International Journal for Parasitology**. v.39, n.2, p.153-162, 2009.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, n.2, p.87-98, 1998.

SHAAPAN, R.M. The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. **Journal of Parasitic Diseases**. v.40, n.4, p.1116-1129, 2016.

SHAROM, F.J.; RADEVA, G. GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals. **Subcellular Biochemistry**, v. 37, p.285–315, 2004.

SHEN, H.B.; CHOU, K.C. Signal-3L: a 3-layer approach for predicting signal peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.363, n.2, p.297-303, 2007.

SHEN, B.; SIBLEY, L.D. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, n.4, p.449-455, 2012.

SINGH, T.R.; PARDASANI, K.R. Ambush hypothesis revisited: Evidences for phylogenetic trends. **Computational Biology and Chemistry**, v.33, n.3, p.239-244, 2009.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v.228, n.4705, p.1315-1317, 1985.

SOARES, C.R.; GOMIDE, F.I.; UEDA, E.K.; BARTOLINI, P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambdaPL promoter: use of HPLC for product quantification. **Protein Engineering**, v.16, n.12, p.1131-1138, 2003.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.3, n.12, p.1293-1302, 2001.

SONDA, S.; FUCHS, N.; CONNOLLY, B.; FERNANDEZ, B.G.; HEMPHILL. The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.97, n.1-2, p.97-108, 1998.

STEVENS, M.G.; TABATABAI, L.B.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Immune responses to superoxide dismutase and synthetic peptides of superoxide dismutase in cattle vaccinated with Brucella abortus strain 19 or RB51. **Veterinary Microbiology**. v.41, n.4, p.383–389, 1994.

SUDAN, V.; TEWARI, A.K.; SINGH, H. Molecular characteriozation and sequence phylogenetic analysis of surface antigen 3 (SAG3) gene of local indian isolates (Chennai and izatnagar) of *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.57, n.3, p.205-209, 2015.

SUNDELL, G.N.; IVARSSON, Y. Review Article: Interaction Analysis through Proteomic Phage Display. **Biomed Research International**, v.2014, n.176172, p.1-9, 2014.

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

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. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, p.147-54, 2002.

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Luiz Miguel Pereira. Plasmídeo recombinante para expressão constitutiva e uso do mesmo. BR n. 1020160047331, 02 Março 2016.

VILLALOBOS, E.M.; FURMAN, K.E.; LARA, M.D.O.C.; CUNHA, E.M.; FINGER, M.A.; BUSCH A.P.; DE BARROS FILHO, I.R.; DECONTO, I.; DORNBUSCH, P.T.; BIONDO, A.W. Detection of *Neospora sp.* antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.21, n.1, p.68-70, 2012.

VAVROVA, L.; MUCHOVA, K.; BARAK, I. Comparison of different *Bacillus subtilis* expression systems. **Research Microbiology**. v. 161, n.9, p.791-797, 2010.

WASMUTH, J.D.; PSZENNY, V.; HAILE, S et al. Integrated bioinformatic and targeted deletion analyses of the SRS gene superfamily identify SRS29C as a negative regulator of *toxoplasma* virulence. **mBio**. v.3, n.6, p.1-13, 2012.

WESTON, J.F.; HEUER, C.; WILLIAMSON. N.B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.103, n.2-3, p.136-144, 2012.

WETZEL, D. M.; HÅKANSSON, S.; HU, K.; ROOS, D.; SIBLEY, L. D. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. **Molecular Biology of the Cell**. v.14, n.2, p.396-406, 2003.

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, n.4, p.347-58, 2000.

WILLIAMS, D.J.; HARTLEY, C.S.; BJORKMAN, C.; TREES, A.J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v.136, n.14, p.1895-1900, 2009.
ANEXOS

Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO EUA Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais CERTIFICADO Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 13.1.361.53.9), intitulado: "Caracterização e Identificação de Proteínas de Superfície da Família SRS do Apicomplexa Neospora caninum", de autoria de Marcos Alexandre Bezerra e de Ana Patrícia Yatsuda Natsui, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto - USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06.05.2013. Colaboradores: Luciana Baroni; Luiz Miguel Pereira; Carla de Agostino Biella This is to certify that the work (Protocol number 13.1.361.53.9), entitled: "Caracterização e Identificação de Proteínas de Superfície da Familia SRS do Apicomplexa Neospora caninum", by Marcos Alexandre Bezerra and Ana Patricia Yatsuda Natsui, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto - USP, and was approved in the meeting, May, 6 2013. Ribeirão Preto, 13 de maio de 2013. RAN Presidente da CEUA Profa.Dra. Claudia Maria Padovan a da CEUA Maria Angélica Depiro Av. Randeirantes: 3900 - CEP 14040-900 - Ribeirán Preto - Sán Paulo Fone: (18) 3802 4469 - Fax: (18) 3833 7964