UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Caracterização molecular de proteínas de roptrias (ROP15B e ROP55) de *Neospora caninum*.

Julia Audrey de Paula

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular de proteínas de roptrias (ROP15B e ROP55) de *Neospora caninum*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Julia Audrey de Paula
Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 19/11/2018 (Data da Defesa). A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2019

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

De Paula, Julia Audrey.
Caracterização molecular de proteínas de roptrias (ROP15B e ROP55) de *Neospora caninum*. Ribeirão Preto, 2018.
57 p.: il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Natsui Yatsuda, Ana Patrícia.

1. Neospora *caninum*. 2. Proteínas de roptria. 3. NcROP15B e NcROP55.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Julia Audrey de Paula

Caracterização molecular de proteínas de roptrias (ROP15B e ROP55) de *Neospora caninum*.

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria das Graças
e Jader, e aos meus irmãos, Juliane e Jailson.
Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora **Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui** pela paciência, confiança, ensinamentos e incentivo à pesquisa e por ter sido uma pessoa fundamental em minha caminhada profissional. Minha sincera admiração e gratidão!

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação integral ao mestrado e a operacionalização da pesquisa.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia Molecular da FCFRP: Luciana Baroni (Lu), Luiz Miguel Pereira (Buda), Jade Venâncio, Marcos Alexandre Bezerra, Isabel Cristina Vigatto Ferreira (Bel) por toda a colaboração, companheirismo e momentos bons e alegres vividos juntos. Em especial ao Buda e a Lu pela paciência, solidariedade, conversas descontraídas, pela troca de conhecimento ao longo desses dois anos e por todo auxílio durante os experimentos. A ajuda de vocês foi essencial. Muito obrigada!

À Maraísa Palhão Verri (Mara), meu agradecimento por todo apoio técnico, por todos os ensinamentos e por todo o trabalho desenvolvido ao seu lado nesse tempo. Em cada trabalho, inúmeros aprendizados, os quais levarei por onde seguir. Obrigada também pela paciência, alegria e conselhos.

Ao João Vitor, Vitor Trinca, Mariana Mendes, Luana e Henrique, pela alegria e de poder compartilhar o espaço de laboratório com vocês. Agradeço aos professores que ministraram as disciplinas de pós-graduação de que participei durante o mestrado, pelo conhecimento compartilhado. E a todos os funcionários da FCFRP – USP pela atenção e competência.

À Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, agradeço pela oportunidade de estágio na disciplina de Parasitologia pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Obrigada pela confiança, aprendizado e por todo trabalho desenvolvido.

À Casa da Ciência do Hemocentro de Ribeirão Preto – SP e ao Projeto de Ensino Interdisciplinar Comunitário (PEIC) por proporcionarem momentos incríveis de aprendizado e conhecimento e darem mais sentido da importância da educação e do papel do educador e educando na minha vida. À Márcia Mendes Ruiz Cantano, pelas Tardes Pedagógicas, trocas de conhecimentos, pela admiração e paixão pela educação e pedagogia e por me motivar a seguir o caminho da educação.

À minha família por todo auxílio, por me apoiarem e pelo esforço para que eu tivesse uma boa formação superior. Às minhas sobrinhas, Luiza e Mariana, por terem orgulho de uma tia professora de ciências. Meu eterno amor e gratidão por vocês!

Às minhas amigas e técnicos de Handebol dos times de Ribeirão, Unesp/Ibilce, Farma e LAURP, pela convivência, viagens, risadas, aprendizado e jogos. Em especial, às meninas da LAURP-USP que me receberam e me acolheram

tão bem ao longo desses dois anos. Serei eternamente grata por todos os momentos compartilhados ao lado de vocês. É o “time lindo, time maravilhoso” do meu coração. Muito obrigada!

Aos meus amigos da graduação, levarei histórias lindas vividas ao lado de vocês. Os de Ribeirão Preto; às meninas do Anísio, a Daiane Segali e Bárbara Oliveira, é uma alegria ter vocês em minha vida. Em especial a Marina Neves, por todo auxilio e amizade.

Às minhas amigas Lívia Calixto, Maria Júlia Prado e Sofia Mussolin, por toda a paciência, compreensão, apoio e companhia em todos os momentos. Obrigada por serem tão especiais na minha vida.

E aos meus novos amigos da Grande Vitória-ES, por toda alegria, apoio, resiliência, empatia, companheirismo e amparo ao longo desses meses. Em especial a Thainá, pela paciência, ajuda, determinação, felicidade, fit dance, doces e momentos de descontração. Muito obrigada!

Aos estudantes que tive a honra de conhecer esse ano e deixam meu dia mais iluminado.

E por fim, mas não menos importante, à **Amora** por deixar minha vida mais alegre.

MUITO OBRIGADA!

Julia Audrey de Paula (Xúlia)

“I hope you get your dreams
Just go ahead, let your hair down
You're gonna find yourself somewhere, somehow”

Corinne Bailey Era

Resumo

DE PAULA, J. A**. Caracterização molecular de proteínas de roptrias (ROP15B e ROP55) de *Neospora caninum*.** 2018. 57f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Neospora caninum (Apicomplexa) é o agente causador da neosporose, descrita como a principal causa de aborto parasitário em gado bovino .Parasitos desse filo interagem e invadem as células hospedeiras através da secreção coordenada de proteínas do complexo apical, formado por diversas organelas, dentre elas as roptrias (ROPs), que desempenham papel fundamental no processo de infecção, associado à formação do vacúolo parasitóforo (PV), sobrevivência no ambiente intracelular e virulência do parasito. Essas proteínas podem ser caracterizadas em: proteínas de roptrias de pescoço (RONs), e proteínas de roptrias (ROPs). Além disso, algumas ROPs podem se diferenciar e, dessa maneira, constituem uma grande família de quinases e pseudo-quinases, denominada família de roptrias quinase (ROPKs). O objetivo deste estudo foi caracterizar as proteínas de roptrias NcROP15B (NcLIV_011700) e NcROP55 (NcLIV_031550) de *N. caninum*. As sequências de NcROP15B e NcROP55 foram alinhadas com homólogos de alguns microrganismos, incluindo apicomplexas, ao BLAST. NcROP15B apresentou identidade de 19% com as sequencias de ROP15 de *T. gondii* e *Hammondia hammondi.* NcROP55 mostrou identidade de 14% com a ROP37 de *T. gondii* e com ROP28 de *Hammondia hammondi*, e 15% com a ROP28 de *Neospora caninum*. Foram detectados domínios pertencentes à família de proteínas quinase para NcROP15B e NcROP55, e peptídeo sinal apenas para NcROP15B. Os primers foram delineados para amplificar regiões de cDNA de ambos os genes com diferentes tamanhos, denominados NcROP15B maior, NcROP15B menor, NcROP55 maior e NcROP55 menor. Os insertos foram subclonados (pGEM) e posteriormente ligados em plasmídeo de expressão pET28 em *E. coli* BL21(DE3) e a expressão recombinante induzida por IPTG. As formas recombinantes foram expressas com 30 kDa e 16 kDa (NcROP15B fragmento Maior e Menor, respectivamente) e NcROP55 Maior e Menor gerou um peso molecular de 19.9 kDa e 15 kDa, respectivamente. Após purificação, NcROP15B e NcROP55 foram utilizadas para obtenção de soros policlonais. Anti-ROP15B e anti-ROP55 reagiram com extrato de *N. caninum* em Western Blot 1D, tendo NcROP15B sido detectada com 35 kDa, próximo ao predito (32 kDa) e NcROP55 com aproximadamente 35 KDa, porém abaixo do predito (47.9 kDa). Na imunofluorescência confocal, NcROP-15B e NcROP55 exibiram padrão de localização na região perinuclear de taquizoítos de *N. caninum*. Os anticorpos anti-NcROP15B e anti-NcROP55 apresentaram, individualmente, capacidade limitada para inibir o processo de adesão/invasão de *N. caninum,* sendo 16% e 6,43% respectivamente. Quando os soros anti-NcROP15B e anti-NcROP55 foram associados, a a inibição da invasão aumentou para 62%. As proteínas NcROP-15B e NcROP55 podem representar quinases importantes no metabolismo de *N. caninum*, e podem estar relacionadas ao processo de invasão e proliferação do parasito. Dessa maneira, são possíveis alvos para se considerar no estudo de medidas preventivas, sendo necessários mais estudos para avaliar suas funções na sobrevivência intracelular e virulência de *N. caninum*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, roptrias, invasão celular, proteínas quinases, NcROP15B, NcROP55

ABSTRACT

DE PAULA, J. A**. Molecular characterization of rhoptry proteins (ROP15B and ROP55) from *Neospora caninum*.** 2018. 57f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Neospora caninum (Apicomplexa) is the causative agent of neosporosis, described as the main responsible of parasitic abortion in cattle. Parasites of this phylum interact and invade the host cells through a coordinated secretion of proteins of the apical complex, formed by organelles like rhoptries, which play a key role in the infection process, associated to the formation of the parasitophorous vacuole (PV), intracellular survival and parasite virulence. These proteins can be characterized in: neck rhoptry proteins (RONs), and rhoptry proteins (ROPs). Some ROPs can differentiate and thus constitute a large family of kinases and pseudo-kinases, called the kinase rhoptry family (ROPKs). The aim of this study was to characterize *N. caninum* NcROP15B (NcLIV_011700) and NcROP55 (NcLIV_031550) rhoptry proteins. The amino acid sequences of NcROP15B and NcROP55 were aligned with homologous proteins from some microorganisms, including apicomplexan on BLAST. NcROP15B showed a 19% identity with the ROP15 of *T. gondii* and *Hammondia hammondi.* NcROP55 had 14% of identity with ROP37 of *T. gondii* and with ROP28 of *Hammondia hammondi*, and 15% with ROP28 of *Neospora caninum*. Domains were detected belonging to the protein kinase family for NcROP15B and NcROP55, and signal peptide only for NcROP15B. Primers were designed to amplify cDNA regions of both genes, opting for fragments of different sizes, names as NcROP15B major, NcROP15B minor, NcROP55 major and NcROP55 minor. The inserts were subcloned (pGEM) and then ligated into pET28 expression plasmid in *E. coli* BL21 (DE3) and IPTG-induced recombinant expression. The recombinant forms were expressed with 30 kDa and 16 kDa (NcROP15B Major and Minor, respectively) and Major and Minor NcROP55 had molecular weights of 19.9 kDa and 15 kDa, respectively. After purification, NcROP15B and NcROP55 were used to obtain polyclonal serum. Anti-ROP15B and anti-ROP55 reacted with *N. caninum* extract in Western Blot 1D, with NcROP15B being detected at 35 kDa, near predicted (32 kDa) and NcROP55 at approximately 35 KDa, but below the predicted (47.9 kDa). At confocal immunofluorescence, NcROP-15B and NcROP55 exhibited a localization pattern at the perinuclear region of *N. caninum* tachyzoites. Anti-NcROP15B and anti-NcROP55 antibodies had, individually, limited ability to inhibit the *N. caninum* adhesion/invasion process (16 and 6,43%, respectively). When associated, anti-NcROP15B and anti-NcROP55 sera inhibition of invasion increased to 62%. NcROP-15B and NcROP55 proteins might represent important kinases in the metabolism of *N. caninum* with a possible role in the parasite invasion and proliferation process. Thus, they represent possible targets for preventive measures, but further studies are necessary to evaluate their functions in intracellular survival and virulence of *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*, rhoptries, cell invasion, protein kinases, NcROP15B, NcROP55.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida heteroxênico de *N. caninum*. 2

Figura 2- Representação morfológica das formas evolutivas taquizoíto de Toxoplasma e merozoíto de *Plasmodium falciparum*. 3

Figura 3 - Etapas no processo de invasão do Apicomplexa *Toxoplasma gondii*. 5

Figura 4 - Proteínas de pescoço de roptrias e proteína de roptrias (RONs e ROPs, respectivamente) durante e após a invasão em *Plasmodium spp*. 8

Figura 5 - Filogenia das subfamílias de roptrias quinases de *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis neurona* e *Eimeria tenella*. 9

Figura 6 – Posição dos fragmentos menor e maior de NcROP15 e NcROP55 em relação as respectivas sequências completas. 15

Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína NcROP15B com proteínas presentes em apicomplexas e outros microrganismos. 26

Figura 8. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína NcROP55 com sequencias similares de outras proteínas de roptrias de apicomplexas. 28

Figura 9. Amplificação por PCR dos genes de roptrias de *N. caninum* NcROP15B e NcROP55. 29

Figura 10. Clonagem de NcROP15B maior e menor no plasmídeo pGEM-T-Easy. 30

Figura 11. Clonagem de NcROP15B Maior/Menor no plasmídeo pET28. 31

Figura 12. Teste de temperatura para expressão das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP15B menor e NcROP55 maior e menor. 33

Figura 13. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP15B Menor e NcROP55 Maior/Menor. 34

Figura 14. Teste de solubilidade da proteína NcROP15B Maior. 35

Figura 15. Purificação das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP15B Maior e NcROP15B Menor. 36

Figura 16. Purificação das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP55 Maior e NcROP55 Menor, respectivamente. 37

Figura 17 – Reatividade dos soros policlonais anti-ROP15B e anti-ROP55 com extrato de *N. caninum* para localização de suas proteínas nativas. 38

Figura 18. Localização por imunofluorescência de NcROP15B e NcROP55 em taquizoítos de *N. caninum*. 40

Figura 19. Localização por imunofluorescência do anticorpo pré-imune em taquizoítos de *N. caninum*. 42

Figura 20. Ensaio de inibição de invasão de taquizoítos de *N. caninum* com soros anti-NcROP15B e anti-NcROP55. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers para amplificação da sequência ROP15B Maior e Menor e ROP55 Maior e Menor. 14

Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais utilizados para obtenção de soro policlonal. 22

Tabela 3. Informações dos genes NcROP15B e NcROP55 de N. caninum no banco de dados ToxoDB. 25

Tabela 4. Valores de identidade/similaridade (%) de NcROP15B com sequências de *Toxoplasma gondii* (TgROP15), *Hammondia hammondi* (HhROP15), *Streptomyces sp* e *Paracoccus solventivorans*. 27

Tabela 5. Valores de identidade/similaridade (%) de NcROP55 com sequências de *Toxoplasma gondii* (TgROP37), *Hammondia hammondi* (HhROP28), *Eimeria necatrix* (EnROP30) e *Neospora caninum* (NcROP28). 28

Tabela 6. Características de NcROP15 e NcROP55 e respectivos fragmentos. 32

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLA

$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônio
°C	Graus Célcius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
1-D	Unidimensional
Å	Ângstron
A_{260}	Absorbância em 260 nm
A_{280}	Absorbância em 280 nm
ACF	Adjuvante completo de Freund
AIF	Adjuvante incompleto de Freund
AMA	Antígeno apical de membrana (*apical-membrane antigen*)
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BLASTp	BLAST de proteína
BSA	Albumina de soro bovino
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
CO_2	Gás carbônico
CPRG	Clorofenolred-β-D-galactopiranoside
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetrácetico

ELISA	Ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
EUA	Estados Unidos da América
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
g	Gravidade
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodálton
kg	Quilograma
kV	Quilovolts
LacZ	Gene para β-galactosidase
LB	Luria-Bertani
M	Molar
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
MIC	Proteína de micronema (*microneme protein*)
MJ	Junção móvel (*moving junction*)
MVP	Membrana do vacúolo parasitóforo
mA	miliampère
mg	miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MyoA	Miosina A
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NaH_2PO_4	Fosfato monossódico
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nc	*Neospora caninum*
NCBI	*National Center for Biotecnology Information*
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OD	Densidade ótica
OD_{600}	OD a 600 nm
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	PBS adicionado de Tween ou Triton x-100
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogénio iónico
PV	Vacúolo parasitóforo (*parasitophorous vacuole*)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
ROMs	Romboides
RON	Proteína de pescoço de roptria (*rhoptry neck protein*)
ROP	Proteína de bulbo de roptria (*rhoptry body protein*)
ROPKs	Proteínas de roptrias quinase
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAG	Antígeno e superfície ancorado a GPI (*GPI-anchored surface antigens*)
SDS	Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SRS	Proteínas de Superfícies Relacionadas à SAG
TAE	Tampão Tris acetato-EDTA
TB	*Terrific Broth*
TJ	Junção apertada (*tight junction*)
TOP 10	Células de E. coli eletrocompetentes para clonagem
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Radiação ultravioleta
V	Volts
Vero	*Verda reno* (rim verde - células epiteliais de rim de macaco verde)
W	Watt
µF	Microfaraday

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Listas de figuras iii
Listas de tabelas v
Listas de abreviaturas e siglas vi

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Invasão da célula do hospedeiro pelo parasito do Filo Apicomplexa 4
1.2 Papéis das roptrias na invasão celular do hospedeiro 7
1.3 Proteínas de roptrias com potencial fator de virulência em células hospedeiras 10

2. OBJETIVOS 12
2.1 Geral 12
2.2 Específico 12

3. MATERIAL E MÉTODOS 12
3.1 Cultivo in vitro e manutenção de taquizoítos 12
3.1.1 Cultura de *N. caninum* selvagem 13
3.1.2 Cultura de *N. caninum* Lac-Z 13
3.2 Análises *in silico* para obter ROP15B e ROP55 13
3.3 Delineamento dos iniciadores 13
3.4 Extração de RNA e obtenção de cDNA de *N. caninum* 16
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 16
3.6 Eletroforese em gel de agarose 17
3.6.1 Purificação em gel de agarose 17
3.7 Preparação de células eletrocompetentes 18
3.8 Ligação em vetor de clonagem e transformação de células eletrocompetentes 18
3.9 Purificação de plasmídeos selecionados (miniprep) 19
3.10 - Clonagem do vetor de expressão e ensaios de expressão heterólogos 19
3.11-Teste de solubilidade 20

3.12 - Purificação das proteínas recombinantes em resina de níquel 20
3.13-Anticorpos policlonais anti-His-ROP15B ou anti-His-NcROP55 21
3.14 Eletroforese em gel de acrilamida 22
3.14.1- SDS-PAGE1D 22
3.15 - Western blot 23
3.16- Imunofluorescência 23
3.17- Ensaio de invasão 24
3.18- Análises estatísticas 24

4.RESULTADOS 25
4.1 Análise *in silico* das proteínas em *Neospora caninum* 25
4.1.1 Busca pelos genes que codificam ROP15B e ROP55 em *N. caninum* 25
4.1.2 Análise *in silico* das sequências de NcROP15B e NcROP55 25
4.2 Clonagens de NcROP55 e NcROP15B 29
4.3 Expressão e purificação das proteínas 31
4.3.1 Teste de expressão com diferentes temperaturas 32
4.3.2 Teste de Solubilidade 33
4.3.3 Purificação 35
4.4 Western *blot* 37
4.4.1 W*estern blot* 1D para caracterização dos anticorpos e identificação das proteínas nativas NcROP15B e NcROP55 37
4.5 Imunofluorescência 38
4.6 Ensaio de Invasão 42

5. DISCUSSÃO 43

6. CONCLUSÕES 47

7. REFERÊNCIAS 48

ANEXO I 57

1. INTRODUÇÃO

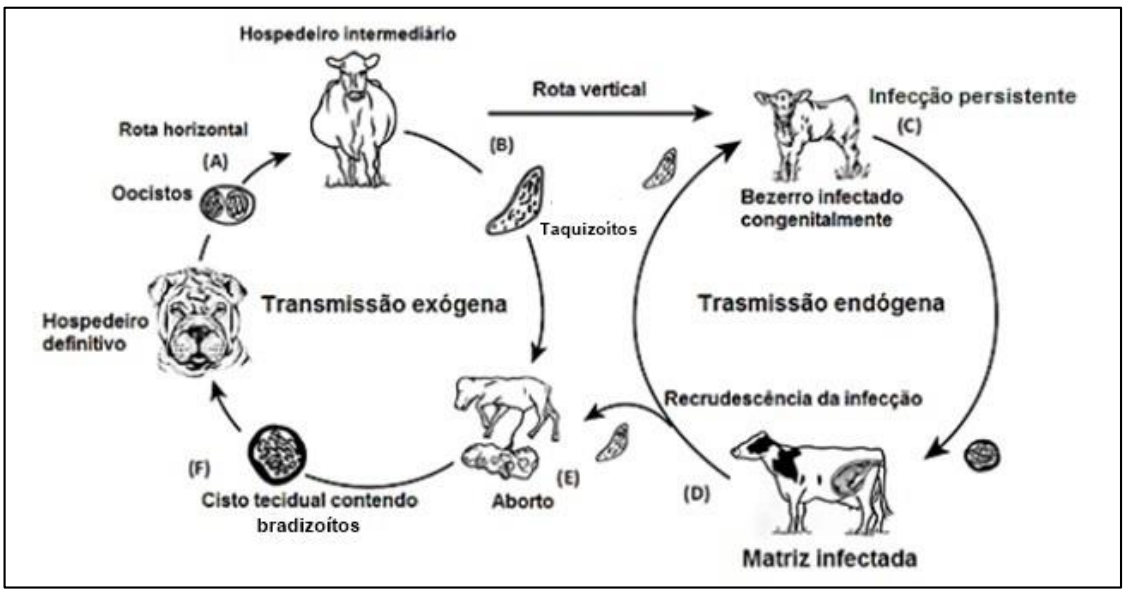
Neospora caninum (*N. caninum*) é um protozoário do filo Apicomplexa, da família Sarcocystidae (DUBEY et al., 1988). Esse parasito é agente causador da doença neosporose que acomete alguns animais, tais como: bovinos, cães, ovinos, porcos, caprinos, búfalos, aves e equinos (DUBEY; SCHARES, 2011). O filo constitui de muitos parasitos que são patógenos para seres humanos e animais, como *Toxoplasma gondii* (agente da toxoplasmose) (MONTOYA; LIESENFELD, 2004), *Plasmodium falciparum* (responsável pela malária) (SNOW et al., 2005) e *Eimeria tenella* (responsável pela coccidiose de galinhas) (WALLACH, 2010).

Antes de ser descoberto, *N. caninum* foi previamente confundido com *T. gondii*, por apresentar características biológicas e um ciclo de vida heteroxênico bem semelhantes (MARK et al., 1999). Porém, no final da década de 80, o parasito foi isolado, cultivado e nomeado por Dubey e colaboradores como uma nova espécie (DUBEY et al., 1988). A infecção por *N. caninum* pode acontecer por via horizontal, com a ingestão de oocistos liberados pelos hospedeiros definitivos (canídeos), e também por via vertical (transmissão transplacentária), que ocorre em hospedeiros intermediários, (com destaque para os bovinos) (Figura 1). A transmissão vertical requer atenção, pois resulta em abortos ou perdas reprodutivas, causando prejuízo às indústrias de carne e laticínios. (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 1999; LEINEWEBER et al., 2017; REICHEL et al., 2013).

Durante o desenvolvimento do parasito é possível observar três formas fundamentais: taquizoítos, bradizoítos e esporozoito (DUBEY, 2003). Oocistos não esporulados são formas liberadas nas fezes pelos hospedeiros definitivos que se infectam ao se alimentarem de carne contaminada (REICHEL et al., 2007). Estes oocistos esporulam no ambiente e podem ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários, tais como gado (Figura 1a). No interior do tubo digestivo do hospedeiro intermediário, os esporozoítos se desenvolvem para taquizoítos (Figura 1b) (HEMPHILL et al., 2006). Os taquizoítos replicam rapidamente dentro do vacúolo parasitóforo, podendo invadir e infectar eficazmente uma variedade de células hospedeiras (Figura 1e) (BARR et al., 1993; DUBEY et al., 2002). Então taquizoítos são diferenciados em bradizoítos, que residem durante a fase crônica em tecidos e órgãos (Figura 1f) (DUBEY et al., 1990; DUBEY; SCHARES, 2011). Finalmente, estes cistos teciduais podem ser transmitidos para os hospedeiros definitivos através

de carne contaminada, completando o ciclo horizontal (transmissão pós-natal) (Figura 1f) (MCALLISTER et al., 1998; REICHEL 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 reprodução 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 esporozoítos previamente liberados nas fezes de canídeos infectados agudamente; ou (B) verticalmente da mãe para o feto através da placenta (GOODSWEN et al., 2013). (C) Após a fase de proliferação rápida, *N. caninum* diferencia-se no estágio de bradizoítos 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 parasito e a reconversão de bradizoítos em taquizoítos, os quais podem atravessar a placenta e gerar uma infecção fetal (INNES, 2007). (E) A reativação de uma infecção persistente com transmissão vertical pode ocorrer sobre gestações consecutivas e pode resultar em aborto 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 bradizoítos, presentes nos tecidos do hospedeiro intermediário, são ingeridos por um hospedeiro definitivo carnívoro.



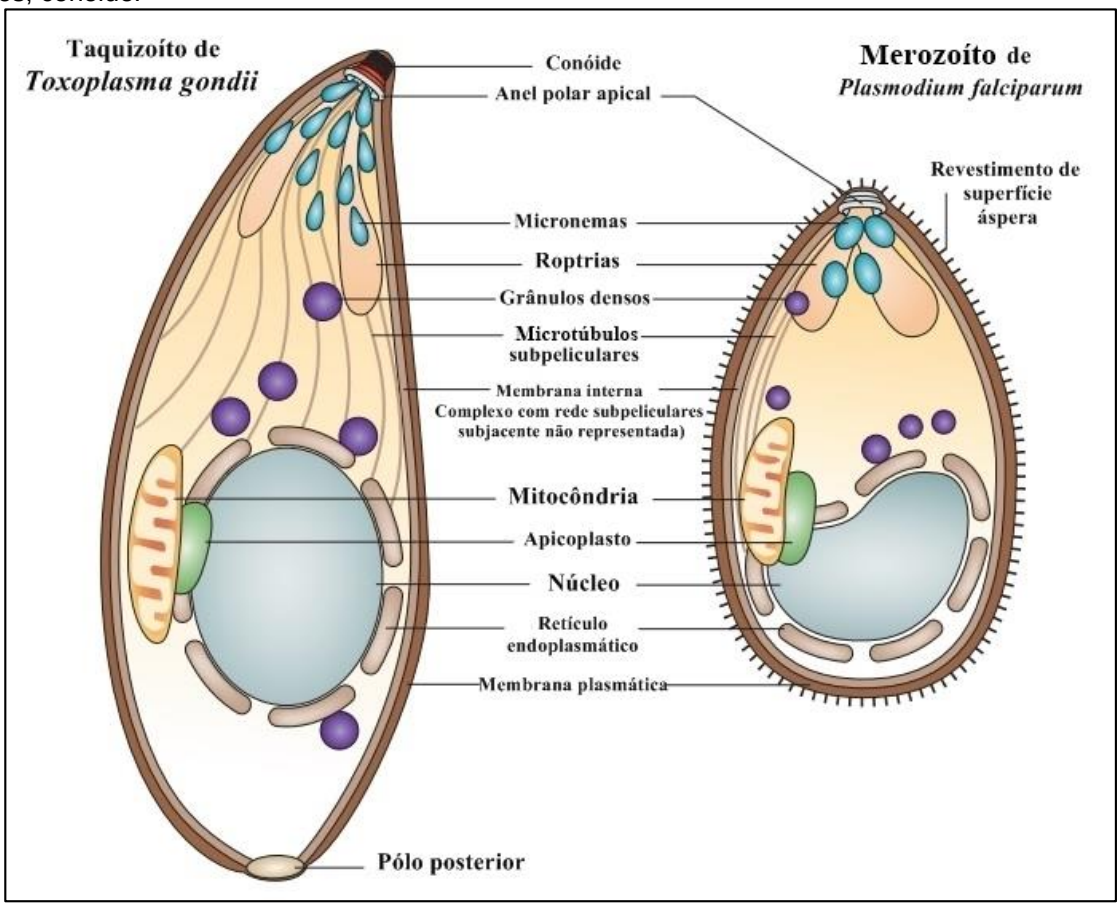
Fonte: Adaptado de GUIDO et al. (2016).

Na via vertical, os taquizoítos do animal infectado são transmitidos para o feto através da placenta, contribuindo dessa maneira para a persistência da infecção por *N. caninum* no bovino, propagando a infecção para futuras gerações (Figura 1d) (BARR et al., 1993; SCHARES et al., 1998; HIETALA; THURMOND, 1999) e sendo uma das principais causas de aborto parasitário em gado leiteiro e a principal forma de transmissão da doença (Figura 1e) (DUBEY; SCHARES, 2011; LEINEWEBER et al., 2017).

Por se tratar de um parasito intracelular obrigatório, a sobrevivência e a proliferação dos estágios “zoítos” de *N. caninum* dependem do interior da célula

hospedeira. Sendo assim, compreender os processos de invasão da célula hospedeira, assim como o desenvolvimento intracelular do parasito, representa uma importante abordagem para se aplicar alguma estratégia no controle da neosporose, quer por vacinas ou quimioterapia (HEMPHILL et al., 2013). Além disso, os processos fundamentais da invasão do parasito na célula hospedeira permanecem bastante conservados, pois o filo é caracterizado pela presença de características comuns responsáveis pela interação entre parasito e célula hospedeira. Estas incluem componentes de um conjunto de organelas secretoras denominado de complexo apical, o qual é composto por micronemas grânulos densos e roptrias localizados na extremidade apical do parasita (Figura 2) (BAUM et al., 2006). Neste contexto, grande parte das investigações moleculares desse filo, tem sido realizada em *T. gondii,* que representa um modelo chave entre os membros do grupo (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

Figura 2- Representação morfológica das formas evolutivas taquizoíto de *Toxoplasma* e merozoíto de *Plasmodium falciparum*. O complexo apical, sendo uma característica de definição de membros do filo Apicomplexa, é composto de anéis polares, micronemas, roptrias e, em alguns casos, conóide.



Fonte: Adaptado de BAUM et al (2006).

Por ser um parasito “jovem”, os estudos com *N. caninum* começaram bem tardiamente, quando comparado com outros parasitos do filo, como *T. gondii, Cryptosporidium* spp*, Eimeria* spp*, Plasmodium* spp *e Theileria* spp (DUBEY,2007). Os trabalhos abrangem no geral investigações epidemiológicas, diagnóstico e exames de expressão e localização de genes clonados, além de questões sobre a imunogenicidade do parasito. Em relação às proteínas desse parasito há escassez de dados com estudos funcionais (HAMMOUDI et al., 2015; HUI et al., 2014; LI et al., 2016; SHEN et al., 2014a, WILLIAMS et al., 2015).

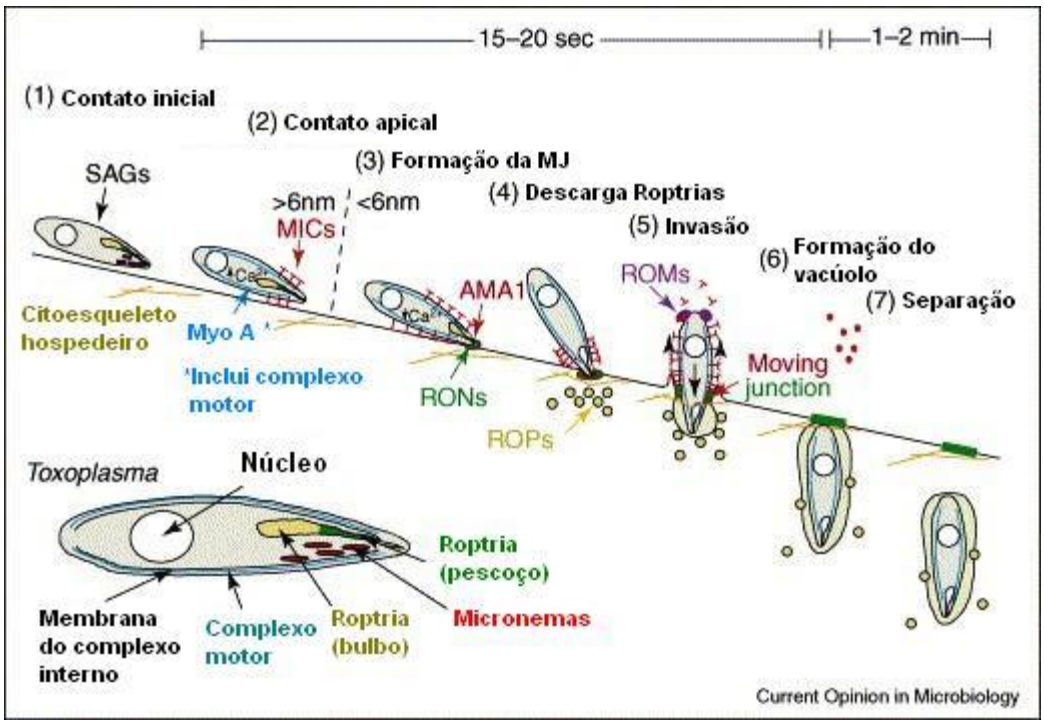
No Brasil, já foram encontrados anticorpos anti-*Neospora* spp. em canídeos nas cinco regiões do país, tanto de áreas rurais como das áreas urbanas (SNAK et al., 2018; RAIMUNDO et al., 2015; LANGONI et al., 2014; SICURPIRA et al., 2012; BENETTI et al., 2009). O mesmo se verificou para bovinos, os quais têm grande importância econômica no país, devido à produção de carne e leite (SNAK et al., 2018; RAMOS et al., 2016; CARDOSO et al., 2012; BENETTI et al., 2009; AGUIAR et al., 2006). Considerando os búfalos, foi observado uma ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* variando de 14,6% a 88%, porém não há relatos de prejuízo reprodutivo nesses animais (GENNARI et al., 2005; GONDIM et al., 2007). Pesquisas também verificaram alta soro prevalência do parasito em ovelhas, com uma taxa de transmissão vertical de 11% (em um grupo de nove animais, uma ovelha gerou duas infectadas) (FILHO et al., 2017). Anticorpos anti-*N. caninum* não são detectados apenas em ruminantes, mas há evidências de doença em diversos outros hospedeiros intermediários, animais de sangue quente, como jaguatirica, galinhas domésticas, porcos, entre outros animais (ANDRÉ et al. 2010; COSTA et al., 2008; GONDIM et al., 2010; SOARES et al., 2016).

1.1 Invasão da célula do hospedeiro pelo parasito do Filo Apicomplexa

O processo de invasão é composto de múltiplos passos de modo ativo e rápido que leva à formação de um vacúolo parasitóforo (VP), onde o parasito sobrevive e se prolifera (BRECHT et al., 2001). No início desse processo, os parasitos do filo Apicomplexa migram até seu local de preferência e invadem a célula hospedeira através de uma forma especial de movimento chamado motilidade por *gliding*. Este movimento é impulsionado por um sistema de actina-miosina que ajuda os parasitos a impelir-se para a célula hospedeira (FRENAL et al., 2010).

O processo de invasão é completado em, pelo menos em sete passos (Figura 3) a partir de ligação inicial até a entrada definitiva no interior da célula hospedeira (CARRUTHERS E BOOTHROYD, 2007). Em um primeiro momento, um contato reversível de baixa afinidade entre parasito e a membrana de superfície da célula hospedeira é estabelecido pela família das Proteínas de Superfícies Relacionadas à SAG (SRS). Em seguida o conteúdo das organelas filo específicas (micronemas e roptrias) é secretado, com liberação das proteínas micronêmicas (MIC) e de roptrias (RON e ROP). Diversas das proteínas envolvidas neste processo foram identificadas e caracterizadas em *T. gondii,* cujos estudos permitiram a construção do modelo de invasão celular da Figura 3 (BURG et al., 1988; PARMLEY et al., 1992, CESBRON-DELAUW et al., 1994; HEHL et al., 1997; MACEDO et al., 2013) e *N. caninum* (HEMPHILL, 1996; NISHIKAWA et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2001; HALDORSON et al., 2006;. ROCCHI et al., 2011; SOHN et al., 2011).

Figura 3 - Etapas no processo de invasão do Apicomplexa *Toxoplasma gondii.* O processo multifatorial se inicia com o reconhecimento pelas proteínas de superfície do taquizoíta (ex. SAG 1) e hospedeiro (1). A liberação das proteínas micronêmicas (MICs) possibilita a ligação entre ligantes e o motor de actina/miosina (MyoA) (2). O início da invasão ocorre com a interação entre as proteínas das roptrias (RONs e ROPs) e AMA 1, 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 (ROMs) (6 e 7).



Fonte: Adaptado de Carruthers e Boothroyd (2007)

Após o contato inicial, quando o nível do cálcio intracelular no interior do parasito aumenta (CARRUTHERS; SIBLEY, 1999), as proteínas são liberadas a partir de micronemas. Estas pequenas vesículas chamadas MICS, se aglomeram na porção apical da zoíto e secretam rapidamente um grande número de proteínas quando o contato inicial é feito entre o parasito e a célula hospedeira, atuando como principais fatores de adesão celular às células hospedeiras e participam do reconhecimento do parasito, reorientação e receptores de células hospedeiras (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008; BILLKER et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Proteínas de roptrias de pescoço são então liberadas de forma regulada na porção anterior do parasito, para formar uma região apertada de contato com a célula hospedeira. Dessa forma é possível a formação de um complexo estável com a membrana da célula do hospedeiro, conhecida como junção de movimento (MJ), o qual atua como um andaime para que o parasito entre na célula, resultando na formação do vacúolo parasitóforo (VP) aonde o parasito irá residir e se multiplicar (ALEXANDER et al., 2005; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; HEINTZELMAN, 2015). As roptrias também liberam uma variedade de proteínas que modulam a função da célula hospedeira (EL HAJJ et al., 2007; ONG et al., 2010; SINAI; JOINER, 2001), e que estão relacionadas com a virulência do parasito e as células de defesas do hospedeiro.

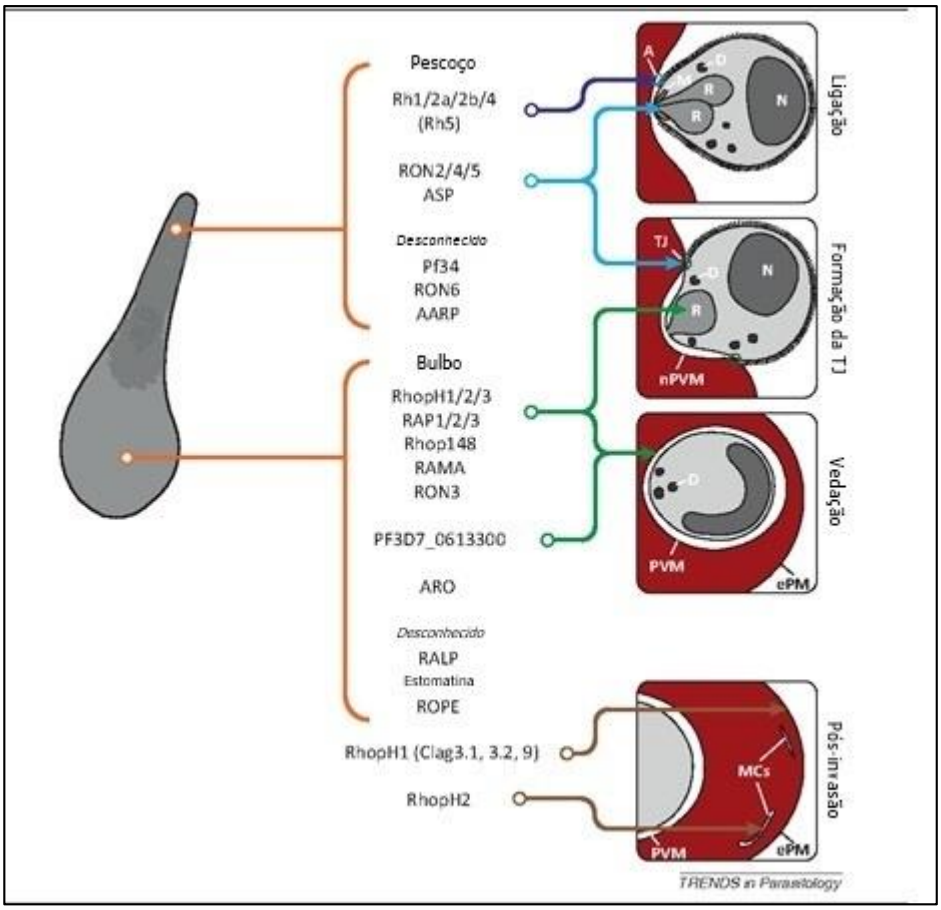
Durante a formação do MJ, as proteínas do bulbo de roptrias (ROP) são injetadas dentro do citoplasma da célula hospedeira no local de invasão. Algumas ROP ficam ligadas às pequenas vesículas destinadas a fundir-se com o desenvolvimento da membrana do vacúolo parasitóforo (MPV), enquanto outras ROP solúveis são descarregadas para dentro da célula hospedeira. Enquanto o parasito invade a célula hospedeira, complexos MIC transmembranas são também deslizados para a extremidade posterior do parasito e são clivados por proteases intramembranas denominadas rombóides. Quando o parasito invagina a membrana da superfície da célula hospedeira, o vacúolo parasitóforo está completamente formado, podendo atravessar o citoesqueleto do hospedeiro separando-se da membrana plasmática do hospedeiro para completar o processo de invasão (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Apesar da preservação relativa dos mecanismos de invasão através do filo, existem algumas diferenças. Por exemplo, *Theileria spp* representa um modo muito diferente da invasão da célula hospedeira. Os “zoitas” da *Theileria* que são não móveis na natureza invadem o hospedeiro por

um mecanismo irreversível ("*zippering*"), em vez de uma invasão ativa dependente de glideosoma. Além disso, não há orientação apical de zoita e não há proteínas micronêmicas, sendo necessárias proteínas adesivas para a invasão de zoitas em *Theileria* (KEMP et al., 2013).

1.2 Papéis das roptrias na invasão celular do hospedeiro

As roptrias são organelas específicas do filo Apicomplexa com formato de bulbo na base e afinando no pescoço (LEMGRUBER et al., 2011). Essas organelas secretam proteínas que contribuem na invasão, na sobrevivência do parasito na célula hospedeira e em alterar processos nessas células. Durante a invasão, a membrana do VP é formada a partir da membrana plasmática do hospedeiro em conjunto com as proteínas segregadas a partir das roptrias (BESTEIRO et al., 2009). Essas proteínas podem ser organizadas em duas classes, as das proteínas de roptrias de pescoço (RONs) e as proteínas de roptrias (ROPs), que atuam em momentos distintos durante o processo de invasão celular. As proteínas de roptrias de pescoço (RONs) estão localizadas na parte mais fina da organela e estão envolvidas na formação e função da junção de movimento, conforme ilustrado na figura 3 (itens 4 e 5) (ALEXANDER et al., 2005; BECK et al. 2014). Já as roptrias que estão localizadas no compartimento do bulbo, são denominadas de proteínas de roptrias (ROPs) e são secretadas posteriormente no vacúolo parasitóforo recém-formado ou na célula hospedeira (Figura 4) (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997). Algumas ROPs ainda podem se diferenciar e participar de uma grande família de quinases e pseudo-quinases, as chamadas família de roptrias quinase (ROPKs), uma classe de enzimas que regulam a transdução do sinal celular por meio da fosforilação e já que foram evidenciadas em diversos organismos do filo Apicomplexa.

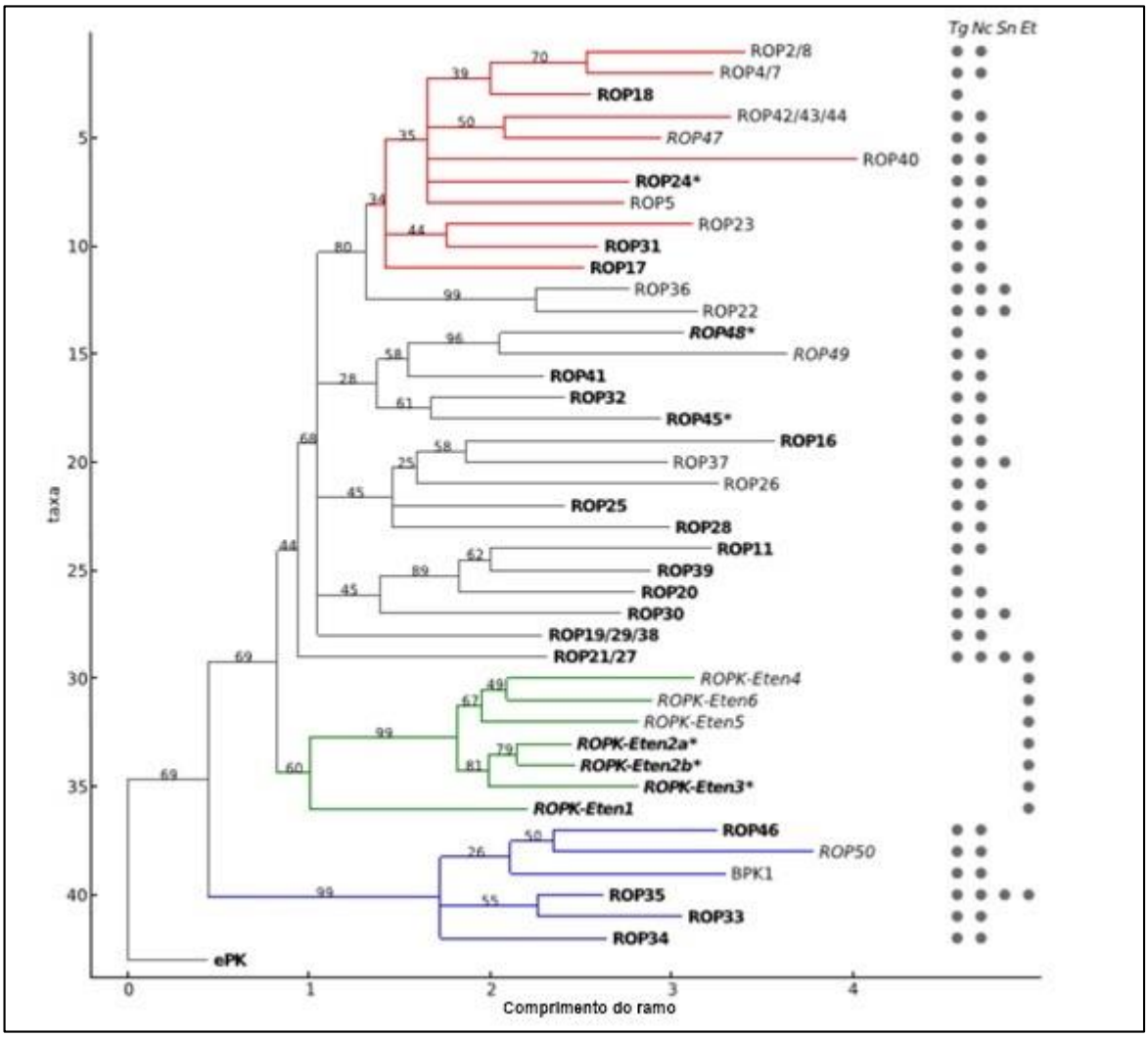
Figura 4. Proteínas de pescoço de roptrias e proteína de roptrias (RONs e ROPs, respectivamente) durante e após a invasão em *Plasmodium* spp. As proteínas de roptrias de pescoço (RONs) localizam-se predominantemente no local de adesão da superfície do merozoíto ou na junção apertada (TJ) durante a fixação e a invasão, embora a função e a localização final de vários RONs permaneçam desconhecidas. As proteínas de roptrias (ROPs) são secretadas após o parasito ter entrado completamente no eritrócito, e podem estar envolvidas na formação da membrana do vacúolo parasitóforo.



Fonte: Adaptado de COUNIHAN et al (2013).

Em 2013, Talevich e Kannan catalogaram e compararam, através de uma extensa análise *in silico,* a superfamília de roptrias quinases dos genomas de *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis neurona* e *Eimeria tenella*, delineando assim, uma árvore filogenética a partir das sequências de consenso de cada uma das subfamílias da ROPK para ilustrar o padrão evolucionário na família ROPK em vários Apicomplexa (Figura 5**)** (BRADLEY; SIBLEY, 2007; PEIXOTO et al., 2010).

Figura 5. Filogenia das subfamílias de roptrias quinases de *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis neurona* e *Eimeria tenella*. As proteínas de roptrias quinases preditas ou conhecidas são marcadas em negrito, e quinases que podem ter um mecanismo catalítico não-canônico são marcadas com um asterisco. As subfamílias ROPK recentemente propostas são rotuladas em texto itálico. O clado indicado em vermelho contém as subfamílias da ROPK com uma extensão do terminal N homóloga ao domínio da quinase (NTE). O clado em verde é específico para *E. tenella*. O clado divergente "ROPKL" é mostrado em azul. Rótulos de ramificação indicam suporte de *bootstrap*. A grade ao longo do lado direito indica as espécies em que cada subfamília aparece: *T. gondii* (Tg), *N. caninum* (Nc), *S. neurona* (Sn) e *E. tenella* (Et).



Fonte: Adaptado de Talevich e Kannan (2013).

Apesar do elevado grau de sintenia e conservação das sequências genômicas entre *N. caninum* e *T. gondii*, as regiões de codificação para secreção de fatores de virulência como as ROPs, bem como os seus níveis de expressão, revelaram diferenças consideráveis. Por exemplo, as proteínas ROP5 e ROP16 estão presentes em *N. caninum* e *T. gondii*, mas NcROP18 é um pseudogene em contraste com uma expressão muito ativa de TgROP18 (PEIXOTO et al., 2010). Pseudogenes são definidos como sequencias genômicas de DNA, similares a genes

codificadores, mas sem potencial codificador, cuja maioria se origina de cópias duplicadas de genes funcionais. (PODLAHA; ZHANG, 2010). Um gene funcional pode também tornar-se um pseudogene sem duplicação, se a sua função não confere uma vantagem ou aptidão para o organismo devido a uma mudança no ambiente ou mutação genética (ZHANG et al., 2010; MARQUES et al., 2012). ROP18 é um fator de virulência determinante de *T. gondii* que protege o vacúolo parasitário de ataque pelo sistema imunológico do organismo hospedeiro (STEINFELDT et al., 2010). Em *N. caninum* ROP18 é um pseudogene. E recentemente, Ma e colaboradores (2017), desenvolveram um plasmídeo knockout pTCR-CD para editar genes de *N. caninum* e conseguiram detectar alguns papéis de NcROP5, como um grande potencial de virulência, que também é evidenciado em *T. gondii.*

Assim, estudos sugerem um papel reduzido para o fator de virulência de genes ortólogos *T. gondii* em *N. caninum*, por exemplo, em relação às proteínas de virulência associados às proteínas ROP18, ROP16 e ROP5. A perda de função de ROP18 em *N. caninum* pode estar relacionada a uma ação adaptativa, impedindo a morte de seu hospedeiro e promovendo a sobrevivência do parasito (REID et al., 2012). Portanto, não se espera que todas as ROPKs de *N. caninum* sejam funcionalmente semelhantes em *T. gondii* e vice-versa. De acordo com um estudo *in silico*, há 68 genes de roptrias presentes tanto em *T. gondii* como *N. caninum,* sendo 61 ortólogos e 7 específicos para cada espécie (REID et al., 2012). A partir de análises do genoma de espécies que pertencem ao filo Apicomplexa foi observado que os genes que codificam as proteínas RON estão conservados na maioria dos parasitos, com exceção da RON8, que é restrita aos coccídios, como *T. gondii* e *N. caninum* (STRAUB et al., 2009).

1.3 Proteínas de roptrias com potencial fator de virulência em células hospedeiras

Em *T. gondii*, as proteínas de roptrias mais bem estudadas são as da família das roptrias (ROPK) que inclui proteínas quinases e pseudoquinases com papel fundamental na virulência (LEI et al., 2014; REESE et al., 2014). O grupo de ROPKs foi caracterizado como "*kinome*", no qual, incialmente foram identificadas 34 proteínas relacionadas a esse conjunto em *T. gongii* (PEIXOTO el al., 2010). No

entanto, Fox e colaboradores (2016) relataram que, apesar do papel da maioria das ROPKs na virulência não ter sido testado diretamente, os autores conseguiram extrair importantes conclusões. A partir de análises de estudos com ROP5, ROP17, ROP18, ROP35 e ROP38, foram encontrados dados com influências cruciais sobre as funções necessárias para estabelecer infecção crônica. Dentre elas, as que apresentam funções na fisiologia do parasito mais conhecidas são as ROP5 e ROP18. Apesar dessas proteínas em sua maior parte possuírem sua função desconhecida, sabe-se que grande parte delas é secretada para o citosol da célula hospedeira durante a invasão, sendo que algumas delas podem se associar com a membrana do vacúolo parasitóforo (EL HAJJ et al., 2006; BRADLEY; SIBLEY, 2007; BOOTHROYD & DUBREMETZ, 2008). Pelo menos 12 membros da família ROP2 compartilham de certo número de características: todos os precursores da família contêm um peptídeo sinal e a maioria deles mantém uma pro região que é clivada durante a maturação (REESE & BOOTHROYD, 2009). Também apresentam um domínio rico em arginina de 100-150 resíduos e um domínio de quinase C-terminal (EL HAJJ et al., 2006; REESE & BOOTHROYD, 2009).

No caso de *N. caninum*, a família ROP2 foi recém descrita e há poucos dados disponíveis (TALEVICH; KANNAN, 2013). NcROP1, NcROP2Fam-1, NcROP4, NcROP5, NcROP9, NcROP30 eNcROP40 foram identificadas por estudos de proteômica (MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011; SOHN et al., 2011; REGIDOR-CERRILLO et al., 2012), sendo que apenas NcROP5 teve a sua função descrita (MA et al., 2017). Ma e colaboradores (2017), analisaram que NcROP5 tem uma baixa patogenicidade e que está intimamente relacionada com TgROP5.Verificaram também que NcROP5 tem uma função associada com virulência do parasito e é bem semelhante nos demais Apicomplexas (GHORBAL et al., 2014; REESE & BOOTHROYD, 2011; WALZER et al., 2013). Atualmente, as proteínas de roptrias presentes em *N. caninum* que foram parcialmente caracterizadas são NcROP2Fam-1 que possui as características dos membros da família ROP2 e aparenta não possuir atividade catalítica (ALAEDDINE et al., 2013) e NcROP40 (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2015), esta última já havia sido descrita como sendo mais abundantemente expressa em isolados virulentos de *N. caninum* (REGIDOR-CERRILLO et al., 2012).

Em vista das observações anteriores, o estudo proposto baseia-se na identificação e caracterização de proteínas de roptrias que são particulares para *N.*

caninum. O trabalho focou sobre duas proteínas de roptrias: NCLIV_031550 e NCLIV_011700. NCLIV_031550 é classificada na categoria -ROPK (proteína de roptria com domínio quinase) e foi denominada ROP55 (TALEVICH; KANNAN, 2013). Do mesmo modo, a outra proteína, NCLIV_011700 (descrita como ROP15B), foi primeiro identificada por Reid e colegas (2012) como um gene único para *N. caninum*, homóloga de ROP2 com domínio de proteína quinase. NCLIV_031550 (ROP55) e NCLIV_011700 (ROP15B) também foram identificadas em duas abordagens proteômicas que o nosso grupo desenvolveu em *N. caninum* (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013). Na fração secretada (ESA), ROP55 e ROP15B representaram as proteínas de roptrias mais prevalentes, aumentando a evidência de que estas são organelas secretoras de proteínas e que possuem uma função relevante em *N. caninum*.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Caracterizar as proteínas roptrias NCLIV_031550 (ROP55) e NCLIV_011700 (ROP15B) em *Neospora caninum.*

2.2 Específicos

1. Clonagem e expressão dos genes NCLIV_031550 (ROP55) e NCLIV_011700 (ROP15B) de forma heteróloga em *E. coli;*
2. Produção e purificação das formas recombinantes de NcROP15B e NcROP55 para produção de respectivos anticorpos policlonais;
3. Localizar as proteínas NcROP15B e NcROP55 nativas através de western blot 1D.
4. Investigar a capacidade de inibição da invasão de *N. caninum* por ensaios com anticorpos policlonais anti- NcROP15B, NcROP55 e sua associação;
5. Localizar NcROP15B e NcROP55 em *N. caninum* por imunofluorescência confocal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo *in vitro* e manutenção de taquizoítos

3.1.1 Cultura de *N. caninum* selvagem

Células Vero foram mantidas em garrafas de 25cm^2 e 75cm^2 a 37ºC com 5% CO_2 em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) com 2 mM glutamina (Gibco®) contendo 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e kanamicina (10 µg/ml) (Gibco®). Os taquizoítos foram cultivados com meio RPMI incompleto nas mesmas condições que as células Vero. Os parasitos foram purificados através de repetidas passagens em agulha 26G1/2, seguida por passagem através de filtro 5-µm.

3.1.2 Cultura de *N. caninum* Lac-Z

A linhagem *N. caninum* Nc-1 que expressa o gene Lac-Z desenvolvida pelo grupo com o plasmídeo Ncdhfr-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z (PEREIRA et al., 2014), foi utilizado para o ensaio de invasão. Esta linhagem é resistente a cloranfenicol e permite ensaios colorimétricos para a detecção de β-galactosidase.

3.2 Análises *in silico* para obter ROP15B e ROP55

As sequências de ROP15B e ROP55 de *N. caninum* foram selecionadas a partir de pesquisas do banco de dados ToxoDB (http://www.toxodb.org) e a busca de BLAST foi realizada nas bases de dados do NCBI e ToxoDB, permitindo a identificação de presença ou ausência de ortólogos e parálogos e da singularidade de ROP15B e NcROP55 em *N. caninum*. Foi realizado também uma busca por peptídeo sinal em SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011) e as sequência analisadas quanto à presença de domínios conservados através da ferramenta Pfam[3] (PUNTA et al., 2012) e INTERPRO (FINN et al, 2017). As predições de identidade e similaridade foram obtidas através do *software* Genedoc (NICHOLAS et al., 1997) e a imagem do alinhamento foi gerada pelo *software* MegAlign (DNASTAR, Lasergene).

3.3 Delineamento dos iniciadores

Os primers para ROP15B e ROP55 foram delineados a partir do software Primer Select (Lasergene, DNA Star). As sequências dos primers se encontram na

tabela 1. Considerando os tamanhos das proteínas, os primers foram delineados para gerar as sequências de dois fragmentos, pois o processo de expressão com as bactérias BL21 é favorável quando se tem uma sequência menor de proteínas. As regiões 5' e 3' das sequências foram amplificadas por PCR a partir de cDNA de *N. caninum* e clonadas no plasmídeo pGEM clonagem - T Easy (Promega).

Tabela 1 - Primers para amplificação da sequência ROP15B Maior e Menor e ROP55 Maior e Menor. A tabela indica o nome (For, forward e Rev, reverso), a sequência 5' – 3 e os sítios de restrição em vermelho.

Nome	Sequência5' - 3'	Sítios
ForROP15Maior	TATGGATCCGAAATGTTCCGTAAGGGCAAGCA	BamHI
RevROP15Maior	TATAAGCTTCGGTACAACTGATCCTCCAACTTC	HindIII
ForROP15Menor	AAAGGATCCCGCAGTGCGACGATGAAAGACA	BamHI
RevROP15Menor	TTTAAGCTTAACCAGTCGTCATGCCCTTCT	HindIII
ForROP55Maior	TTTGAATTCTGGGTGACTGATCTGGGGTCC	EcoRI
RevROP55Maior	TTTGCGGCCGCTGTTCATTCTTCAGTCGTAGTGCC	NotI
ForROP55Menor	TTTGAATTCCCGCTTCTTGGTCCGAGTCTATCA	EcoRI
RevROP55Menor	TAAGCGGCCGCAGATTCCCAGAGCAAGACACATTT	NotI

Dessa forma, para NcROP15B foram delineados primers para se obter um fragmento de 534 pares de bases denominado de NcROP15B Maior e outro de 178 pares de bases denominado NcROP15B Menor. No caso da NcROP55, a divisão foi NcROP55 Maior de 1241 pares de bases e NcROP55 Menor de 233 pares de bases (Figura 6).

As regiões 5' e 3' das sequências foram amplificadas por PCR a partir de cDNA de *N. caninum* e clonadas no plasmídeo pGEM clonagem - T Easy (Promega).

Figura 6. Posição dos fragmentos menor e maior de NcROP15 e NcROP55 en relação as respectivas sequências completas. 1) NcROP15; 2) NcROP55. Os fragmentos maior e menor estão marcados nas sequencias genômica e proteica de amarelo e verde respectivamente. A) Sequência codificadora; B) sequência proteica.

1) NcROP15B (NcLIV_011700)

A) Sequência codificadora

ATGTTTATATTTAACCTCTGTGGTCACAGACAGGCGTTGTGCCTCTGGTGTATGATGTGCGTGACCAGGTGCTCTCGATCAGG
GAAGGCGATAGCAGTGCGCCAGCTCTTGGGGTACGTTGACACGATGACCCGCGTTCCCGTACGCAGGCCGTTATGTTCCATC
TCAGCAACTGATACACTCGAGGCAGAACTCCCGCCAGGCGGCTTCGTCGACCTCTCTGCGATAAAGGACTCTGAAAAGAAGG
AAATGTTCCGTAAGGGCAAGCAAGCATGCCTGGCGGTGCCTCGCAGTGCGACGATGAAAGACATTAAGGAACAGATAAAAT
TTGTGCTGGAAAACCAGCAACAGAAATTGAGTCTGTTCAAAGACGGTGCACACCTAAAGGATAAACACACATTTGAGGACGA
CGCCTTTTTTCCGCAAATAAAAGGTGTCATTCGCCAGAAGGGCATGACGACTGGTTCGGCTTTCGCCACGGCGCATCCGGTGA
CCAAAGATGACGTCATTGCGACTATCCTAGTGCGATGTCCGACACGCCTCACAAGGGTGGAGATCACAGATGGCATTTCGAT
CTTGATACAGGGGATCTCAAACGAGTATGTAGTCGAACGCCAACTCGACACAGCTATGCCGCACTTTTGGAAGAAGGGAGAG
CAATCTTCAGAACTTGTCCTCTTCATCGACAGAGAGTGGTGTGGGGCTGCTATTGATGCTCTGTTAAAATTCCACACAAAGAT
CAGCGAACCCAACTTAGAAGTTGGAGGATCAGTTGTACCGAAAGACGGATTCCTGGATGACCGGGACACTTATCCAACGGCG
CTAATTGACGCTAGACTTAAGGTTTGTCTGGGTTTCCTCAGCGCCTCTAAGCTGTTGAAGGACGAGCAGGACAATGTACTCCA
TTCCGCCAACTTCTTCCCTATCCCGAAACCCTCGATTTCTTTCTAA

B) Sequência peptídica

MFIFNLCGHRQALCLWCMMCVTRCSRSGKAIAVRQLLGYVDTMTRVPVRRPLCSISATDTLEAELPPGGFVDLSAIKDSEKKEMFR
KGKQACLAVPRSATMKDIKEQIKFVLENQQQKLSLFKDGAHLKDKHTFEDDAFFPQIKGVIRQKGMTTGSAFATAHPVTKDDVIAT
ILVRCPTRLTRVEITDGISILIQGISNEYVVERQLDTAMPHFWKKGEQSSELVLFIDREWCGAAIDALLKFHTKISEPNLEVGGSVVPKD
GFLDDRDTYPTALIDARLKVCLGFLSASKLLKDEQDNVLHSANFFPIPKPSISF

2) NcROP55 (NcLIV_031550)

A) Sequência codificadora

ATGGGCCCTTGGGTGACTGATCTGGGGTCCCCAGTTAAACGGTCGGAGCTCACAGAGGGGCAGGAGGATATGCGCAAATT
GACAGCGACAGTCGTTTCTGGAGAGATGGAGAAAAACAGAAAACAATATCTGCGTGAGGAGTACGCGCTGGAAAACCTGT
ATTTTGACGGCTTTCTTTCTGATGAGGATCTCCGAGAAAAGACGAACGATGTTGAAGTTGCATTTCGGAACGCGTTTCCG
AGTGGTTCCGTGTACAACGCTGTCGATAATGAGGGCAAAAGGACAAGACTCGGCTTAGGCAAGATTCTTGGTTCGGGAGG
GACAGCAGTAGTGTGCATTGTGCAAGACATGCAAAACTTGGCTATGGCCCGCAACTACGCAGGCAAATTCTTCGTATTAT
CTCTGGACTCCACCGCCCCACAGGATATGGAACAGCGCGAAAACAAACTAGATGTAACTTGGCGAATGCACCAAGCGTCC
AACGAGCGGTTATTAAATCAAGCGTCAATCGACGAGCTTCTCACTAATGGAATTGCGGTCAGCCAACATGACTACACGCT
CGAGTCGACGCACCCGCAAAGGGAAAAACTCCCTGACGTGATCGTCGGTAAAGTCGGAGGTAAATCACGGAAGCGACTGC
TGATAAAACCCCATGTGTCACTAATGCCGCTTCTTGGTCCGAGTCTATCAGATTTCTGGTCGAAAGCCTTCACCGACAATGCTC
TGAAATATTTGGTTTTCAACCTGGTCACCACTGTTAGCTACCTCGAGCGTATCAACCTGGTACACAGAGACCTAAAACCGGCT
AACTTCGCTGTTGATTCGAATGGAAGAGTTTTCATGATCGATCTGGCCTTCGTAGCCAATATAGGTGAAAATGTGTCTTGCTCT
GGGAATCTGACGCTACACTATGTTGACCCGATTAGAGCAAAGTGTGGCGCCAACGGTGGCCGGGGGGCGAAGGCCTCCAGT
TTGATGGACAGTTGGTCTTTGGGCGCCACAATATTCAGTATTATATGCAATGGAAAGAAACCGTTCAAATTTAGAACACCGAG
AGGCAGGGGAGACAAGGGTGAAAATACTCGAGCTTACTACGAAGAGTTCCTCAAGAAGCTGAAGAGGGAGAATTTCGCTG
GAGGAAGATGCGATTTCATGACGCCGGAACGTCGAAAGCTTCTTGATATTGTCAAGCTCCTCCTTGACCCGCAAGAAGAAAC
AAGGTGGACGGCACTACGACTGAAGAATGAACATCCATTCTTTCAAGTGGAGGAGGACTGA

B) Sequência peptídica

MGPWVTDLGSPVKRSELTEGQEDMRKLTATVVSGEMEKNRKQYLREEYALENLYFDGFLSDEDLREKTNDVEVAFRNAFPSGSVY
NAVDNEGKRTRLGLGKILGSGGTAVVCIVQDMQNLAMARNYAGKFFVLSLDSTAPQDMEQRENKLDVTWRMHQASNERLLNQ
ASIDELLTNGIAVSQHDYTLESTHPQREKLPDVIVGKVGGKSRKRLLIKPHVSLMPLLGPSLSDFWSKAFTDNALKYLVFNLVTTVSYL
ERINLVHRDLKPANFAVDSNGRVFMIDLAFVANIGENVSCSGNLTLHYVDPIRAKCGANGGRGAKASSLMDSWSLGATIFSIICNG
KKPFKFRTPRGRGDKGENTRAYYEEFLKKLKRENFAGGRCDFMTPERRKLLDIVKLLLDPQEETRWTALRLKNEHPFFQVEED

TTTTTTTT – Fragmentos genômicos e proteicos maiores

AAAAAA – Fragmentos genômicos e proteicos menores

3.4 Extração de RNA e obtenção de cDNA de *N. caninum*

O RNA foi isolado a partir dos taquizoitos de *N. caninum* por extração com TM Trizol (Gibco-BRL), tratado com DNase I (New Englands) e purificado por passagem através de membrana de sílica (colunas RNeasy, Qiagen). O cDNA foi sintetizado a partir de RNA, com transcriptase reversa GoScript™ (Promega). Para tal, a reação foi iniciada com a adição de 2 pmol/µl do primer de *primers forward*, 1 µg de RNA e água livre de nuclease em um volume total de 5 µl. Essa solução foi incubada em banho seco por 5 minutos a 70°C e resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados à solução de RNA e primer uma mistura contendo 4 µl do tampão de reação GoScript™ (Promega) 5x, 1 µl de inibidor de ribonuclease recombinante RNasin® (Promega), 1µl de transcriptase reversa GoScript™ (Promega) e água livre de nuclease em um volume total de 15 µl. Todo o conteúdo foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos para o anelamento, seguido de extensão a 42°C por uma hora. Terminada a extensão, a solução foi incubada por 15 minutos a 70°C para inativação da enzima transcriptase reversa.

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para realização da PCR foi utilizado o kit FastStart™ High Fidelity PCR System (Roche). Para a reação foram utilizados:5 µl tampão de Taq (20mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,2 mM de dNTP mix; 1,5 mM de MgCl (Invitrogen), 50 pmol de cada primer e 2,5 U (0,3 µl) da enzima Taq polimerase; 2µl do material cDNA de *N. caninum* e água ultrapura para 50 µl (amplificação para purificação). As reações foram realizadas em termociclador (MasterCycler, Eppendorf) utilizando o método do tipo *touchdown*, com três turnos com temperatura de anelamento diminuindo gradualmente do primeiro até o terceiro turno. Os dois primeiros turnos foram semelhantes, iniciando-se com um ciclo a 95ºC por 2 minutos, e em seguida dois primeiros turnos apresentando cinco ciclos cada, sendo cada ciclo composto de três fases: desnaturação de 30 segundos a 95°C, seguido de 30 segundos de anelamento (60° no primeiro turno e 55°C no segundo) e, por fim, 2 minutos a 72°C para extensão. O terceiro turno apresentou 25 ciclos compostos de desnaturação e extensão iguais aos ciclos anteriores e anelamento de 50°C por 30 segundos. Uma extensão final foi adicionada após a finalização dos 36 ciclos, a 72ºC por 10 minutos

e reduzida a temperatura até 4ºC para retirada das amostras. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0,8%, excisado do gel e purificado.

3.6 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose 0,8% foram preparadas com tampão TAE (0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA, pH8,3) e adicionado de 0,34 µg/ml de brometo de etídeo (solução de 10 mg/ml, da Promega). As corridas foram realizadas em uma cuba Easy Cast Mini (Owl Scientific) contendo tampão TAE sob uma voltagem constante de 100 V e amperagem livre. As amostras foram previamente diluídas em Tampão de Corrida (6 x Orange DNA Loading Dye, Fermentas) e foram utilizados 6 µl dos marcadores moleculares GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ou GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ambos da Fermentas.

3.6.1 Purificação em gel de agarose

O kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE-Healthcare) foi utilizado para a extração e purificação dos fragmentos de DNA a partir de géis de agarose. Primeiramente, as bandas de interesse, visualizadas através da luz UV após a corrida em gel de agarose, foram recortadas do gel com utilização de um bisturi e transferidas para um tubo de 2 ml. Cada banda recortada foi incubada com o tampão de captura do kit (600 µl) a uma temperatura de 50°C por 10-15 minutos, até a agarose ser completamente dissolvida e o tampão adquirir uma coloração amarela. Posteriormente, 1 ml da solução foi transferida à microcoluna GFX MicroSpin acoplada a um tubo coletor, centrifugada a 10.000 x *g* por 1 minuto a 4°C, para que o fragmento de DNA se ligasse à matriz de sílica da microcoluna. A solução eluída foi descartada e 450 µl do tampão de lavagem foram adicionados à microcoluna, que foi centrifugada sob as mesmas condições anteriores. Esse procedimento foi realizado duas vezes e depois, o conteúdo eluído foi descartado e a coluna foi submetida a uma centrifugação de 2 minutos a 10.000 x *g* a 4°C para remoção completa do tampão de lavagem. Em seguida, o tubo acoplado à microcoluna foi descartado e substituído por um tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 35 µl de água ultrapura à microcoluna e depois a mesma, foi centrifugada a 10.000 x

g por 1 minuto a 4°C para eluição das amostras que foram armazenadas no freezer a - 20°C.

3.7 Preparação de células eletrocompetentes

Uma colônia de células *Escherichia coli* TOP 10 ou BL21 (DE3) foi utilizada para preparação das células eletrocompetentes. Primeiramente, essa colônia foi plaqueada em meio LB Agar, repicada e incubada por 18 horas a 37°C em um Erlenmeyer com 50 mL de meio LB. Depois de 18 horas, 5 ml do caldo foram inoculados em 500 ml LB e incubados a 37°C sob agitação (250 rpm – em Incubadora de Bancada Refrigerada CT-712 R, da Cientec) e calculada a densidade ótica (OD) a 600 nm até atingir de 0,5 a 0,8 (medida realizada no equipamento Genequant, GE Healthscience). Posteriormente, todo o meio foi incubado 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. O procedimento anteriormente descrito foi realizado duas vezes, e o pellet resultante foi homogeneizado em 20 ml de glicerol 10% esterilizado, centrifugado (3000 x *g*, 15 minutos, 4°C) e o pellet adquirido foi novamente ressuspenso em glicerol 10%, porém em 1 ml. Para verificar se as células eletrocompetentes atingiram a concentração mínima para transformação, foi pipetado 7,5 µl do conteúdo final e diluído em 750 µl de água ultrapura e tiveram sua OD medida a 600 nm. A quantidade de células é considerada ideal quando a OD é maior que 0,5, o que corresponde a 1 x 10^8 UFC.

3.8 Ligação em vetor de clonagem e transformação de células eletrocompetentes

Fragmentos de DNA, oriundos do produto de PCR e purificados, foram ligados a plasmídeos de clonagem (pGEM), utilizando o kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega). A reação foi realizada com a adição de 3 µl do produto da PCR a 5µl do tampão de ligação 2x, 1 µl (50 ng) do vetor pGEM® - TEasy, 1 µl (3 unidades Weiss) de T4 DNA ligase e incubação a 4°C por 18 horas, e depois utilizada para a transformação de células eletrocompetentes TOP10.

Para a multiplicação e seleção de plasmídeos, cepas de *E.coli* eletrocompetentes TOP10 foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo previamente ligado ao fragmento de interesse. A 50 µl de células eletrocompetentes, descongeladas e mantidas em gelo, foram adicionados 0,9 µl da ligação e após ser cuidadosamente misturado, foi transferido à cubetas de 2 mm para o choque utilizando o eletroporador GenePulser Xcell (Bio-Rad) nas seguintes condições: PC= 200Ω, V= 2,5kV voltagem 2,5kV; C= 25 µF do meio de cultura SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$ e 20mM de glucose) e todo o material recuperado da cubeta foi incubado a 37ºC por 1 hora, sob agitação (350 rpm). Após a incubação todo o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB ágar com ampicilina, e incubado a 37ºC por 18 horas.

3.9 Purificação de plasmídeos selecionados (miniprep)

As colônias transformadas e selecionadas após o plaqueamento foram separadamente inoculadas em 5 mL de meio LB contendo antibiótico ampicilina (50 µg/ml) e incubadas a 37ºC sob agitação a 200 rpm por 18 horas. Uma parcela da cultura (800 µl) foi adicionada a 400 µl de glicerol (60%) e armazenada a -80ºC e o restante para a purificação dos plasmídeos. O kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) foi utilizado para o isolamento dos plasmídeos, seguindo-se as recomendações dos fabricantes. As colunas foram descartadas e o material eluído. Todo o volume da digestão foi verificado em gel de agarose 0,8%, que teve a banda do tamanho esperado recortada, purificada e submetida à nova eletroforese para análise. Após verificação do gel, a sequência foi utilizada na reação de ligação com o plasmídeo de expressão pET já preparado.

3.10 Clonagem do vetor de expressão e ensaios de expressão heterólogos

Para a expressão, células *E. coli* eletrocompetentes da cepa BL21 (DE3) (item 3.7) foram transformadas com o plasmídeo pGEM recombinante contendo os fragmentos com NcROP15B Maior, NcROP15B Menor, NcROP55 Maior ou NcROP55 Menor. Os plasmídeos dos genes NcROP15B Maior e Menor foram clivados com as enzimas *BamHI* e *HindIII* e os dos genes NcROP55 Maior e Menor

com *EcoRI* e *NotI* e em seguida purificados conforme item 3.9. Posteriormente, foram ligados nos plasmídeos de expressão pET28 nas mesmas condições que a etapa de ligação ao pGEM-T-easy (item 3.8), porém diferindo no tempo de incubação e antibiótico que nesse caso foi kanamicina (50 µg/ml). As proteínas NcROP55 Maior e Menor ficaram no banho-maria por um período de 1 hora a 22ºC e as proteínas NcROP15B Maior e Menor incubadas à 15ºC por 18 horas.

3.11 Teste de solubilidade

Para expressão das proteínas recombinantes, a cepa *E. coli* BL21 foi transformada com pET28 e as culturas incubadas com 0,75 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG) por 3 horas, acompanhadas pelo controle sem IPTG (não-induzido). Para o teste de solubilidade, a extração das frações solúvel e insolúvel foi feita com a extração sequencial nos seguintes tampões: Tris-HCl (pH 7,5), Tris-Triton (Tris-HCl; 5% Triton X-100) e Ureia 2 M, 4 M e 8 M (NaH2PO4 100 mM; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0). Inicialmente, o pellet coletado após a indução da expressão foi ressuspenso em 700 µl de tampão Tris-HCl e sonicado (intensidade 7 em Sonic Dismembrator model 100, Fischer Scientific). O tubo foi centrifugado (10.000 x *g*/ 5 minutos/ 4°C) e o sobrenadante armazenado em outro tubo de 1,5 ml. Sobre o pellet resultante foram adicionados 700 µl 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 2 M e o mesmo processo com 4M e 8 M. Os sobrenadantes referentes às extrações com os cinco tampões foram analisados (10 µl de cada amostra) em eletroforese em gel de acrilamida 12,5% e 15%, conforme item 3.6.

3.12 Purificação das proteínas recombinantes em resina de níquel

A purificação das proteínas recombinantes em coluna de níquel foi realizada por meio do método de cromatografia por afinidade. Dessa maneira, foi utilizada uma resina ligada a átomos de níquel carregados positivamente (Ni2+), os quais têm a capacidade de se associarem à cauda de histidina ligada aos fragmentos recombinantes em pH alcalino. Isso favorece a purificação por meio da diminuição

de pH. 0,5 a 1,0 ml de resina (Ni Sepharose da GE Healthscience). Em seguida, foram empacotados em colunas vazias para cromatografia por gravidade (Empty Disposable PD-10 Columns, GE) e lavados com 20 ml de tampão ureia 8M pH 8,0 com 20 mM de imidazol e 50 ml de tampão ureia 8M pH 6,3 com 100 mM de imidazol. Por fim, a amostra foi eluída em alíquotas de 1 ml com tampão ureia 8M pH 4,5 com 250 mM de imidazol. Cada fração (20 µl) foi adicionada a 200 µl da solução de Bradford 1:5 (Coomassie blue G-250, *BioAgency*). As frações que apresentaram coloração azul foram analisadas por em gel de acrilamida 12,5% ou 15%, retirado o imidazol e quantificadas.

3.13 Anticorpos policlonais anti-His-ROP15B ou anti-His-NcROP55

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA-FCFRP, número do processo 16.1.477.60.6, ANEXO I).

Camundongos de 6 a 8 semanas de idade Balb C machos foram imunizados com extrato total de células Vero (como controle negativo) e com as proteínas recombinantes ROP15B Maior e Menor e ROP55 Menor (conforme Tabela 2). Para obter o extrato de células Vero, primeiramente, ocorreu a raspagem das células Vero, cultivadas em garrafas de 25cm^2 e 75cm^2, e depois a centrifugação (2700 *g* x por 3 minutos); lavagem com PBS 1x e sonicação com tampão de Ureia 8M. Os grupos imunizados com a proteína recombinante NcROP15B ou NcROP55 (maior ou menor) serão especificados em resultados. A imunização ocorreu por via subcutânea com 100 µg da proteína recombinante, célula Vero ou PBS e o mesmo volume de adjuvante completo ou incompleto de Freund, formando um volume total de 100-200 µL por camundongo. A primeira imunização ocorreu na semana 0 com adjuvante completo de Freund. Outras duas imunizações foram realizadas nas semanas 2 e 4 com adjuvante incompleto de Freund. Na semana 6, os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal e punção cardíaca foi feita para recolher o soro hiperimune ocasionando a morte dos animais por hipovolemia.

Tabela 2 – Descrição dos grupos experimentais utilizados para obtenção de soro policlonal. Foram utilizados 15 animais (camundongos machos Balb/c, 3 animais por grupo) e divididos em cinco grupos: controle negativo, proteína recombinante NcROP15B Menor, proteína recombinante NcROP15B Maior, proteína recombinante NcROP55 Menor e extrato total de células Vero. No dia 0 = animais imunizados por via subcutânea com adjuvante Completo de Freund (ACF) conforme a segunda coluna. Na 2ª e 4ª semana ocorreram o primeiro e o segundo reforço em adjuvante incompleto de Freund (AIF). E na 6ª semana os animais foram anestesiados por via intraperitoneal e punção cardíaca foi feita para coleta do soro.

Dias das Imunizações	**Dia 0**	**2ª semana**	**4ª semana**	**6ª semana**
Grupos (n=3)	**Imunização em ACF**	**1° reforço em AIF**	**2° reforço em AIF**	Coleta de sangue e Eutanásia
Controle negativo	**ACF**	**+**	**+**	**+**
Proteína recombinante (NcROP55/Menor)	**NcROP55 em ACF**	**+**	**+**	**+**
Proteína recombinante (NcROP15B/Maior)	**NcROP15B em ACF**	**+**	**+**	**+**
Proteína recombinante (NcROP15B/Menor)	**NcROP15B em ACF**	**+**	**+**	**+**
Extrato Total de *Célula Vero*	***Vero* em ACF**	**+**	**+**	**+**

3.14 Eletroforese em gel de acrilamida

3.14.1 SDS-PAGE1D

Para eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 1D), as amostras proteicas foram diluídas em tampão de amostra 4 x (62,5 mM 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e os géis de poliacrilamida de 10, 12, 12,5 ou 15% foram submetidos uma diferença de potencial (voltagem de 120 V [um gel] ou 150 V [dois géis]) em tampão Tris-HCl-Glicina (*Tris* 25 mM; *Glicina* 192 mM; *SDS* 0.1%) para SDS-PAGE. Como marcadores moleculares foram utilizados o *PageRuler Unstained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*) ou *Protein MW Marker* (*Thermo Scientific*) e, para o gel a ser utilizado em *western blot*, os pré-corados *Spectra Multicolor Protein Ladder* (*Thermo Scientific*). As amostras foram submetidas à eletroforese até que o marcador azul do tampão de amostra atingisse a região posterior final do gel. Os géis foram corados com Coomassie G-250, após fixação em tampão de fixação ou Coomassie R-250 seguido de descoloração em tampão de descoloração. As imagens foram obtidas por *Image Scanner* (*Amersham Biosciences*).

3.15 Western blot

Extrato proteico total de *N. caninum* e as proteínas recombinantes, em gel de SDS-PAGE -1D, foram transferidas para membrana para realização de Western blot com os anticorpos policlonais obtidos. Os géis com as amostras foram transferidos para uma membrana PVDF (ImmobilonTM-P, Millipore) pelo sistema semi-seco (TE 77 PWR, GE Healthcare) em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375%, metanol 20%) com 0,81 mA/cm2 por 1 hora e 15 minutos. As membranas foram bloqueadas com gelatina suína 0,8% (Sigma-Aldrich) diluída em PBS com Tween 20 0,05% (PBST) por 1 h a 37°C. Os anticorpos anti-NcROP15B Menor e NcROP55 Menor foram diluídos em PBST com gelatina suína 0,2% e incubados com a membrana por 18 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST, a membrana foi incubada com anticorpo anti-camundongo conjugado a peroxidase (ZyMed-Invitrogen) por 1 h à 37°C e então lavada três vezes com PBST. O sinal da reação pela peroxidase será obtido pela incubação com substrato quimio-luminescente para detecção de peroxidase (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). As membranas foram expostas a filmes em um período de 2 minutos, revelados e capturados pelo Image Scanner (GE Healthcare).

3.16 Imunofluorescência

Para imunofluorescência, taquizoítos de *N. caninum* foram purificados e inoculados em lâminas revestidas com poli-lisina e demarcadas com poços de aproximadamente 4 mm com caneta hidrofóbica (PAP *pen*, Sigma-Aldrich). Os taquizoítos foram fixados com formaldeído (Sigma-Aldrich) 3,65% diluído em PBS por uma hora em temperatura ambiente. Subsequentemente, foram lavados em PBS 1x, depois incubados com anticorpos primários (anti-NcROP15B e anti-NcROP15B) durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os taquizoítos foram novamente lavados em PBS e depois incubados com anticorpo anti-camundongo conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes®) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Os núcleos foram evidenciados com iodeto de propídeo (0,5 µM) (Santa Cruz Biotechnology®) por 10 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, foram

acrescentadas gotas de glicerol 60% em PBS e as lâminas foram montadas com lamínula de 24 x 60mm e seladas com esmalte para evitar a desidratação. Todas as observações foram realizadas em um microscópio Leica SP8 confocal (Leica Microsystems) localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente, utilizado uma objetiva de 63X com imersão a óleo. 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.

3.17 Ensaio de invasão

Inicialmente, os taquizoítos de *Neospora caninum* foram purificados através do método de filtragem. Em seguida, os taquizoítos purificados (3 x 10^6) foram incubados em 2 ml de RPMI 2% BSA com os soros anti-NcROP15B ou anti-NcROP55 diluídos 1:50 por 30 minutos. Como controle, o mesmo número de taquizoítos foram incubados com o soro pré-imune (obtido antes das imunizações com NcROP15B e NcROP55) sob as mesmas condições. Após a incubação foram adicionados 500 µl (1 x 10^6 do parasito) por poço (triplicata) em uma placa de 24 poços contendo células Vero e incubados por 2 horas, sempre em triplicata.

Após incubação a 37ºC (5% de CO_2), os poços foram lavados três vezes com 500 µl de PBS e seus conteúdos lisados com 300 µl de tampão lise (NaOH 200 mM e SDS 1%) por 1 hora a 50°C. Os lisados foram centrifugados por 10 min a 10.000*g* e 50 µl destes, em duplicata, foram incubados com CPRG (Clorofenolred-β-D-galactopinoside) (PEREIRA et al., 2014) por 18 horas e a atividade de β-galactosidase foi proporcional à formação da cor vermelha, avaliada em um leitor de ELISA (Sunrise Tecan) a 570 nm. A percentagem de inibição da invasão foi calculada em relação ao controle incubado com soro pré-imune (PEREIRA et al., 2011).

4.18 Análises estatísticas

As análises estatísticas do ensaio de invasão foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad, USA) com análise de variância ANOVA. A comparação do reconhecimento das proteínas recombinantes com e sem

NcROP15B ou NcROP55 pelos respectivos soros assim como a comparação da invasão das células Vero previamente incubadas com as proteínas recombinantes com e ou sem NcROP15B ou NcROP55 pelos taquizoítos NcLacZ foram realizadas aplicando o teste de Bonferroni, considerando diferença significativa menor que 0.05.

4. RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* das proteínas em *Neospora caninum*

4.1.1 Busca pelos genes que codificam ROP15B e ROP55 em *N. caninum*

A partir dos resultados proteômicos publicados por nosso grupo (POLLO-OLIVEIRA et al, 2013) as duas proteínas de roptrias escolhidas para este trabalho foram analisadas primeiramente *in silico.* Foi utilizado o ToxoDB, um banco de dados genômico com anotações funcionais para *Toxoplasma gondii* e diversos outros coccídeos, como *N. caninum, Cyclospora cayetanensis, Eimeria* spp*, Hammondia hammondi, Sarcocystis neurona.* (GAJRIA et al., 2008). Os genes NcROP15B e NcROP55 de *N. caninum* possuem as identificações NCLIV_011700 e NCLIV_031550, (tabela 3), sendo que NcROP15B está localizado no cromossomo IV e NcROP55 no cromossomo VIII, e ambos e não possuem nenhuma anotação mais específica, apenas a identificação (ToxoDB 38, *N. caninum* linhagem Liverpool, versão: 2015-02-27, acesso realizado em 27/07/18).

Tabela 3 – Informações dos genes NcROP15B e NcROP55 de *N. caninum* no banco de dados ToxoDB.

Gene	Identificação (ToxoDB)	Cromossomo	Localização
NcROP15B	NCLIV_011700	IV	1774397 - 1776583
NcROP55	NCLIV_031550	VIII	1207198 - 1208475

4.1.2 Análise *in silico* das sequências de NcROP15B e NcROP55

As sequências proteicas de NcROP15B e NcROP55 selecionadas foram alinhadas com proteínas homólogas de alguns microrganismos, incluindo apicomplexas, com maiores índices de similaridade ao BLAST (Figuras 7 e 8). A

proteína NcROP15B possui identidade de 19% com as sequencias de ROP15 de *T. gondii* e *Hammondia hammondi* (Tabela 4). Esse percentual ficou bem abaixo do 77% de identidade entre as ROP15 de *T. gondii* com *Hammondia hammondi*, denotando uma característica bastante única dessa proteína em relação a todos os Apicomplexas, já que ao BLAST do ToxoDB não foram detectadas outras sequências com identidade significante. Já no BLAST do NCBI foram encontradas duas sequências de bactérias (*Streptomyces sp* e *Paracoccus*), porém com identidade bem baixa (Tabela 4) e com poucos aminoácidos conservados (Figura 7). A sequência NcROP15B tem predição para peptídeo sinal, com clivagem entre os aminoácidos TRC-SR, posição 24 e 25 (Figura 7, seta). Na busca por domínios, no site PFAM a sequência de NcROP15B não gerou nenhum hit significativo, porém no INTERPRO um domínio relacionado com Ubiquitinina foi detectado (IPR029071), na posição 86 a 136. Este domínio pertence a uma família maior denominada Phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic Subunit (CATH Superfamily 3.10.20.90), indicando o potencial para NcROP15B ser uma quinase, característica de proteínas de roptrias.

Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína NcROP15B com proteínas presentes em apicomplexas e outros microrganismos. Sequências**,** alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW, pela ordem são: NcROP15B de *Neospora caninum* (ToxoDB: NcLiv_011700), ROP15 de *Toxoplasma gondii* (ROP15_Tg: AAZ38161), ROP15 de *Hammondia hammondi* (ROP15_Hammondia: XP_008885321.1), proteína hipotética SAMN05428944_0442 de *Streptomyces sp* (Streptomyces: SEB58668) e Proteína da família aspartato aminotransferase de *Paracoccus solventivorans* (Paracoccus: WP_073060123). Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos destacados em cinza representam similaridade. Seta indica local de clivagem de peptídeo sinal predito para NcROP15B.

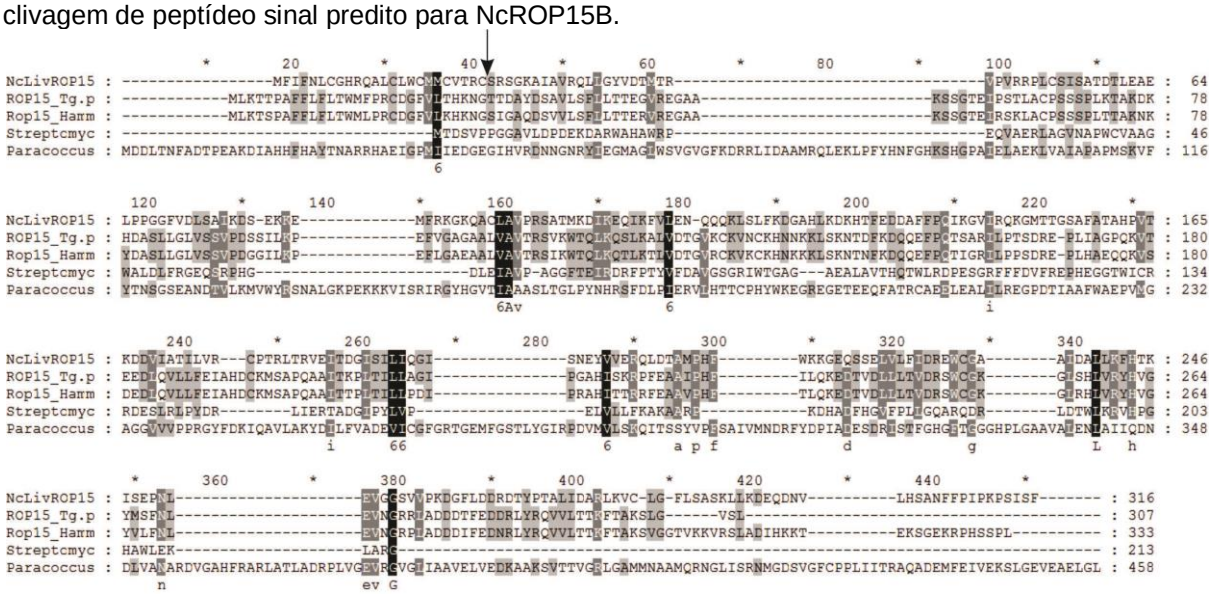


Tabela 4. **Valores de identidade/similaridade (%) de NcROP15B com sequências de *Toxoplasma gondii* (TgROP15), *Hammondia hammondi* (HhROP15), *Streptomyces sp* e *Paracoccus solventivorans*.** Valores obtidos a partir de alinhamento por ClustalW das sequências: NcROP15B de *Neospora caninum*, ROP15 de *Toxoplasma gondii,* ROP15 de *Hammondia hammondi*, proteína hipotética SAMN05428944_0442 de *Streptomyces sp* e Proteína da família aspartato aminotransferase de *Paracoccus solventivorans*. Com grifo, identidade/similaridade entre NcROP15B e as outras quatro sequências.

Identidade/ similaridade (%)	**TgROP15**	**HhROP15**	***Streptomyces* sp**	***Paracoccus solventivorans***
NcROP15B	19/36	19/38	07/17	08/20
TgROP15	-	77/82	08/18	08/18
HhROP15	-	-	08/17	07/20
***Streptomyces* sp**	-	-	-	03/10

Já a proteína NcROP55 possui identidade de 14% com a sequência de ROP37 de *T. gondii* e ROP28 de *Hammondia hammondi*, apresentando o maior valor de identidade (15%) com a ROP28 de *Neospora caninum* (Tabela 5). Esse percentual bem abaixo de identidade de ROP55 com as outras proteínas pode demonstrar uma característica bastante única dessa proteína em relação a todos os Apicomplexas, pois tanto no BLAST do ToxoDB quanto ao BLAST do NCBI, não foram detectadas outras sequências com identidade significante. Na busca pela plataforma SignalP 4.1, a sequência NcROP55 não apresenta predição para peptídeo sinal. Já na procura por domínios, o programa PFAM detectou um domínio pertencente à Família Quinase (CL0016), na posição 214 a 420, conforme indicado no alinhamento. Esse domínio pertence à superfamília de proteínas quinases, que inclui as Serinas/Treonina e está relacionado às quinases que atuam sobre substratos não proteicos (Figura 8) (HANKS; HUNTER, 1995).

Figura 8. **Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína NcROP55 com sequencias similares de outras proteínas de roptrias de apicomplexas.** Sequências**,** alinhadas utilizando o algorítmo ClustalW, pela ordem são: NcROP55 de *Neospora caninum* (ToxoDB: NcLiv_031550), ROP37 de *Toxoplasma gondii* (ROP37_Tg, acesso: XP_018638585.1), ROP28 de *Hammondia hammondi* (ROP28_Hammondia, acesso: XP_008883173.1), ROP28 de *Neospora caninum* (ROP28_Nc, acesso: CEL67008.1) e ROP30 de *Eimeria necatrix* (ROP30_En, acesso: XP_013432728). Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos destacados em cinza representam similaridade. O domínio na posição 214 a 420, conforme o programa PFAM, está indicado pela barra de cor preta na parte superior do alinhamento.

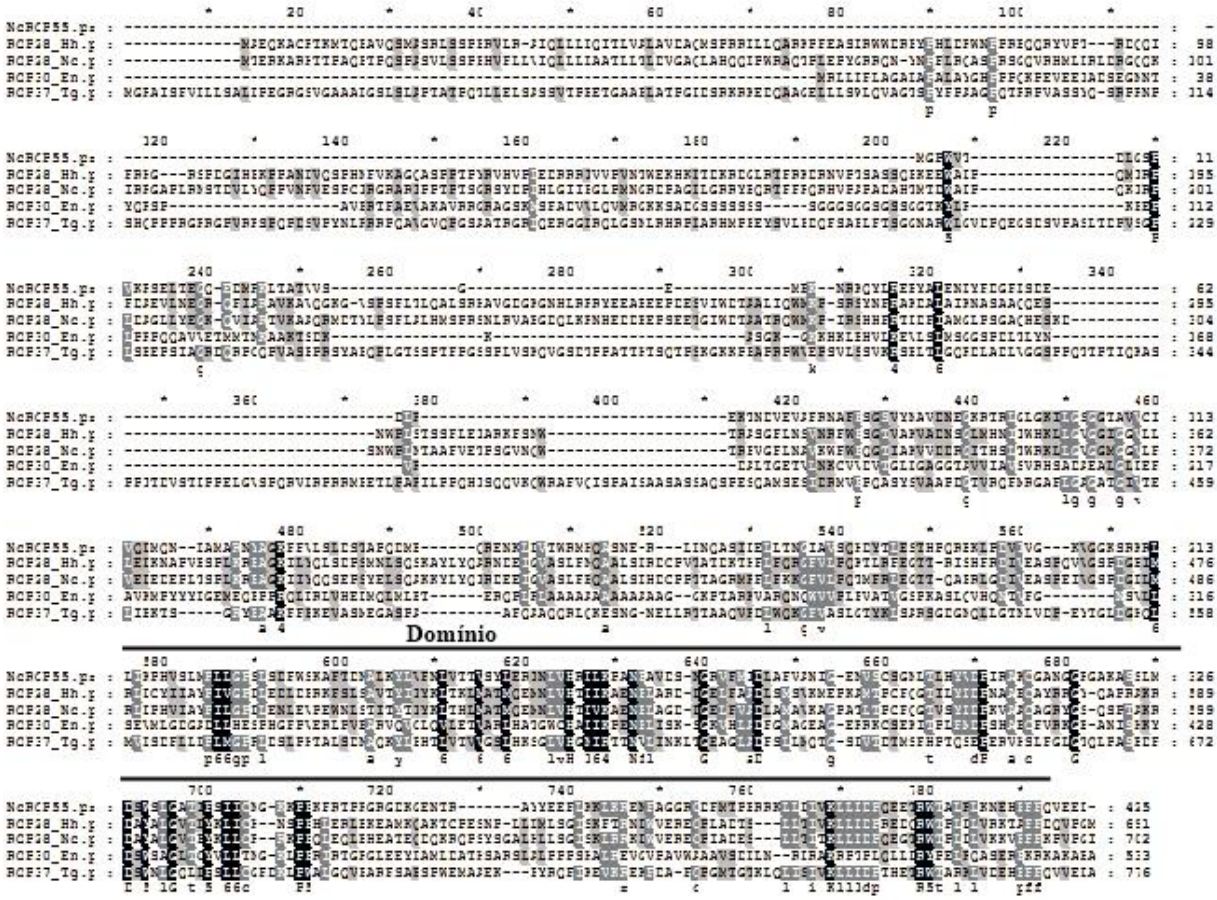


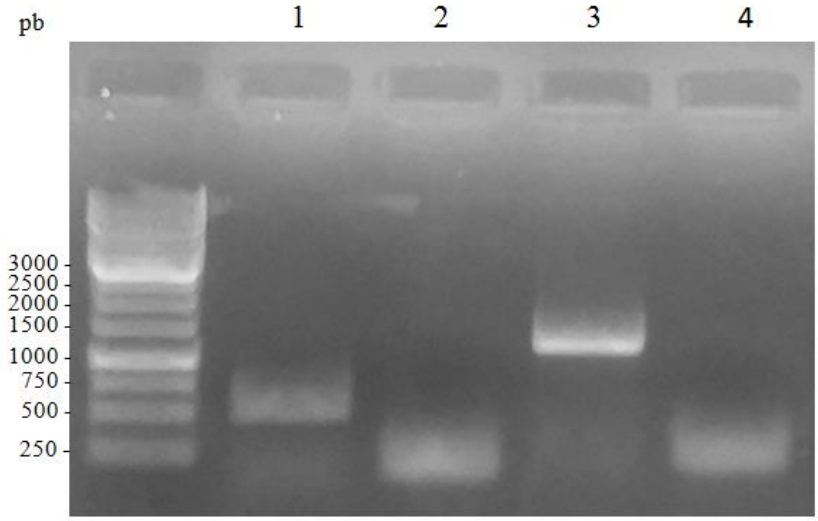
Tabela 5**. Valores de identidade/similaridade (%) de NcROP55 com sequências de *Toxoplasma gondii* (TgROP37)*, Hammondia hammondi* (HhROP28), *Eimeria necatrix* (EnROP30) e *Neospora caninum* (NcROP28*).*** Valores obtidos a partir de alinhamento por ClustalW das sequências: NcROP15B de *Neospora caninum*, ROP37 de *Toxoplasma gondii,* ROP28 de *Hammondia hammondi*, ROP30 de *Eimeria necatrix* e ROP28 de *Neospora caninum*. Com grifo, identidade/similaridade entre NcROP55 e as outras quatro sequências.

Identidade/similaridade (%)	TgROP37	HhROP28	EnROP30	NcROP28
NcROP55	14/24	14/26	13/24	15/46
TgROP37	-	15/28	09/19	15/30
HhROP28	-	-	09/21	53/69
EnROP30	-	-	-	10/22

4.2 Clonagens de NcROP55 e NcROP15B

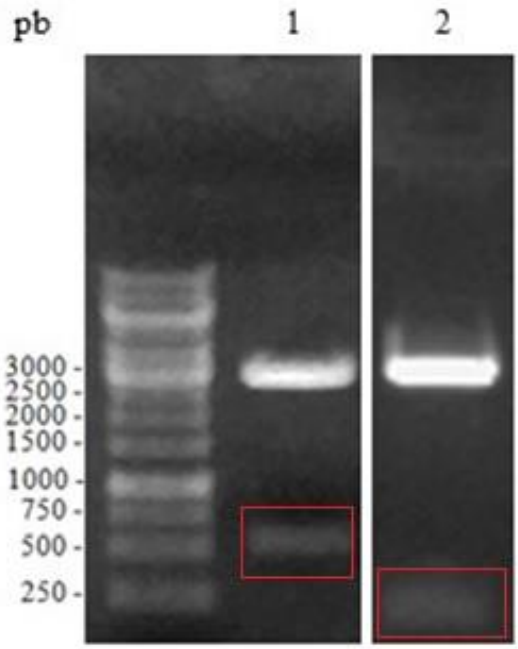
O cDNA obtido por transcrição reversa a partir de RNA de *N. caninum* foi utilizado na PCR para amplificação dos fragmentos de NcROP55 (Maior ou Menor) e NcROP15B (Maior ou Menor). As amplificações foram realizadas com sucesso, NcROP15B maior foi detectado com 500 pb (predito 533 pb, Figura 9, poço 1) e o fragmento de NcROP15B menor exibiu peso molecular ao redor de 200 pb (predito 177 pb, Figura 9, poço 2). Já a NcROP55 maior foi detectada ao redor de 1241 pb (predito 1240pb, Figura 9, poço 3), NcROP55 menor próximo a 233 pb (predito 232, Figura 9, poço 4).

Figura 9. Amplificação por PCR dos genes de roptrias de *N. caninum* NcROP15B e NcROP55. Gel de agarose (0,8%) com os fragmentos NcROP15B Maior/Menor e NcROP55 Maior/Menor que foram amplificados a partir de cDNA de *N. caninum*, por PCR. Nos poços: 1 = NcROP15B Maior,); 2 = NcROP15B Menor; 3= NcROP55 Maior; 4 = NcROP55 Menor. Marcador molecular (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder) à esquerda, indicando valores em pares de bases (pb).



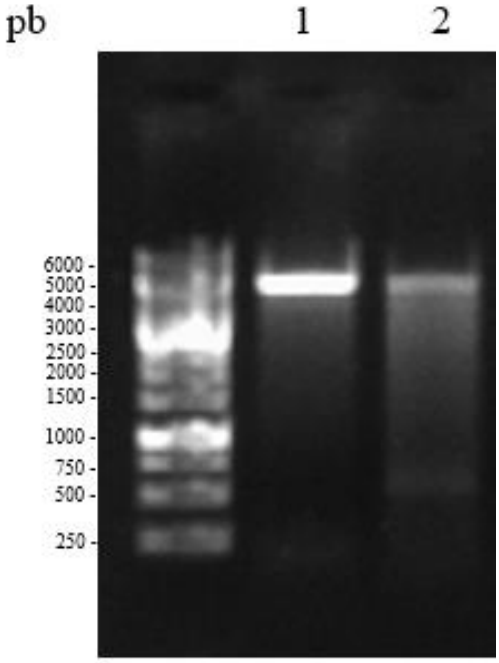
Os respectivos fragmentos amplificados foram clonados no plasmídeo pGEM – T Easy, e o teste de ligação foi feito com digestão do plasmídeo com *BamHI* e *HindII* para NcROP15B e *EcoRI* e *NotI* para NcROP55 (Figura 10). Foram observadas as presenças dos insertos, conforme o predito: NcROP15B Maior: 534 pb (poço 1, Figura 10) e NcROP15B Menor: 178 pb (poço 2, Figura 10). Para os outros fragmentos as ligações também foram verificadas, com sucesso em comparação com o tamanho das sequências preditas: NcROP55 Maior: 1241 pb e NcROP55 233 pb (dados não mostrados).

Figura 10. Clonagem de NcROP15B maior e menor no plasmídeo pGEM-T-Easy. Gel de agarose 0,8 % para verificar a presença do fragmento clonado. O plasmídeo pGEM® - T Easy foi digerido com as enzimas *BamH I* e *Hind III* para checar a ligação com o fragmento NcROP15B Maior. A digestão do plasmídeo resultou em um fragmento de tamanho esperado (534 pb). Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder a esquerda; no poço 1 = amostra digerida contendo uma banda de 3000 pb (pGEM) e 534 pb (fragmento NcROP15B maior); poço 2 = amostra digerida contendo uma banda de 3000 pb (pGEM) e 178 pb (fragmento NcROP15B menor). Marcador molecular à esquerda, indicando valores em pares de bases (pb). Os retângulos vermelhos indicam as regiões dos fragmentos clonados.



Após clivagem e verificação da presença dos fragmentos (Figura 11), os plasmídeos pET28 foram então transformados em células BL21 para proceder à expressão das proteínas recombinantes. Foram observadas as presenças dos insertos, conforme o predito: NcROP15B Menor: 178 pb (poço 1, Figura 11), NcROP15B Maior: 534 pb (poço 2, Figura 11). No caso de NcROP55 Menor/Menor não identificado na imagem.

Figura 11. Clonagem de NcROP15B Maior/Menor no plasmídeo pET28. Gel de agarose 0,8 % para verificar a presença do fragmento clonado. O plasmídeo pET 28 foi digerido com as enzimas *BamH I* e *Hind III* para checar a ligação com o fragmento NcROP15B Maior/Menor e o fragmento NcROP55 com as enzimas *EcoRI* e *NotI*. Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder a esquerda; no poço 1 = fragmento NcROP15B menor; poço 2 = fragmento NcROP15B maior. Marcador molecular à esquerda, indicando valores em pares de bases (pb).



4.3 Expressão e purificação das proteínas

Os fragmentos NcROP15 maior (35.3 kDa) e menor codificam proteínas de 19,9 e 6,8 kDa, respectivamente, compreendendo 56% (maior) e 18% (menor) da sequência codificadora do gene. Já os fragmentos maior e menor NcROP55 (proteína completa de 47,9 kDa) ocupam 97% e 18% da sequência completa, respectivamente, codificando proteínas de 46,5 kDa e 8,5 kDA. O ponto isoelétrico da sequência codificadora de NcROP15 é de 8.47, enquanto NcROP55 de 8,42. Os fragmentos indicam pontos isoeletricos de 7,96 (NcROP15 maior), 9,46 (NcROP15 menor), 8,89 (NcROP55 maior) e 5,58 (NcROP55 menor) (Tabela 6).

Tabela 6 – Características de NcROP15 e NcROP55 e respectivos fragmentos. A posição dos fragmentos maior e menor de NcROP15 e NcROP55 está especificado em relação as sequências completas. Dados de ponto isoelétrico, peso molecular (em kDa) e peso molecular predito dos fragmentos recombinantes em pET28 (em kDa) e massa molecular das formas recombinantes observadas estão demonstrados nas colunas. .

Fragmentos	Posição na sequência codificadora (nucleotídeos)	PI	Massa molecular (MM-kDa)	MM kDa predito sem peptideo sinal	kDa cauda His (kDa	MM-kDa Observado
ROP15Total	1 - 951	8,47	35,3	32,4	-	-
ROP15Maior	247 - 780	7,96	19,9	-	4-5	30
ROP15Menor	289 - 466	9,46	6,8	-	4-5	16
ROP55Total	1 - 1278	8,42	47,9	Não possui	-	-
ROP55Maior	10 -1250	8,89	46,5	-	4-5	19,9
ROP55Menor	667 - 899	5,58	8,5	-	4-5	15

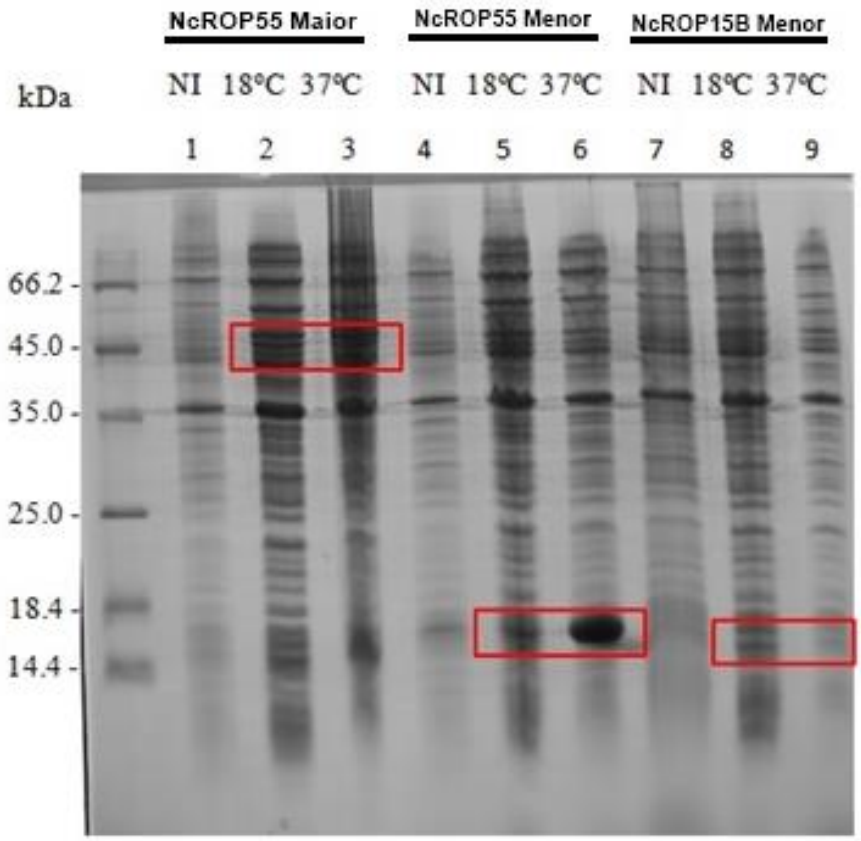
4.3.1 Teste de expressão com diferentes temperaturas

Durante a etapa de indução com IPTG, os plasmídeos pET28 contendo os fragmentos NcROP15B Maior, NcROP15BMenor, NcROP55 Maior ou NcROP55Menor, transformados em cepa de *E.coli* BL21 foram testados em duas condições de temperatura para comparar a expressão das proteínas recombinantes.

A proteína NcROP15B (fragmento menor) foi expressa com massa de 14 kDa, (próximo ao predito de 11,8 kDa). As melhores condições de indução, foram a 18ºC (poço 8, Figura 12), quando comparado com seu controle não induzido (poço 7, Figura 12) e o induzido a 37ºC (poço 9, Figura 12). No caso da NcROP15B Maior a indução da expressão foi obtida nas mesmas condições de concentração e temperatura que NcROP15B Menor (dados não mostrados).

Em contraste, a expressão de NcROP55 foi detectada em maior quantidade na temperatura de 37ºC (poço 3 NcROP55 maior e poço 6 NcROP55 menor, Figura 12) quando comparado com 18ºC (poço 2 NcROP55 maior e poço 5 NcROP55 menor, Figura 12) e com seus controles não induzidos (poços 1 e 4, NcROP55 maior e menor, respectivamente, Figura 12).

Figura 12.Teste de temperatura para expressão das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP15B menor e NcROP55 maior e menor. Gel de acrilamida 15% corado por coomassie G-250. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21em duas condições de temperatura (18º e 37º) com IPTG. Poços 1, 2, 3: NcROP55 maior Poços 4. 5 e 6: NcROP55 menor Poços 7. 8 e 9: NcROP15B menor Poços 1, 4 e 7 = *E. coli* BL21 transformada com pET28 não induzidas com IPTG. Poços 2, 5 e 8= *E. coli* BL21 transformada com as proteínas recombinantes e pET28 induzidas com IPTG (0,75mM) a 18ºC, Poços 3, 6, 9 = *E. coli* BL21 transformada com as proteínas recombinantes e pET28 induzidas com IPTG (0,75mM) a 37ºC. Marcador molecular em quilodáltons (kDa) à esquerda. Os retângulos vermelhos indicam as regiões das proteínas recombinantes.



4.3.2 Teste de Solubilidade

Após verificação da temperatura para expressão com maior rendimento das proteínas recombinantes foi realizada uma extração sequencial, inicialmente com tampão Tris-HCl, depois com Tris-Triton e por último com concentração crescente de ureia (2, 4 e 8M). NcROP15B Menor foi encontrada em pequena quantidade em todos os tampões, desde o tampão Tris-HCl até o tampão com ureia (poços 1 a 6, Figura 13A). NcROP15 Maior foi expressa com massa próximo de 30 kDa, tendo massa predito de 25 kDa (20 kDa + 5 kDa cauda histidina), sendo obtida de forma solúvel em tampão Tris-Triton (poço 3, Figura 14), porém em quantidade bem menor quando comparado com tampão Ureia 8M (poços 5, Figura 14). A proteína

recombinante NcROP55 Maior foi expressa de forma abundante, porém predominantemente em corpos de inclusão, ou seja, solúvel apenas em ureia 8M (poços 1 a 6, Figura 13B). Já sua forma NcROP55 Menor pode ser visualizada em pequena quantidade nas extrações iniciais, porém sua forma predominante foi detectada em tampão Ureia 8 M (poços 1 a 6, Figura 13C).

Figura 13. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP15B Menor e NcROP55 Maior/Menor. Géis SDS-PAGE 12,5% (A e B) e 15%; (C) corados por coomassie G-250. A) NcROP15B menor, induzida com IPTG (0,75mM) a 18ºC; B) NcROP55 maior induzida com IPTG (0,75mM) a 37ºC, C) NcROP55 menor induzida com IPTG (0,75mM) a 37ºC. Poços 1 = sobrenadante do tampão Tris-Cl (pH= 7,5); Poços 2 = sobrenadante do tampão Tris-Triton (Tris-Cl; 5% Triton X-100); Poços 3 a 5 = sobrenadante do tampão Ureia (pH= 8) com molaridade 2M, 4M e 8M, respectivamente. No poço 6 = Extrato proteico de NcROP15B menor (A); NcROP55 maior (B) e NcROP55 menor não induzido com IPTG. Marcador molecular à esquerda em quilodáltons (kDa). As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes.

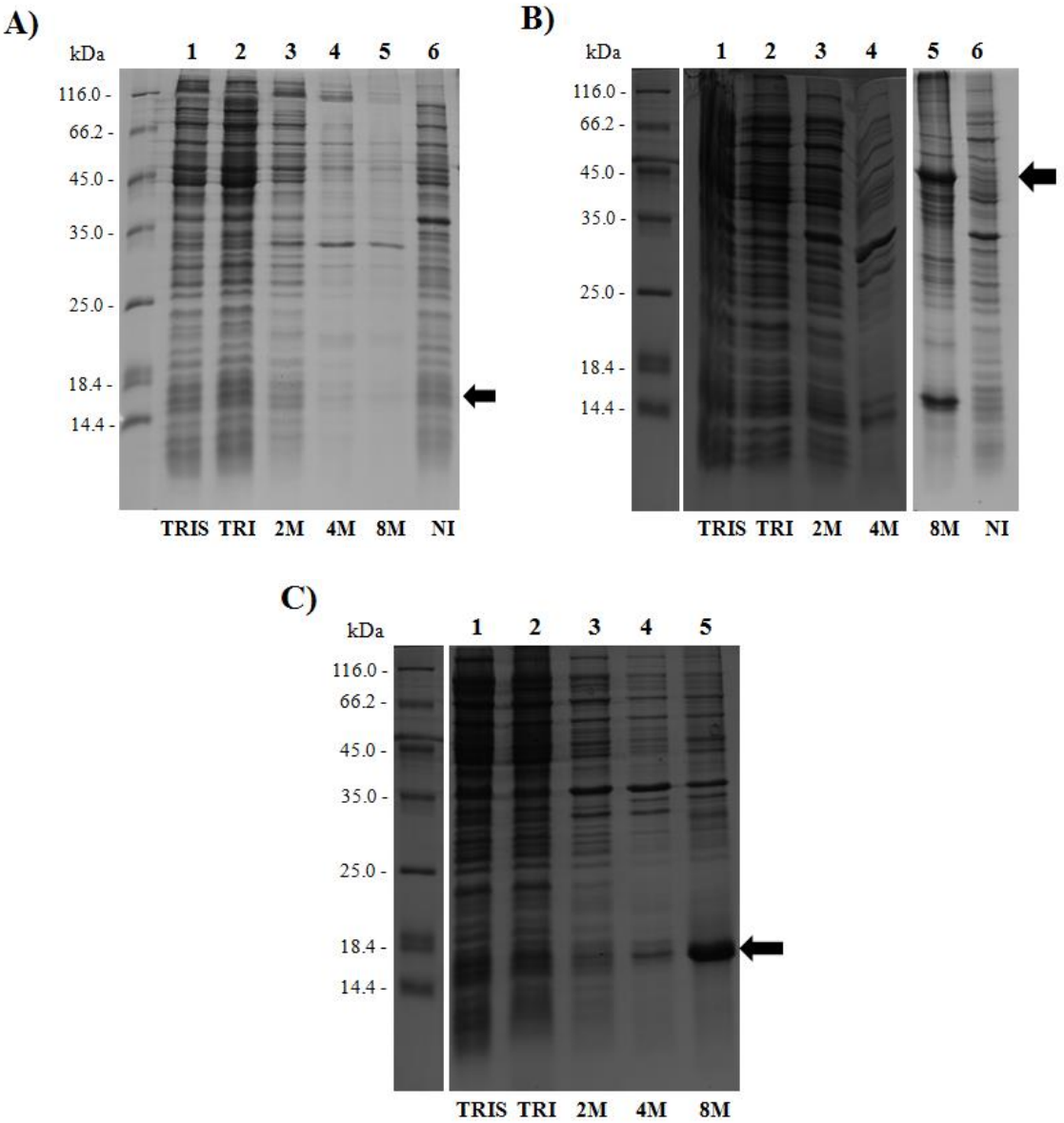
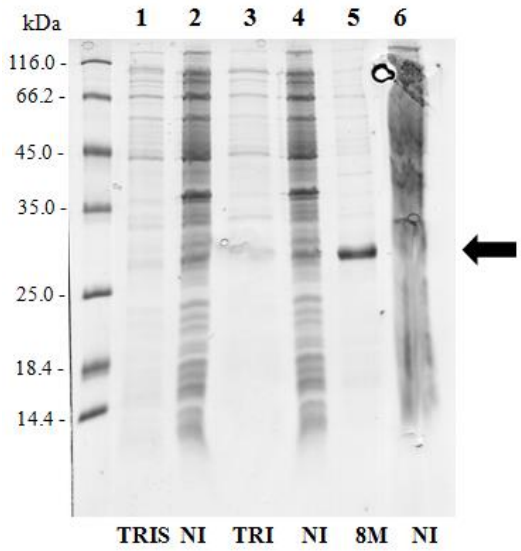


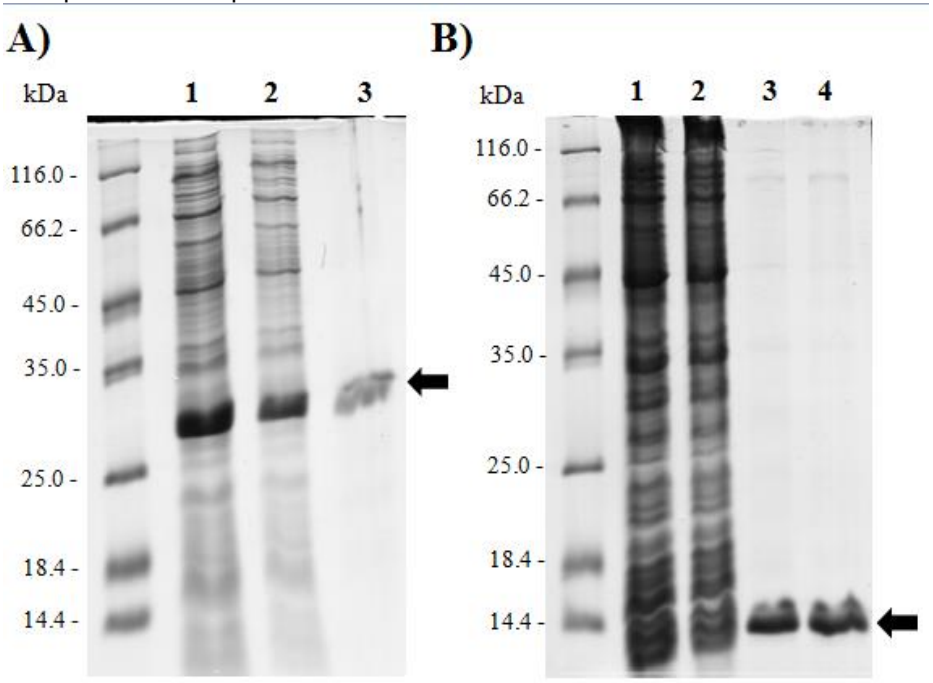
Figura 14. Teste de solubilidade da proteína NcROP15B Maior. Gel SDS-PAGE 15% corado por coomassie G-250. Poço 1 = sobrenadante do tampão Tris-HCl (pH= 7,5); Poços 2, 4 e 6 = extrato proteico não induzido com IPTG; Poço 3 = sobrenadante do tampão Tris-Triton (Tris-Cl; 5% Triton X-100); Poço 5 = sobrenadante do tampão Ureia 8M (pH= 8). Marcador molecular à esquerda em quilodáltons (kDa). A seta indica a banda correspondente à NcROP15B maior.



4.3.3 Purificação

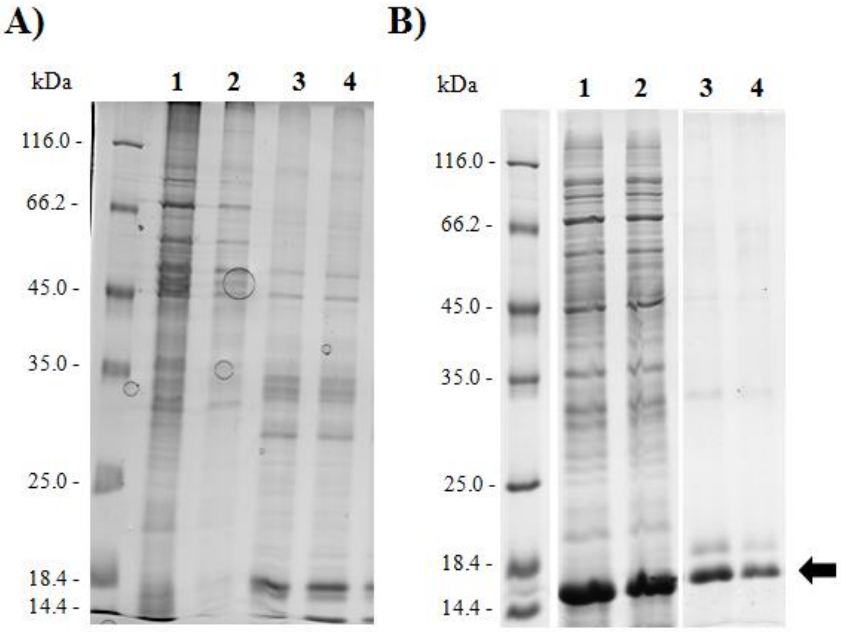
Em seguida, foram realizadas as purificações em coluna de níquel das proteínas recombinantes. NcROP15B maior (poço 3, Figura 15A) e NcROP15B menor (poços 3 e 4, Figura 15B) foram obtidas em quantidade significativa em sua forma purificada. Porém foi possível observar que ambos os fragmentos de NcROP15B estavam presentes na fração inicial e na fração que não se ligou à coluna, o *flowthrough* (poços 1, 2, Figuras 15A e 15B).

Figura 15. Purificação das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP15B Maior e NcROP15B Menor. Géis SDS-PAGE 15% corado por coomassie G-250. A) Purificação de NcROP15B maior.: os poços: 1 = extrato total de *E. coli* com o plasmídeo pET28 clonado com o gene NcROP15B Maior induzido com IPTG material inicial; 2 = alíquota do extrato proteico de *E.coli* que passou não se ligou à coluna (*flowtrough*); 3 = alíquota eluída em tampão ureia 8 M pH 4,5, indicando a banda correspondente à proteína recombinante em aproximadamente 29 kDa. B) Purificação de NcROP15B menor; Nos poços 1 = extrato total de *E. coli* com o plasmídeo pET28 clonado com o gene NcROP15B Menor induzido com IPTG - material inicial; 2 = alíquota do extrato proteico de *E.coli* que passou não se ligou à coluna (*flowtrhough*); ; 3 e 4 = duas alíquotas eluídas em sequência no tampão ureia 8 M pH 4,5. Marcador molecular quilodáltons (kDa). As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes.



A purificação da proteína NcROP55 fragmento maior não foi obtida com sucesso, pois não foi possível observar uma banda predominante, tendo sido detectados vários contaminantes (poços 3 e 4 em comparação com poços 1 e 2, Figura 16A). Já a purificação da proteína NcROP55 menor foi obtida com maior especificidade, (poços 3 e 4 em comparação com poços 1 e 2, Figura 16B).

Figura 16. Purificação das proteínas recombinantes de *Neospora caninum* NcROP55 Maior e NcROP55 Menor, respectivamente. Géis SDS-PAGE 15% corado por coomassie G-250. A) Purificação de NcROP55 maior: os poços: 1 = extrato total de *E. coli* com o plasmídeo pET28 clonado com o gene NcROP55 Maior induzido com IPTG material inicial; 2 = alíquota do extrato proteico de *E.coli* que passou não se ligou à coluna (*flowtrhough*); 3 e 4 = alíquotas eluídas em tampão ureia 8 M pH 4,5, indicando a banda correspondente à proteína recombinante. B) Purificação de NcROP55 menor; Nos poços 1 = extrato total de *E. coli* com o plasmídeo pET28 clonado com o gene NcROP55 Menor induzido com IPTG - material inicial; 2 = alíquota do extrato proteico de *E.coli* que passou não se ligou à coluna (*flowtrhough*); ; 3 e 4 = duas alíquotas eluídas em sequência no tampão ureia 8 M pH 4,5. Marcador molecular em quilodáltons (kDa) à esquerda. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes.



As proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas para a imunização dos animais seguindo o protocolo descrito anteriormente (item 3.13). Porém, não foi realizada imunização para a proteína NcROP55 maior devido ao insucesso na purificação.

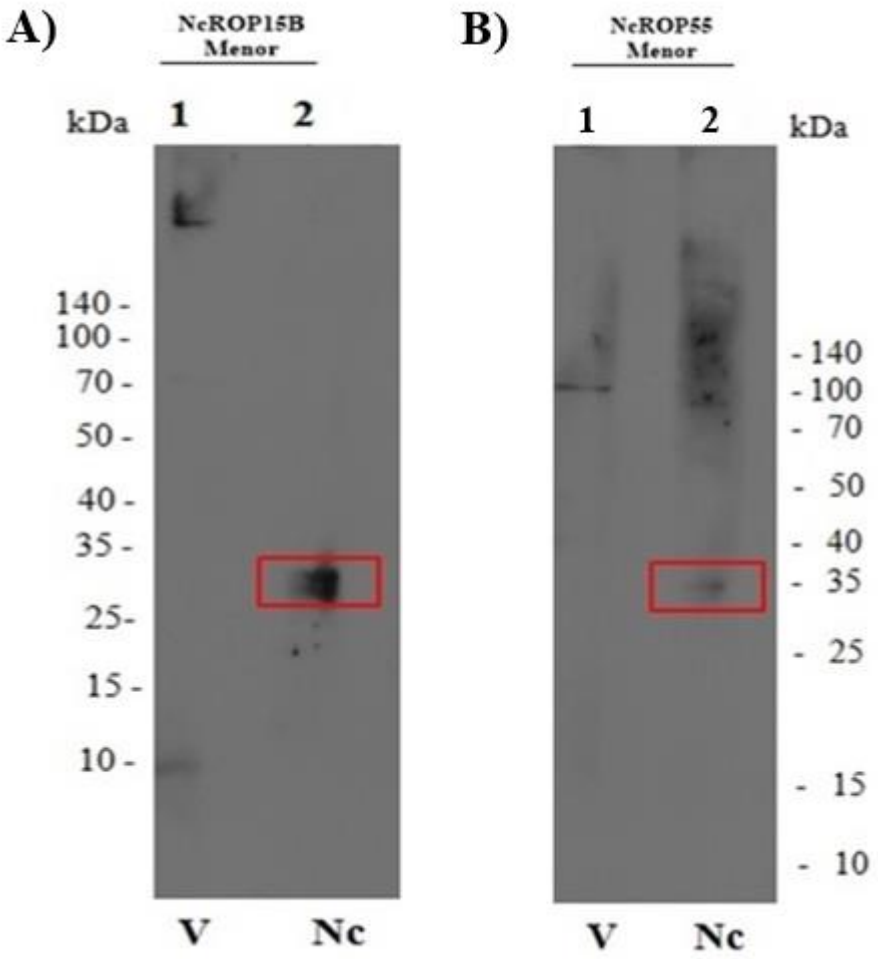
4.4 *Western blot*

4.4.1 W*estern blot* 1D para caracterização dos anticorpos e identificação das proteínas nativas NcROP15B e NcROP55

Após imunização dos camundongos com as respectivas proteínas recombinantes, os anticorpos policlonais anti-NcROP15B Menor e NcROP55 Menor foram testados para verificação de sua reatividade com as respectivas proteínas nativas presentes no extrato proteico total de *N. caninum*. Anti-NcROP15B Menor apresentou duas bandas logo abaixo de 35 kDa, em comparação com o predito de NcROP15 sem peptídeo sinal de 32,4 kDa (poço 2, Figura 17A). O soro anti-

NcROP55 Menor apresentou reatividade com uma banda de 35 kDa, porém NcROP55 possui peso predito de 47,9 kDa (poço 2, Figura 17B). Nos extratos de células Vero, anti-NcROP15B Menor reagiu com uma banda de aproximadamente 10 kDa e anti-NcROP55 Menor com uma banda de Vero de massa maior 100 kDa, bandas frequentemente identificadas em células Vero (poços 1 e 2, figura 17A e 17B).

Figura 17. Reatividade dos soros policlonais anti-ROP15B e anti-ROP55 com extrato de *N. caninum* para localização de suas proteínas nativas. Western blot 1D com extrato de *N. caninum* e células Vero (controle) reagindo com anticorpos policlonais anti-NcROP15B menor e anti-NcROP55 menor. A) Nos poços 1 = extrato de células Vero; Poço 2 = anticorpos policlonais anti-NcROP15B menor. B) Nos poços 1 = extrato de células Vero; Poço 2 = anticorpos policlonais anti-NcROP55 menor. (V). Marcador de peso molecular à esquerda em kDa. Os retângulos vermelhos indicam as bandas correspondentes às proteínas nativas.

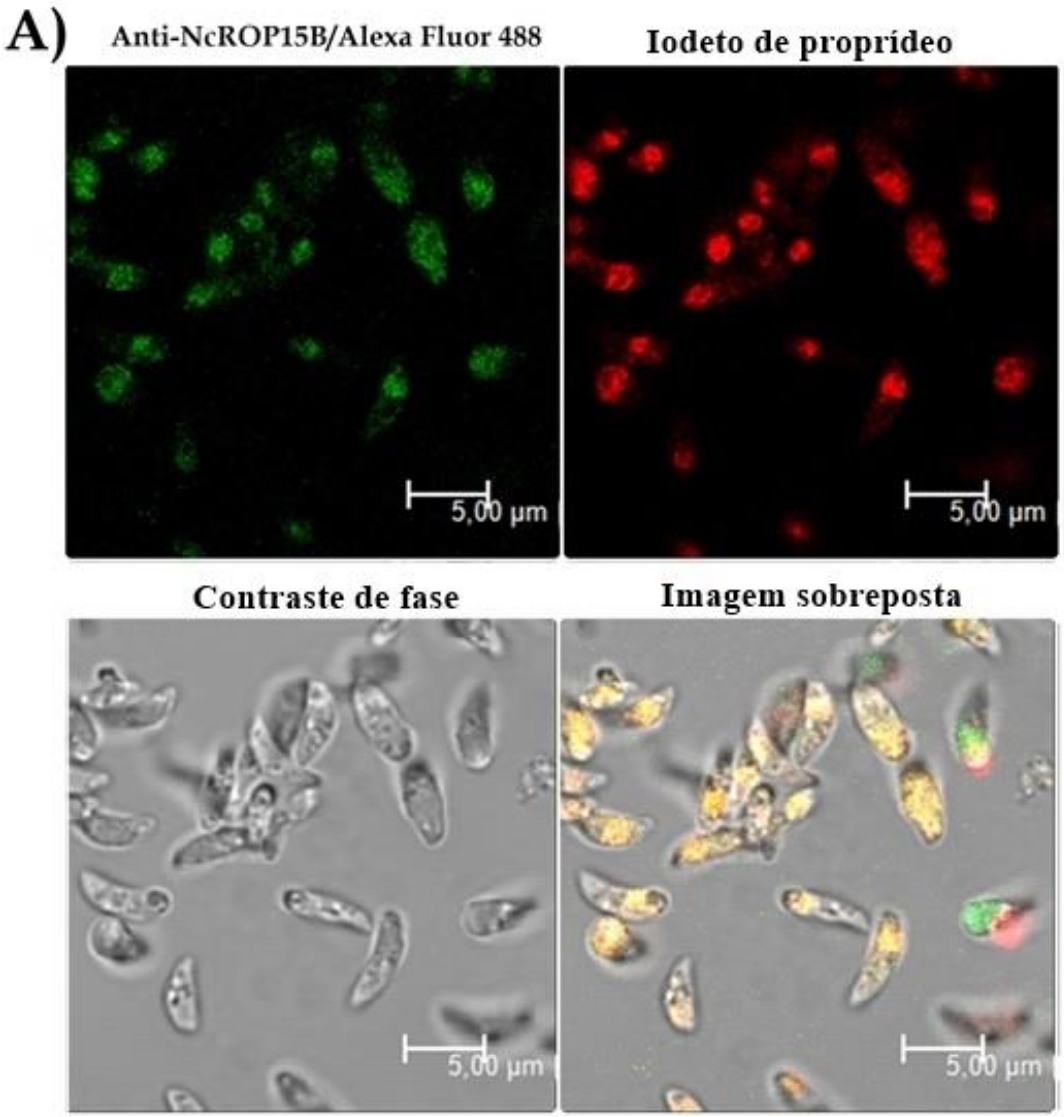


4.5 – **Imunofluorescência**

NcROP15B e NcROP55 foram localizadas em taquizoítos de *N. caninum* recém-purificados por imunofluorescência em microscopia confocal. Os taquizoítos

incubados com anti-NcROP15B ou anti-NcROP55 apresentaram um padrão semelhante quando visualizados com conjugado (anti-mouse-FITC) marcado com FITC (Figura 19). Ambas as proteínas foram detectadas na região perinulcear/nuclear do parasita, o que se sobrepôs com a marcação nuclear realizada com iodeto de propídeo. A marcação atingiu praticamente todos os taquizoítos do campo analisado sendo evidente em campo claro e escuro (Figura 19 A e B). O soro pré-imune (anticorpos de animais não imunizados) apresentou baixa reatividade, sem uniformidade na fluorescência, mas com localização diferente dos soros policlonais anti NcROP15B e NcROP55 (Figura 18). O preparo das amostras para microscopia de fluorescência (fixação, permeabilização, bloqueio e montagem) não alterou a forma típica do parasita (bright/campo claro), indicando que os taquizoítos são adequados para este procedimento (Figura 19).

Figura 18. Localização por imunofluorescência de NcROP15B e NcROP55 os taquizoítos de *N. caninum.* Microscopia confocal realizada em taquizoítas de *N. caninum* não permeabilizados e fixados em lâmina, os quais foram incubados com soros policlonais de camundongos anti-rNcROP15 (A) e soros policlonais de NcROP55. Analisados com anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 anti-camundongo IgG. Nas duas imagens - da esquerda para a direita - a primeira imagem representa a marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488; a segunda, a marcação do núcleo com iodeto de propídeo; a terceira imagem, contraste de fase e a quarta, a sobreposição entre a marcação com iodeto de propídeo e Alexa Fluor 488. Barra = 5 µm.



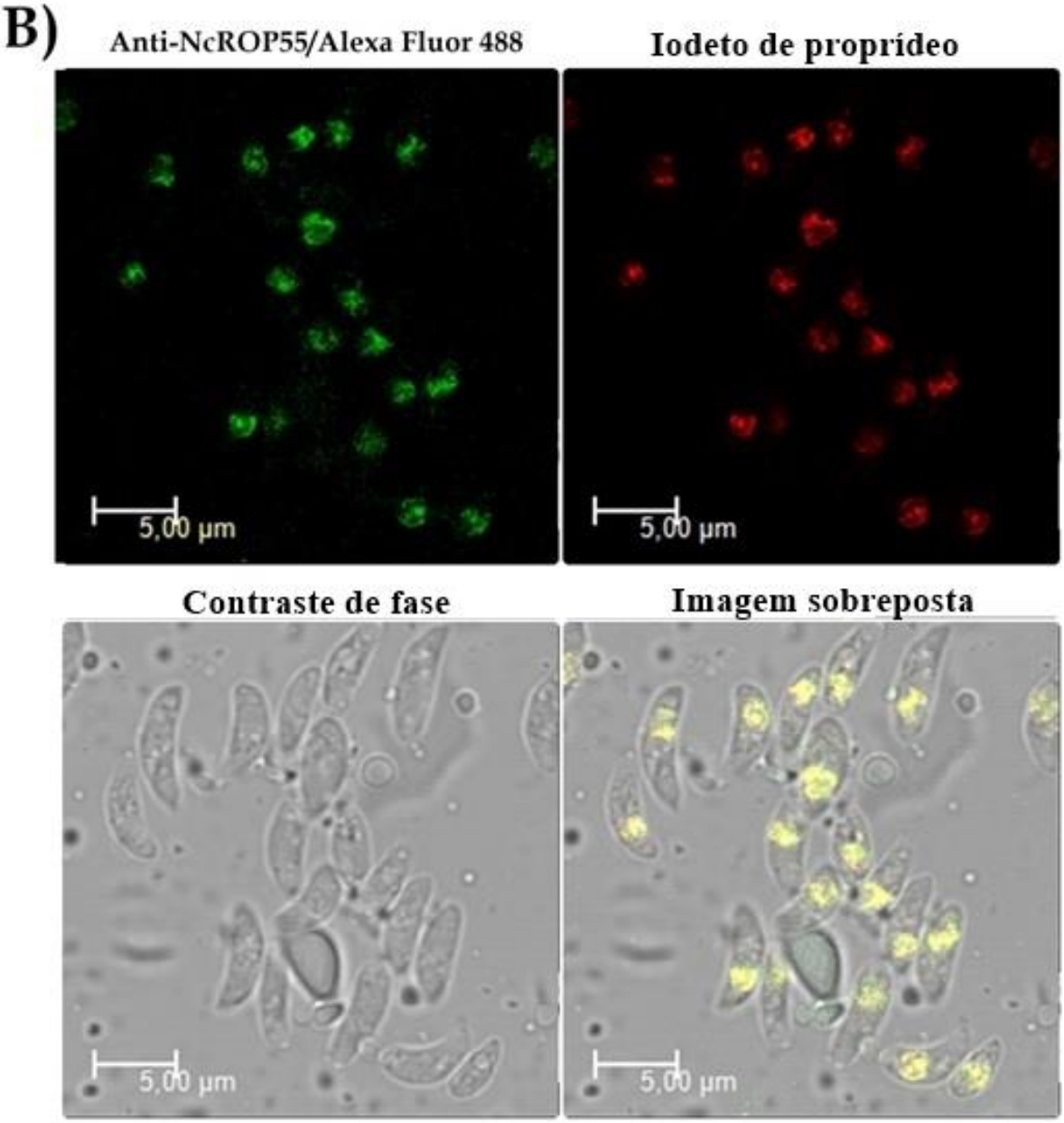
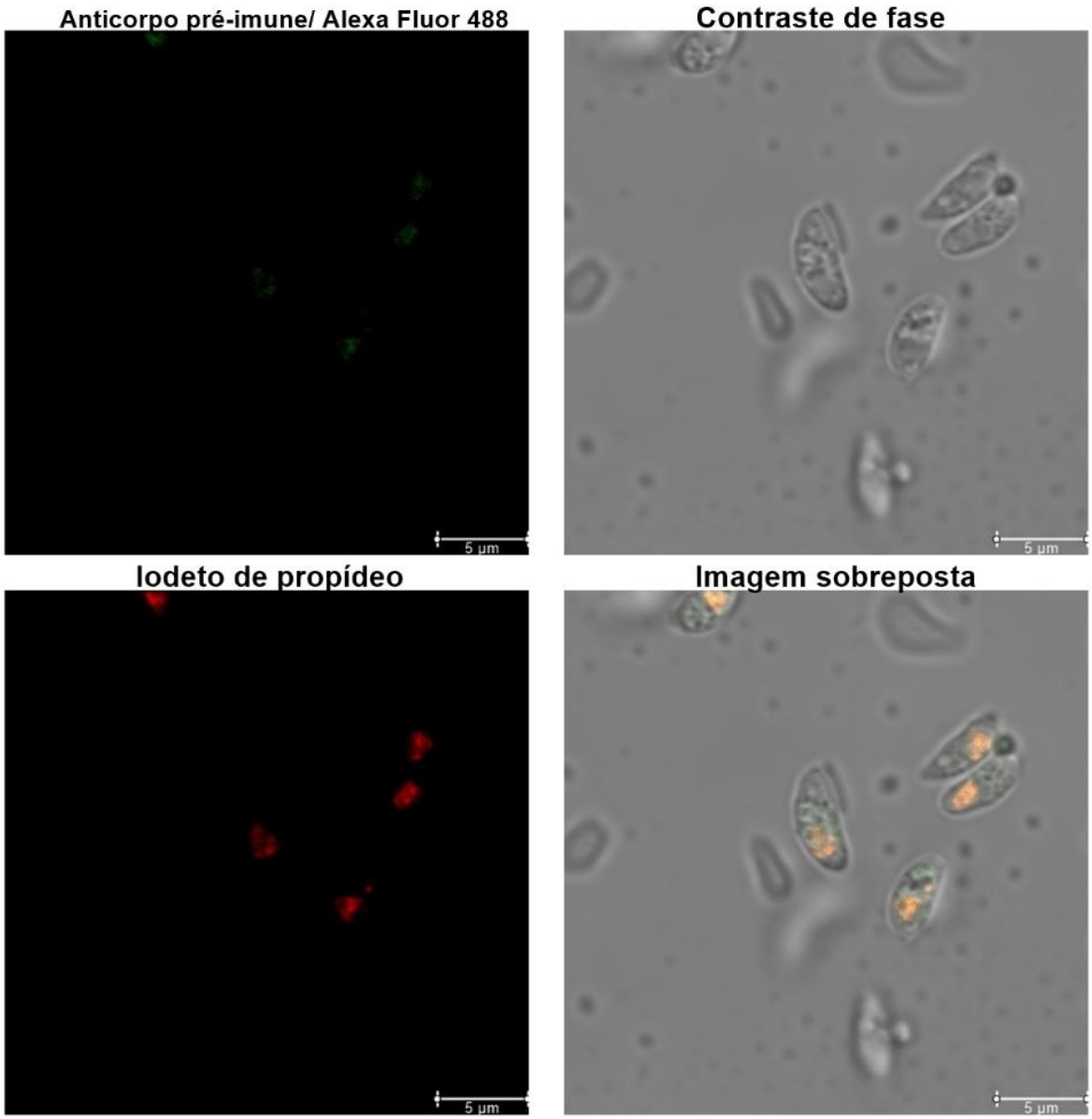

B)
Anti-NcROP55/Alexa Fluor 488
Iodeto de proprídeo
5,00 µm
5,00 µm
Contraste de fase
Imagem sobreposta
5,00 µm
5,00 µm

Figura 19. Localização por imunofluorescência do anticorpo pré-imune de taquizoítos de *N. caninum*. Microscopia confocal realizada em taquizoítos de N. caninum. O anticorpo foi tratado com anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 anti-camundongo IgG. Da esquerda para a direita, a primeira coluna representa a marcação do anticorpo pré-imune/Alexa Flour 488; a segunda coluna o contraste de fase; a terceira coluna, a marcação do núcleo com iodeto de propídeo e a quarta coluna, a sobreposição entre a marcação com iodeto de propídeo e Alexa Fluor 488. Barra = 5 µm

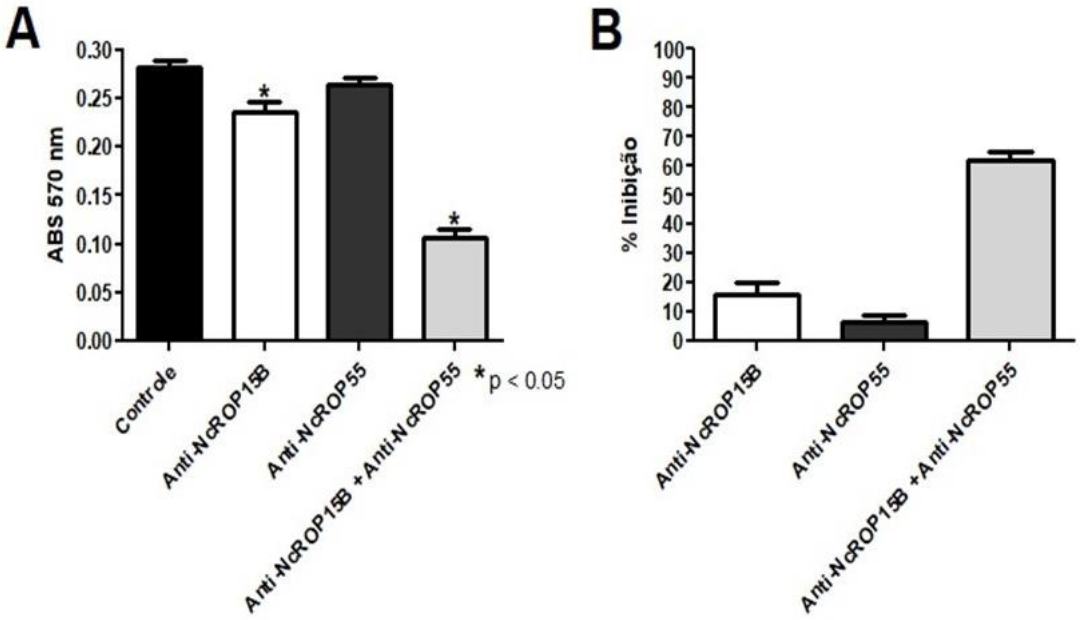


4.6 – Ensaio de Invasão

Os anticorpos anti-NcROP15B e anti-NcROP55 apresentaram capacidade limitada para inibir individualmente o processo de adesão/invasão de *N. caninum* (Figura 20). A absorbância dos grupos incubados com anti-NcROP15B e anti-NcROP55 foi de 0,235 e 0,263, respectivamente, comparado com o controle (0,281) (Figura 20A). Considerando o controle como referência (100%), essas diferenças

resultaram na inibição de 16% (anti-NcROP15B) e 6,43% (anti-NcROP55) (Figure 20B). Porém, quando os soros anti-NcROP15B e anti-NcROP55 foram associados (associação) a absorbância foi de 0,106, o que resultou em 62% de inibição da invasão (Figura 20).

Figura 20. Ensaio de inibição de invasão de taquizoítos de *N. caninum* com soros anti-NcROP15B e anti-NcROP55. Taquizoítos purificados (1 x 10^6/amostra) foram incubados com os soros pré-imune (controle), anti-ROP15B, anti-ROP55 e associação (anti-NcROP15B + anti-NcROP55). A) Resultado em absorbância (ABS 570 nm) do controle (sem soro), Anti-NcROP15B, Anti-NcROP55 e a associação. B) Porcentagem de inibição Anti-NcROP15B, Anti-NcROP55 e Associação. *P<0.05.



5. DISCUSSÃO

Os genes NcROP15B (NCLIV_011700) e NcROP55 (NCLIV_031550), localizados no cromossomo VIII de *Neospora caninum,* foram clonados e expressos, para uma caracterização inicial destas proteínas de roptrias no processo de invasão celular e interação entre o parasito e o hospedeiro.

Análises *in silico* são úteis para verificar certas características, e, dessa maneira, foi observado que a proteína NcROP15B possui predição de um peptídeo sinal, fato relevante para uma proteína entrar na via de secreção em eucariotos (EL HAJJ et al. 2006). Conforme a plataforma INTERPRO, NcROP15B possui um domínio relacionado com Ubiquitina (IPR029071). Este domínio faz parte de uma

família maior chamada superfamília Subunidade Catalítica Fosfatidilinositol 3-quinase (*Phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic Subunit,* CATH Superfamily 3.10.20.90), de proteínas quinase, atividade já descrita em algumas proteínas de roptrias e que, também está presente em NcROP15B (BUTCHER et al., 2011). As proteínas quinases compõem uma extensa família de proteínas em eucariontes e são componentes fundamentais da cascata de sinalização que ocorre no controle intracelular, na regulação e transdução de sinais (PEIXOTO et al., 2010). Assim, alguns estudos com proteínas de roptrias em *T. gondii*, *N. caninum* e outros organismos do grupo Apicomplexa, indicaram a presença de uma região quinase, podendo-se observar a capacidade de remodelação celular, transdução e o transcriptoma da célula hospedeira através de eventos de fosforilação, que estão associados ao ciclo lítico do parasito (JACOT;SOLDATI-FAVRE, 2012; LIM et al., 2012).

Ao realizarmos o BLAST no ToxoDB, verificamos que NcROP15B apresenta baixa identidade (19%) com as sequências de ROP15 de *T. gondii* e *Hammondia hammondi*. Na plataforma NCBI foram detectadas baixa similaridade com duas sequências de bactérias (*Streptomyces sp* e *Paracoccus*). Tal análise demonstra que NcROP15B possui características únicas em relação a todos os Apicomplexas, tornando-a distinta em comparação a outras proteínas de roptrias que tem percentual de identidade de 77% entre ROP15 de *Toxoplasma gondii* com *Hammondia hammondi*.

NcROP55 é uma proteína que do mesmo modo apresenta um domínio da superfamília de proteínas quinase (CL0016, PFAM), que inclui as do tipo Serina/Treonina e Tirosina, confirmando assim, predição para mais uma proteína de roptria com potencial para atividade quinase (HANKS;HUNTER, 1995). Esse domínio já foi observado em algumas proteínas de roptria como NcROP5, TgROP5, TgROP8, TgROP17, TgROP18, TgROP20 que mostraram estar envolvidas na virulência e alteração da transcrição de células do hospedeiro (BEHNKE et al., 2012; BRADLEY;SIBLEY, 2007). Por exemplo, ROP18 é uma serina/treonina quinase que pode fosforilar proteínas do hospedeiro pertencentes à família de GTPases celulares, chamadas de IRG (GTPases relacionadas à Imunidade). Ao fosforilar as IRGs do hospedeiro, ocorre uma inativação destas proteínas que em condições normais destroem a membrana do vacúolo parasitóforo e expõem *T. gondii* ao ataque da resposta imune do hospedeiro. Além de TgROP18, TgROP17 também

interage com TgROP5 para inibir o acúmulo de IRGs dentro dos vacúolos parasitóforos (ETHERIDGE et al., 2014). Ao inativar as IRGs, os parasitos mantêm-se protegidos dentro do vacúolo parasitóforo (FENTRESS et al., 2010; KHAMINETS et al., 2010). Desse modo, NcROP55 pode apresentar uma importante função relacionada a virulência e proteção do parasito, porém este aspecto só poderá ser elucidado com estudos funcionais.

NcROP15B apresentou identidade de 14% com ROP37 de *T. gondii* e ROP28 de *Hammondia hammondi*, e 15% com ROP28 de *Neospora caninum*. Assim como para NcROP55, a baixa identidade com quaisquer outras proteínas até mesmo do NCBI pode demonstrar um perfil ainda mais exclusivo de NcROP55.

Outro ponto analisado nesse trabalho foi em relação à expressão das proteínas recombinantes. Os fragmentos (maior e menor) de NcROP15B apresentaram solubilidade, mesmo que parcial, em tampão Tris-Triton. Já os fragmentos de NcROP55 (maior e menor) são solúveis apenas em ureia 8M. De fato, a expressão recombinante em *E. coli* apresenta variações quanto a solubilidade, dependendo da proteína a ser expressa. Muitas proteínas não sofrem o *folding* correto, formando corpos de inclusão, solúveis apenas em tampões desnaturantes (como ureia) (GARCIA-FRUITOS, 2010). Mesmo pertencendo a mesma família de proteínas (proteínas quinases de roptrias) NcROP15B e NcROP55 foram expressas de modos distintos em *E. coli.* Isso exigirá clonagens em outros plasmídeos ou tipos de células para melhorar a solubilidade de NcROP55, pois testes de atividade enzimática requerem a proteína em seu estado solúvel.

NcROP15B foi detectada em sua forma nativa no extrato de *N. caninum*, por Western blot, com tamanho bem próximo (35 kDa) ao peso predito (32.4 kDa) Já NcROP55 foi detectada com peso bem menor, 35 kDa ante os 47,9 kDa predito. Tais inconsistências detectadas entre peso molecular predito e detectado no extrato do parasito são comuns por possíveis modificações pós-traducionais ou processos de clivagem. Para NcROP40 e NcROP2Fam-1 diversas bandas (de 5 a 6) foram detectadas com pesos moleculares maiores e menores que o predito (PASTOR-FERNANDEZ et al., 2016; ALAEDDINE et al., 2013). As proteínas de roptrias possuem um complexo processo de maturação demonstrados em *T. gondii*, com estágios PRO, PRÉ e PÓS maturação, gerando várias formas clivadas a partir da região N-terminal (HAJAGOS et al., 2012), o que poderia explicar o menor peso molecular de NcROP55.

Com relação à localização por imunofluorescência, NcROP15B e NcROP55 ficaram concentradas na região perinuclear do taquízoito, da mesma maneira que outras proteínas de roptrias em *N. caninum* e *T. gondii*, como o TgROP16 que foi focalizado no núcleo da célula hospedeira (BRADLEY;SIBLEY, 2007). Conforme estudos de outros grupos, algumas proteínas de roptrias secretadas foram localizadas intracelularmente e circundavam o núcleo da célula hospedeira. Resultados bastante similares ao desse trabalho foram obtidos para as proteínas NcROP40 e NcROP2Fam-1 (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2015), quando os autores sugeriram que NcROP40 pode ser secretada no citosol da célula hospedeira. Curiosamente, a proteína NcROP40 mostra alguma localização nuclear quando expresso, podendo ser translocada para o núcleo da célula hospedeira mesmo sendo secretado no citosol (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2015). Tais pesquisas colaboram com os dados observados no presente trabalho.

O papel das proteínas NcROP15B e NcROP55 no proesso de invasão celular por *N. caninum* foi avaliada indiretamente através de um ensaio com os anticorpos policlonais. Quando associados, os soros anti-NcROP15B e NcROP55 inibiram a invasão em 62% em contraste com a inibição de 7 ou 12% com os soros individualmente. Isso poderia indicar que as proteínas ROP15B e ROP55 possuem funções sinérgicas, podendo, por exemplo, atuarem em sequencia dentro de uma cascata de sinalização celular. NcROP16 é secretada durante a invasão e participa na fosforilação da STAT3 (fator de transcrição) do hospedeiro (MA et al., 2017a). O fator STAT3 está envolvido com a ativação da apoptose, e o aumento da apoptose contribui como mecanismo de evasão de patógenos, como *T. cruzi* (DECOTE-RICARDO et al., 2017). De fato, a superexpressão de NcROP16 eleva a apoptose de células parasitadas, com aumento da virulência e carga parasitária (MA et al., 2017a). Entretanto, para *T. gondii* o aumento da apoptose está relacionada a um mecanismo de defesa contra o parasita. Deste ponto de vista, as células invadidas pelo parasito entram em apoptose, inibindo a proliferação do patógeno (BESTEIRO, 2015; BLADER ; SAEIJ, 2009). Portanto, novos estudos serão necessários para compreender a relação entre a apoptose induzida por ROPs, controle da infecção e virulência em *N. caninum* e *T.gondii*. Outras ROPs (NcROP5, NcROP40, NcROP2) também participam do processo invasivo/virulência de *N. caninum*, entretanto os mecanismos ainda estão pouco esclarecidos (MA et al., 2017b; PASTOR-FERNANDEZ et al., 2016).

Existem evidências filogenéticas que as ROPs tem sofrido extensa seleção evolutiva após a divergência entre os gêneros *Neospora* e *Toxoplasma* (PEIXOTO et al, 2010), o que tem sido comprovado por diversos trabalhos mostrando diferentes padrões de expressão de ROPs entre os dois parasitos. Desta forma, o nosso trabalho de caracterização das proteínas NcROP15B e NcROP55, mesmo que inicial, é de extrema importância, já que despertou um horizonte para aprofundamento dos estudos, como abordagens funcionais destes genes em *N. caninum*. Genes específicos e ativos podem auxiliar não somente uma melhor compreensão do parasito mas abrir caminhos para identificação de novos alvos terapêuticos de neosporose.

5 CONCLUSÕES

- As sequências de NcROP15B e NcROP55 possuem características de proteínas de roptrias quinases;

- NcROP15B possui identidade de 19% com as sequencias de ROP15 de *T. gondii* e *Hammondia hammondi* e NcROP55 é 14% idêntico com ROP37 de *T. gondii* e com ROP28 de *Hammondia hammondi*, e 15% com ROP28 de *Neospora caninum*.

- NcROP15B e NcROP55 estão localizadas na região perinuclear de taquizoítos de *N. caninum* em microscopia confocal;

- Soro policlonal anti-NcROP15B e anti-NcROP55 inibem invasão celular de *N.caninum* em 12 e 7%, e quando associados a inibição de invasão sobe para 62%

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Vet Parasitol,** v. 142, n.1-2, p.71-77, 2006.

ALAEDDINE, F. et al. Molecular cloning and characterization of NcROP2Fam-1, a member of the ROP2 family of rhoptry proteins in *Neospora caninum* that is targeted by antibodies neutralizing host cell invasion in vitro. **Parasitology**, v. 140, n. 8, p. 1033–50, 2013.

ALEXANDER, D. L. *et al*. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: A collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 2, p. 0137–0149, 2005.

ANDRÉ, M. R. *et al*. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **J Parasitol,** v. 96, n. 5, p. 1007-1009, 2010.

BARR ,B. C. *et al* Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **J Am Vet Med Assoc**, v. 202, p. 113-117,1993.

BARRATT, J. L. *et al*. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 795–836, 2010.

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

BENETTI, A. H. *et al*. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet**; v. 18 (Suppl 1), p. 29-33, 2009.

BESTEIRO, S. *Toxoplasma* control of host apoptosis: the art of not biting too hard the hand that feeds you. **Microbial Cell**, v. 2, n. 6, p. 178-181, 2015.

BESTEIRO, S. *et al.* Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. **PLoS Pathog,** v. 5, e1000309, 2009.

BILLKER, O.; LOURIDO, S.; SIBLEY, L. D. Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 6, p. 612–622, 2009.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, v. 70, n. 2, p. 271–274, 1984.

BLADER, I. J., SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v.117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J.-F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 79–88, 2008.

BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 582–587, 2007.

BRECHT, S., CARRUTHERS, V.B., FERGUSON, D.J., GIDDINGS, O.K., WANG, G., JAKLE, U., HARPER, J.M., SIBLEY, L.D., SOLDATI, D. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. **J Biol Chem** 276: p. 4119–4127, 2001.

BURG, J. L. *et al*. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. Information about subscribing to The Journal of Immunology, 1988.

CARDOSO, J. M. S *et al*. *Neospora caninum*: analysis of reproductive parameters in dairy herds in Brazil. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 49, n. 6, p. 459-464, 2012.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 421–428, 1999.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme proteins in apicomplexans. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 33–45, 2008.

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

CESBRON-DELAUW, M. F. *et al.* Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 23, p. 16217–16222, 1994.

COSTA, K. S. *et al.* Chickens (Gallus domesticus) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol,** v. 38, v. 2, p. 157-159, 2008.

DECOTE-RICARDO, D., NUNES, M. P., MORROT, A., FREIRE-DE-LIMA, C. G. Implication of Apoptosis for the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 518 , 2017.

DOERIG, C. et al. Malaria: Targeting parasite and host cell kinomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 3, p. 604–612, 2010.

DONAHOE, S. L. *et al.* A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-38, 2015.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **J. Am. Vet. Med. Assoc**., v. 214, p.1160-1163, 1999.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii.* **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.

DUBEY, J.P. *et al*. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J **Am Vet Med Assoc,** v.192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P.; KOESTNER, A; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 197, p. 857-860, 1990.

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

DUBEY, J. P.; DUBEY, J. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean journal of parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2003.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–99, 1998.

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

EL HAJJ, H. *et al*. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5773–5784, 2006.

ETHERIDGE, R. D. et al. The Toxoplasma pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. **Cell Host Microbe**. 2014 May 14; 15(5):537-50

FENTRESS, S. J. et al. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell Host Microbe**. n. 8, p.484–495, 2010.

FINN, D.R., *et al.* InterPro in 2017 — beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, Jan, 2017.

FILHO, P. C. G. A, *et al.* Incidence and vertical transmission rate of *Neospora caninum* in sheep. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis,** v. 52, p. 19-22, 2017

FRENAL, K. *et al*. Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 4, p. 343–357, 2010.

GARCÍA-FRUITÓS, E. Inclusion bodies: a new concept. **Microbial Cell Factories,** v. 9, p. 80, 2010.

GENNARI, S. M *et al.* Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (Bubalus bubalis) from the northern region of Brazil. **Vet Parasitol,** v. 134, n. 1-2, p. 169-171, 2005.

GHORBAL, M. *et al.* Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. **Nat. Biotechnol**, v. 32, p. 819–821, 2014.

GONDIM, L. F. P; PINHEIRO A. M. , ALMEIDA, M. A. O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (Bubalus bubalis) criados no estado da Bahia.

Rev Bras Saúde Prod Anim, v. 8, n.2, p. 92-96, 2007.

GONDIM, L. S. Q, et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (Passer domesticus) in the Northeast of Brazil. **Vet Parasitol, v. 168, n. 1-2, p.** 121124, 2010.

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.

GUIDO, S. *et al*. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.32, n. 2, p. 131-143, 2016.

HAJAGOS, B. E. et al. Molecular dissection of novel trafficking and processing of the *Toxoplasma gondii* rhoptry metalloprotease toxolysin-1. **Traffic**. n. 13, p .292–304, 2012.

HÅKANSSON, S.; CHARRON, A J.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The EMBO journal**, v. 20, n. 12, p. 3132–44, 2001.

HALDORSON, G. J. et al. *Neospora caninum*: Antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 3, p. 172–178, 2006.

HAMMOUDI, P. et al, 2015. Fundamental roles of the golgi-associated *Toxoplasma* aspartyl protease, ASP5, at the host-parasite interface. **PLoS Pathog,** v. 11, e1005211, 2015.

HANKS, S.K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB J.** v. 9 n.857696, maio, 1995

HARRISON, J.; MATSON, P. Patterns and controls of nitrous oxide emissions from waters draining a subtropical agricultural valley. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 17, n. 3, p. n/a–n/a, 2003.

HEHL, A.; KRIEGER, T.; BOOTHROYD, J. C. Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG11. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 271–282, 1997.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 112 (Pt 2), 183-197, 1996.

HEMPHILL, A. *et al*. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 5, n. December 2015, p. 23–36, 2013.

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

HERMANNS, T. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP18 is an Irga6-specific kinase and regulated by the dense granule protein GRA7. **Cellular Microbiology**.

v.18, n. 2, p. 244–259, 2016.

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

HUI, W., *et al.* A nuclear factor of high mobility group box protein in *Toxoplasma gondii*. **PLoS One 9**, e111993, 2014.

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

JACOT, D., SOLDATI-FAVRE, D. Does protein phosphorylation govern host cell entry and egress by the Apicomplexa?. **Int J Med Microbiol**. v. 302, p.195–202, 2012.

JUFVAS, Å., STRÅLFORS, P.; VENER, A. V. Histone Variants and Their Post-Translational Modifications in Primary Human Fat Cells. **PLoS ONE**. v. 6, n. 1, 2011.

KEMP, L. E.; YAMAMOTO, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 4, p. 607–631, 2013.

KHAMINETS, A. et al. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol**. n.12, p. 939–961, 2010.

LANGONI, H. *et al.* Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. **Braz J Microbiol,** v. 44, n. 4, p. 1327-1330, 2014.

LEI, T. et al. ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.

LEINEWEBER, M., SPEKKER-BOSKER, K., INCE, V., SCHARES, G., HEMPHILL, A., ELLER, S. K., DÄUBENER, W. First Characterization of the *Neospora caninum* Dense Granule Protein GRA9. **BioMed Research International**, *2017*.

LEMGRUBER, L. *et al.* New details on the fine structure of the rhoptry of *Toxoplasma gondii.* **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 9, p. 812–818, 2011.

LI, M., et al. The apoptotic role of metacaspase in *Toxoplasma gondii*. Front. **Microbiol**. 6, 2016.

LIM, D.C. et al. *Toxoplasma* and *Plasmodium* protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling. **International Journal for Parasitology**. v. 42, p. 21–32, 2012.

MA, L. *et al.* Q. Rhoptry protein 5 (ROP5) Is a Key Virulence Factor in *Neospora caninum*. **Frontiers in Microbiology**. 8:370, 2017.

MA, L. *et al*. A ROP16 de *Neospora caninum* desempenha um papel importante na patogenicidade por fosforilação da célula hospedeira STAT3. **Parasitologia veterinária,** n. 243 , p. 135-147, 2017.

MACÊDO, A. G. *et al*. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both

innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 163, 2013.

MARK, A.; CHEADLE, J.R A. S.; BYRON, L. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Nondomestic Felids from Southern Africa. Blagburn Source. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** , v. 30, n. 2, jun, p. 248-251, 1999.

MARQUES, A. C., TAN, J., LEE, S., KONG, L., HEGER, A., PONTING, C. P. Evidence for conserved post-transcriptional roles of unitary pseudogenes and for frequent bifunctionality of mRNAs. **Genome Biol**. v. 13, 2012.

MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V. *et al*. Identification of novel rhoptry proteins in *Neospora caninum* by LC/MS-MS analysis of subcellular fractions. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 5, p. 629–42, 2011.

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

MOLESTINA, R. E.; SINAI, A. P. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 24, p. 5785–96, 2005.

MOLESTINA, R. E.; SINAI, A. P. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host IkappaBalpha. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 3, p. 351–62, 2005b.

MONNEY, T.; DEBACHE, K.; HEMPHILL, A. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. **Animals**, v. 1, n. 4, p. 306–325, 2011.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004.

NATALIE, A. *et al.* Plasmodium rhoptry proteins: why order is important, **Trends in Parasitology,** v. 29, n. 5, p. 228-236, 2013.

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

NISHIKAWA, Y. *et al.* Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 51–58, 2000.

NISHIKAWA, Y. *et al*. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of Neospora infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3987–3991, 2001.

ONG, Y. C.; REESE, M. L.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* Rhoptry Protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28731–28740, 2010.

PARMLEY, S. F. *et al.* Expression, characterization, and serologic reactivity of

recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1127–1133, 1992.

PASTOR-FERNÁNDEZ, I. A. et al. Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle. **Parasitology**, p. 97–113, 2015.

PASTOR-FERNÁNDEZ, I. et al. Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle. **Parasitology**. v. 143, n.1, p. 97-113, 2016.

PEIXOTO, L. *et al*. Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. **Cell Host Microbe**, v. 8, p. 208-218, 2010.

PEREIRA, L. M.; BARONI, L.; YATSUDA, A. P. Experimental Parasitology A transgenic *Neospora caninum* strain based on mutations of the dihydrofolate reductase - thymidylate synthase gene. **Experimental Parasitology**, v. 138, p. 40–47, 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(8), p.399404, 2003

PODLAHA O.; ZHANG, J. Pseudogenes and their evolution. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons; p. 1–8, 2010.

POLLO-OLIVEIRA, L. et al. 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. 335, 2013.

PUNTA, M. *et al.* The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. D290-301, 2012

RAIMUNDO, J. M., et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Tocantins: serology and associated factors. **Rev Bras Parasitol Vet,** v.24, n.4, p. 475-481, 2015.

RAMOS, I.A.S., SILVA, R.J., MACIEL, T.A., SILVA, J.A.B.A., FIDELIS, O.L., SOARES, P.C., et al. Assessment of transplacental transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle in the Agreste region of Pernambuco. Rev Bras Parasitol Vet 2016; 25(4): 516-522.

RAVINDRAN, S., BOOTHROYD, J. C. Secretion of Proteins into Host Cells by Apicomplexan Parasites. **Traffic**. v.9, p. 647–656, 2008.

REESE, M. L.; BOOTHROYD, J. C. A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole. **Traffic**, v. 10, n. 10, p. 1458–1470, 2009.

REESE, M. L.; SHAH; BOOTHROYD, J. C. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 is an allosteric inhibitor of the immunity-related GTPases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 40, p. 27849–27858, 2014.

REGIDOR-CERRILLO, J. *et al.* Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 8, p. 2306–2318, 2012.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 308–312, 2007.

REID, A. J. *et al.* Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002567, 2012.

RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 12, p. 701–710, 2006.

ROCCHI, M. S. *et al.* Selection of *Neospora caninum* antigens stimulating bovine CD4+ve T cell responses through immuno-potency screening and proteomic approaches. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 91, 2011.

SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Vet Parasitol**, v. 80, p. 87–98, 1998.

SICUPIRA, P. M. L. *et al.* Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 185, n. 2-4, p. 305-308, 2012.

SHEN, B. *et al.* Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. MBIO 5, e1114, 2014.

SOARES, H. S. *et al.* Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wild pigs (Sus scrofa) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz J Vet Res Anim Sci,** v. 53, n. 1, p. 112-116, 2016.

SOHN, C. S. et al. Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1-12, 2011.

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

SNAK, A. *et al. Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 51-59, Mar., 2018.

STEINFELDT, T. et al.. Phosphorylation of mouse immunity-related gtpase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS Biology**, v. 8, n. 12, 2010.

TAKASHIMA, Y. et al. Prevalence and dynamics of antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 antigens of *Neospora caninum* in cattle during the gestation period. J**. Vet. Med. Sci.** v. 75, p.1413–1418, 2013.

TALEVICH, E.; KANNAN, N. Structural and evolutionary adaptation of rhoptry kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 117, 2013.

TALEVICH, E.; MIRZA, A.; KANNAN, N. Structural and evolutionary divergence of eukaryotic protein kinases in Apicomplexa. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 321, 2011.

TIRICHINE, L. *et al*. Marine Genomics Histone extraction protocol from the two model diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. v. 13, p. 21–25, 2014.

TRELLE, M. B. *et al.* Global Histone Analysis by Mass Spectrometry Reveals a High Content of Acetylated Lysine Residues in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* research articles. p. 3439–3450, 2009.

WALLACH, M. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 382–387, 2010.

WALZER,K. A. *et al.* Hammondia hammondi, an avirulent relative of *Toxoplasma gondii*, has functional orthologs of known *T. gondii* virulence genes. **Proc. Natl. Acad. Sci**. U.S.A., v. 110, p. 7446–7451, 2013.

WILLIAMS, M.J. Two essential light chains regulate the MyoA lever arm to promote *Toxoplasma* gliding motility. **mBio, v.** 6, p. e815–e845, 2015.

ZHANG, Z.D.,et al. Identification and analysis of unitary pseudogenes: historic and contemporary gene losses in humans and other primates. **Genome Biol**, 2010.

ZHANG, K. *et al*. ScienceDirect Comparative analysis of histone H3 and H4 post-translational modifications of esophageal squamous cell carcinoma with different invasive capabilities. **Journal of Proteomics**, v. 112, p. 180–189, 2014.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização molecular de proteínas de roptrias (ROP15B e/ou ROP55) de Neospora caninum", registrada sob nº 16.1.447.60.6, sob a responsabilidade Julia Audrey de Paula e Ana Patrícia Yatsuda Natsui, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) , e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) em reunião de 30/06/2016.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	18/08/2016 a 18/12/2017
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo heterogênico Balb/C
Nº de animais	12
Peso/Idade	20 - 30g / 6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 19 de junho de 2016.

Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
Vice-coordenadora da CEUA

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892