**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *Neospora
caninum***

Luciana Baroni

**Ribeirão Preto
2012**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *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: Luciana Baroni

Orientadora: Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 22/10/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

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

Baroni, Luciana

Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *Neospora caninum*, 2012.

73p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Yatsuda, Ana Patrícia

1. *Neospora caninum*. 2. Apicomplexa. 3. Actina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Luciana Baroni

Título: Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *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: Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais,
Arnaldo e Neide,
e ao meu irmão, Leandro,
pelo grande incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui pela excelente orientação, pela confiança, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pelo incentivo.

À Profa. Dra. Maria Cristina Nonato e ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura pelas valiosas dicas que engrandeceram este trabalho.

Aos docentes do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia pelos ensinamentos durante as disciplinas.

Ao Maarten Altelaar, Ph.D e Albert Heck, Ph.D do *Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics Group* da Universidade de Utrecht pelas análises de espectrometria de massas.

À funcionária técnica do laboratório de Parasitologia Molecular da FCFRP-USP Maraísa Palhão Verri por todo o auxílio e por levar tanta alegria ao laboratório.

Ao Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP pelo uso da ultracentrífuga e, principalmente, às funcionárias técnicas Ana Cristina Morseli Polizello, Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini e Ieda Maria Razaboni Prado pelo auxílio.

À colega e doutoranda Letícia Pollo de Oliveira pela gentileza de analisar as amostras de espectrometria de massas e, principalmente, pelo apoio e amizade dentro e fora do laboratório.

Ao colega e doutorando Luiz Miguel Pereira (o Buda) pela valiosa ferramenta pGEM/pET e pelos inúmeros auxílios durante a execução do trabalho, além dos momentos de descontração e amizade.

À colega Aline Bononi (iniciação científica) pela espontaneidade e pelos momentos divertidos no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

À amiga Ana Beatriz Barbosa dos Santos por todos esses anos de amizade e, principalmente, pela companhia durante o período de mestrado.

À todas as pessoas que fizeram parte da minha vida e, de alguma maneira, colaboraram para esse trabalho.

Meu mais profundo agradecimento.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Ciclo de vida	2
1.2 O ciclo de invasão dos Apicomplexas	3
1.2.1 O modelo de motilidade por deslizamento dos Apicomplexas	4
1.3 Actina	6
1.3.1 Actina nos parasitas Apicomplexas	8
1.3.2 Drogas com interferências na dinâmica da actina	9
1.3.3 Actina em <i>Neospora caninum</i> e justificativa	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Gerais	11
2.2 Específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Manutenção do Parasita: cultura <i>in vitro</i> e purificação dos taquizoítas de <i>N. caninum</i>	12
3.2 Seleção e análise da sequência NcAct	12
3.3 Clonagem	13
3.3.1 Delineamento de oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	14
3.3.2 Clonagem da sequência NcAct-base	14
3.3.2.1 Isolamento do RNA total	14
3.3.2.2 Síntese de cDNA	15
3.3.2.3 Reação de Polimerase em cadeia (PCR)	15
3.3.2.4 Ligação em vetor de clonagem e transformação em célula eletrocompetente	16
3.3.3 Clonagem da sequência Ncct ₂₀₁₋₃₁₀	16
3.3.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)	16
3.3.3.2 Ligação em vetor de clonagem e transformação em células eletrocompetentes	17
3.3.3.3 Obtenção da sequência NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ e do plasmídeo de Expressão	17
3.3.3.4 Reação de ligação do vetor expressão com a sequência NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	18
3.3.4 Purificação dos plasmídeos (minipreps)	19
3.3.5 Eletroforese em gel de agarose	20
3.3.6 Purificação em gel de agarose	20
3.3.7 Preparação de células eletrocompetentes	21
3.3.8 Transformação em cepas de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	21
3.4 Expressão, análise e purificação da proteína recombinante His-NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	22

3.4.1 Extração total	22
3.4.2 Extração solúvel e insolúvel da proteína His-NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ recombinante.....	23
3.4.3 Purificação da proteína His-NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ em resina de níquel.....	23
3.5 Extratos proteico totais com estabilização de actina de <i>N. caninum</i> e Vero.....	24
3.6 Imunofluorescência	24
3.7 Eletroforese em gel de acrilamida	25
3.7.1 Eletroforese unidimensional	25
3.7.2 Eletroforese bidimensional	26
3.7.2.1 Primeira dimensão ou focalização isoelétrica.....	26
3.7.2.2 Segunda dimensão	27
3.8 Coloração dos géis de acrilamida por coomassie blue	28
3.9 Captação de imagens.....	28
3.10 <i>Western blot</i>	28
3.11 Espectrometria de massas (RP-nanoLC-MS/MS)	29
3.12 Fracionamento da actina-G e actina-F	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Procura por actina em <i>Neospora caninum</i>	32
4.2 Análise <i>in silico</i> da sequência completa de NcAct.....	33
4.3 Clonagem e expressão.....	35
4.3.1 Clonagem do fragmento NcAct-base	36
4.3.2 Clonagem do fragmento NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	37
4.3.3 Expressão heteróloga do fragmento NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	40
4.4 Caracterização da actina nativa de <i>N. caninum</i> (NcAct) por Western Blot e SDS-PAGE.....	42
4.4.1 SDS-PAGE e <i>Western blot</i> 1D	42
4.4.2 SDS-PAGE e <i>Western blot</i> 2D	43
4.4.3 Espectrometria de massas	45
4.5 Imunofluorescência	50
4.6 Fracionamento da actina-G e actina-F	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

BARONI, L. **Caracterização molecular da actina do Apicomplexa *Neospora caninum***. 2012. 73f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa que atinge, dentre diversos hospedeiros intermediários, principalmente bovinos e tem emergido como um importante causador de problemas reprodutivos e abortos em rebanhos de corte e leiteiro. Organismos do filo Apicomplexa são parasitas intracelulares obrigatórios que, para locomoverem-se e realizarem a invasão das células hospedeiras, utilizam um mecanismo próprio de locomoção ativa impulsionada pelo motor actina/miosina denominado motilidade por deslizamento (*gliding motility*), cujo complexo motor localiza-se entre a membrana plasmática e o complexo de membrana interno do parasita. A investigação a respeito do funcionamento desse mecanismo de locomoção e invasão vem sendo realizada principalmente em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp., entretanto não há nenhuma publicação envolvendo actina em *N. caninum*. Esse trabalho envolveu a clonagem e expressão da sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀ e deu início a caracterização da actina de *N. caninum* (NcAct). A sequência NcAct foi obtida em banco de dados ToxoDB, e uma comparação por alinhamento entre as actinas de Apicomplexas relacionados revelou que NcAct é idêntica à TgACT1 (100% identidade). Com outras espécies, a NcAct tem maior identidade/similaridade com a actina de *Eimeria tenella* (97%/99%), seguida da actina de *Plasmodium falciparum* PfACT1 (93%/97%), da actina de *Babesia bovis* (86%/94%) e PfACT2 (80%/92%). Quando localizada com anticorpo anti- β -actina C4, NcAct apresenta-se em duas bandas de 43 e 45 kDa em gel de acrilamida 1D e em nove isoformas em gel de acrilamida 2D. Todas as identidades das bandas e spots foram confirmados por espectrometria de massas (MS/MS). Além disso, NcAct localiza-se, em sua maioria, na região periférica do taquizoíta de *N. caninum* e sua distribuição é alterada após incubação dos taquizoítas com 5 μ M de jasplakinolida (JAS) ou 2 μ M de citocalasina D (CytD). Por fim, por meio de ensaio de fracionamento de actina monomérica (actina-G) e filamentosa (actina-F), demonstramos que a JAS é capaz de aumentar a quantidade de actina-F em taquizoítas de *N. caninum*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, Apicomplexa, actina

ABSTRACT

BARONI, L. **Molecular characterization of the actin from the Apicomplexan *Neospora caninum***. 2012. 73f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Neospora caninum is an Apicomplexan protozoan that infects, among a whole range of intermediate hosts, bovine where it is emerging as a relevant cause of reproductive problems and abortion in dairy and beef cattle. As obligatory intracellular organisms, parasites from Apicomplexa Phylum use their own active locomotion system to move and invade host cells. This mechanism is driven by the actin/myosin motor known as gliding motility, localized between the plasma and the inner membrane complex. Studies involving this locomotion and invasion system have been conducted mainly in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. To our knowledge there is no publication involving actin in *N. caninum*, so this work was outlined and involved the cloning and expression of the sequence NcAct₂₀₁₋₃₁₀, initiating the characterization of actin of *N. caninum* (NcAct). The sequence NcAct was obtained from the Database ToxoDB, and a comparison of actins from Apicomplexa-related revealed total identity of NcAct with TgACT1 (100% identity). With other species, NcAct has higher identity/similarity with *Eimeria tenella* actin (97%/99%), followed by *Plasmodium falciparum* actin PfACT1 (93%/97%), *Babesia bovis* actin (86%/94%) and PfACT2 (80%/92%). When localized with the antibody anti- β -actin C4, NcAct is presented as two bands of 43 and 45 kDa in 1D acrylamide gel and as nine isoforms in 2D acrylamide gel. All these findings were confirmed by mass spectrometry (MS/MS). Moreover, NcAct localizes predominantly in the peripheric region of *N. caninum* tachyzoites. This distribution is altered after incubation of the tachyzoites with 5 μ M of jasplakinolide (JAS) or 2 μ M of cytochalasin D (CytD). Finally through fractionating assay of monomeric (actin-G) and filamentous (actin-F), we demonstrated that JAS is capable of increasing the quantity of actin-F in *N. caninum* tachyzoites.

Keywords: *Neospora caninum*, Apicomplexa, actin

RESUMEN

BARONI, L. **Caracterización molecular de la actina del Apicomplexa *Neospora caninum***. 2012. 73f. Disertación (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Neospora caninum es un parásito protozoo perteneciente al phylum Apicomplexa que afecta, entre los hospedadores intermedios, principalmente bovinos y se ha convertido en una causa importante de problemas de aborto y reproductivos en ganado vacuno lechero y de corte. Como organismos intracelulares obligados, los parásitos del phylum Apicomplexa utilizan su propio sistema de locomoción activa para moverse e invadir las células huésped. Este mecanismo, accionado por el motor de actina / miosina, es conocido como motilidad de deslizamiento (*gliding motility*), y está situado entre la membrana plasmática y el complejo de membrana interna de los organismos. La investigación sobre el funcionamiento de este mecanismo de locomoción y la invasión se ha realizado principalmente en *Toxoplasma gondii* y especies de *Plasmodium*, aunque no existe una publicación que implique la actina en *N. caninum*. Este trabajo implicó la clonación y expresión de la NcAct₂₀₁₋₃₁₀ y se inició la caracterización de actina de *N. caninum* (NcAct). La secuencia NcAct se obtuvo de la base de datos ToxoDB, y la comparación por alineación de las actinas de Apicomplexas relacionados reveló que NcAct es idéntica a TgACT1 (100% de identidad). Con otras especies, es mayor identidad / similitud de NcAct con la actina *Eimeria tenella* (97% / 99%), seguido de actina PfACT1 *Plasmodium falciparum* (93% / 97%), actina de *Babesia bovis* (86% / 94 %) y PfACT2 (80% / 92%). Cuando se localiza con anticuerpo anti- β -actina C4, NcAct se presenta en dos bandas de 43 y 45 kDa en gel de acrilamida 1D y en nueve isoformas en gel de acrilamida 2D. Todas las identidades de las bandas y spots fueron confirmados por espectrometría de masas (MS / MS). Además, NcAct se encuentra principalmente en la región periférica de taquizoitos de *N. caninum* y su distribución se altera después de la incubación de taquizoitos con 5 mM de jasplakinolida (JAS) o 2 mM de citocalasina D (CytD). Finalmente, por ensayo de fraccionamiento de actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina), hemos demostrado que JAS es capaz de aumentar la cantidad de F-actina en taquizoitos de *N. caninum*.

Palavras chave: *Neospora caninum*, Apicomplexa, actina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia das formas taquizoíta e merozoíta dos parasitas Apicomplexas <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> , respectivamente	3
Figura 2. Modelo do sistema motor responsável pela motilidade por deslizamento em Apicomplexas	6
Figura 3. Mapa do plasmídeo pGEM® - T easy, da Promega.....	13
Figura 4. Alinhamento das sequências proteicas da actina de diversos Apicomplexas	33
Figura 5. Alinhamento das sequências proteicas da actina de <i>N. caninum</i> e β -actina de <i>Cercopithecus aethiops</i> (Célula Vero)	34
Figura 6. Representação da localização dos <i>primers</i> delineados para clonagem de NcAct.....	35
Figura 7. Amplificação por PCR do fragmento NcAct-base.....	36
Figura 8. Amplificação por PCR do fragmento NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	38
Figura 9. Digestão do plasmídeo pGEM® - T Easy com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III após ligação com o fragmento NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	38
Figura 10. Digestão do plasmídeo pGEM/pET recombinante	39
Figura 11. Expressão das proteínas recombinantes NcAct ₂₀₁₋₃₁₀ com variação na concentração de IPTG	41
Figura 12. Purificação da proteína recombinantes NcAct ₂₀₁₋₃₁₀	41
Figura 13. Localização da actina nativa de <i>N. caninum</i> (NcAct) a partir de eletroforese em gel de acrilamida e <i>western blot</i> 1D.....	42
Figura 14. Localização da actina nativa de <i>N. caninum</i> (NcAct) em a partir de eletroforese em gel de acrilamida e <i>western blot</i> 2D.....	44
Figura 15. <i>Spots</i> e bandas excisados dos géis de acrilamida 1D e 2D para análise em espectrometria de massas	46
Figura 16. Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de <i>N. caninum</i> em RPMI 1640	51
Figura 17. Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de <i>N. caninum</i> tratados com DMSO 1%	52

Figura 18. Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de <i>N. caninum</i> tratados com 5 μ M de jasplakinolida	53
Figura 19. Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de <i>N. caninum</i> tratados com 2 μ M de citocalasina D	54
Figura 20. Ensaio de fracionamento da actina em suas formas monomérica (actina-G) e filamentosa (actina-F) por ultracentrifugação	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>NcAct</i>	14
Tabela 2. Reações de digestão com <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.....	17
Tabela 3. Reação de digestão do plasmídeo pGEM/pET após a ligação com a sequência de interesse	19
Tabela 4. Condições utilizadas para a focalização isoeletrica das tiras de 7 cm 3-11 NL em equipamento <i>Ettan</i> IPGPhor 3.....	27
Tabela 5. Resultado da busca por actinas de <i>N. caninum</i> no banco de dados ToxoDB	32
Tabela 6. Comparação entre as sequencias de actina encontradas em busca no ToxoDB	32
Tabela 7. Comparação entre as sequencias de actina em Apicomplexas	34
Tabela 8. Identificação dos <i>spots</i> e bandas por espectrometria de massas (MS/MS)	47
Tabela 9. Peptídeos obtidos na identificação por espectrometria de massas (MS/MS) dos <i>spots</i> excisados do gel de acrilamida 2D contendo extrato de <i>N. caninum</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Uma Dimensão
2D	Duas Dimensões
ABP	Proteína que se liga à actina
ACN	Acetonitrila
ADF	Fator de Despolimerização de Actina
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Albumina de Soro Bovino
Cc	Concentração Crítica
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CytD	Citocalasina D
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
GAP	Proteína Deslizante Associada
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IgG₁	Imunoglobulina G subclasse 1
IMC	Complexo de Membrana Interno
IP	Iodeto de Propídeo
IPTG	Isopropil Tiogalactopiranosida
JAS	Jasplakinolida
LB	Meio Luria-Bertani
MIC	Proteína Micronêmica
MLC	Miosina de Cadeia Leve
MyoA	Miosina de Classe XIV
NcAct	Actina de <i>Neospora caninum</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
pI	Ponto isoelétrico
PIPES	Ácido 1,4-piperazinadietilsulfônico
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	<i>Royal Park Memorial Institute</i>
SAG	Antígeno de Superfície
SD	Subdomínio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Acrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
T_m	Temperatura de Anelamento
TRAP	Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Região não Traduzida

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, que foi reconhecido pela primeira vez em 1984 como protozoários encistados em cães com problemas neurológicos (BJERKÅS et al., 1984). Em 1988, DUBEY e colaboradores descreveram esse protozoário, que até então era diagnosticado como *Toxoplasma gondii*, como novo gênero e espécie (DUBEY et al., 1988b). Em 2002, *N. caninum* foi redescrito, sendo diferenciado de outras espécies de coccídios (DUBEY et al., 2002). Desde sua descrição, *N. caninum* tem emergido como um importante causador de aborto em bovinos (DUBEY & LINDSAY, 1996) e por apresentar uma eficiente transmissão transplacentária (DUBEY, 2003).

As perdas econômicas decorrentes da infecção do gado por *N. caninum* estão relacionadas aos custos atribuídos aos fetos perdidos, assim como despesas com ajuda profissional e diagnóstico (DUBEY, 2003). Em todos os casos sintomáticos há prejuízos na criação bovina, representadas por retorno ao ciclo estral, aumento do intervalo entre crias, diminuição da produção de leite e desvalorização reprodutiva do rebanho (TREES et al, 1999).

N. caninum já foi detectado em várias espécies de animais (DUBEY, 2003; GONDIM et al., 2004a). No Brasil, o primeiro isolamento do parasita foi feito em 2001, a partir do tecido cerebral de cães (GONDIM et al., 2001). Estudos têm demonstrado soropositividade do gado bovino em vários estados brasileiros como Mato Grosso do Sul (OSHIRO et al., 2007), Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al, 2002; VOGEL et al, 2006), Pará (MINERVINO et al., 2008), Rio de Janeiro (MUNHOZ et al., 2006), Rondônia (AGUIAR et al., 2006), Goiás (MELO et al., 2006), Paraná (GUIMARÃES et al., 2004) e São Paulo (SARTOR et al., 2005). Além disso, anticorpos anti-*N. caninum* já foram descritos, no Brasil, em ovinos (FIGLIULO et al., 2004; ROMANELLI et al., 2007; SOARES et al., 2009; SALABERRY et al., 2010; UENO et al., 2009; MORAES et al., 2012; ROSSI et al., 2011), caprinos (MORAES et al., 2012), cães (FERNANDES et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008; GENNARI et al., 2001; BRUHN et al., 2012), capivaras (YA et al., 2008), veado-dos-pampas (TIEMANN et al., 2005), búfalos d'água (RODRIGUES et al., 2004, 2005), pardais (GONDIM et al., 2010), gatos (BRAGA et al., 2012).

1.1 O ciclo de vida

O ciclo de vida do *N. caninum* é heteroxênico, apresentando como hospedeiros definitivos cães (*Canis familiaris*), coiotes (*Canis latrans*) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2004b), dingos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobos cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011), enquanto que bovinos e uma ampla variedade de animais de sangue quente representam os hospedeiros intermediários (DUBEY, 2006).

Três estágios infectantes compõem o ciclo de vida do parasita: taquizoítas, cistos teciduais e oocistos (DUBEY, 2003). Taquizoítas e cistos teciduais são encontrados de forma intracelular em hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2002). Os oocistos não esporulados são eliminados através das fezes dos hospedeiros definitivos (LINDSAY et al., 1999) e esporulam fora do organismo do hospedeiro (DUBEY, 2003). A ingestão desses oocistos esporulados no ambiente é a única forma descrita de transmissão pós-natal para o gado (McCANN et al., 2007), significando, portanto, que a proximidade entre cães e bovinos representa uma rota de transmissão horizontal do parasita (PIAGENTINI et al., 2012).

A transmissão vertical entre a fêmea e o feto também representa uma importante rota de transmissão de *N. caninum* no gado (ou hospedeiros intermediários), uma vez que se caracteriza pela maior causa de aborto tanto no gado leiteiro quanto de corte (DUBEY & SCHARES, 2011), além de representar um importante meio de propagação da doença por sucessivas gerações (DUBEY et al., 2006). Esse tipo de transmissão pode ocorrer quando os parasitas, presentes nos tecidos maternos, são reativados e invadem os tecidos placentários e fetais (OROZOCO et al., 2012). Os fetos podem morrer no útero, ser reabsorvidos, mumificados, autolizados, nascer mortos, nascer vivos com sinais clínicos ou nascer clinicamente normal, porém infectados (DUBEY 2003).

Os hospedeiros definitivos podem infectar-se a partir da ingestão de material plascentário ou de tecidos contendo bradizoítas provenientes de animais infectados (GONDIM et al., 2002; DJIKSTRA et al., 2002, LINDSAY et al., 1998).

1.2 O ciclo de invasão dos Apicomplexas

O filo Apicomplexa compreende, além de *N. caninum*, alguns dos mais importantes patógenos de interesse médico e veterinário, sendo os do gênero *Plasmodium* o mais devastador de todos. Há diversos outros representantes, como *Theileria spp.*, *Babesia spp* e parasitas oportunistas humanos como *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum*.

Membros desse filo são caracterizados pela presença de um complexo apical pronunciado composto por um anel polar, organelas secretórias especializadas denominadas roptrias e micronemas e, em algumas espécies, o conóide (figura 1).

Figura 1 – **Morfologia das formas taquizoíta e merozoíta dos parasitas Apicomplexas *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*, respectivamente** (adaptado de Baum et al., 2006). Representação das principais estruturas e organelas responsáveis pela funcionalidade e morfologia características dos taquizoítas de *Toxoplasma gondii* e merozoítas de *Plasmodium falciparum*.

A secreção sequencial de proteínas presentes nas organelas secretórias localizadas na região apical é responsável pela interação inicial, penetração e sobrevivência do parasita na célula infectada (KAFFSAK et al., 2007; PLATTNER & SOLDATI-FAVRE, 2008; SIBLEY, 2004).

Ao detectar a célula alvo, o parasita realiza uma interação inicial de baixa afinidade com a superfície da célula hospedeira, intermediada por proteínas de

superfície SAGs (*anchored surface antigens - GPI*) (DZIERSZINSKI et al, 2000). Concluída a interação inicial, ocorre a secreção das proteínas das micronemas (MICs), proteínas transmembrana, as quais realizam ligações de alta afinidade de moléculas do hospedeiro com o motor actina/miosina do parasita (BILLKER et al., 2009; CARRUTHERS & TOMLEY, 2008). As MICs acumulam-se na região apical, de maneira a promover a polarização do parasita (CARRUTHERS & BOOTHROYD, 2007). As proteínas das roptrias são liberadas em seguida e formam um complexo estável com as MICs, localizado na membrana do parasita, resultando na junção de movimento (MJ), cuja atividade leva à formação do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS & BOOTHROYD, 2007), dentro do qual o parasita pode replicar-se em segurança (FRÉNAL & SOLDATI-FAVRE, 2009). Para completar o processo invasivo, as proteases rombóides clivam as proteínas micronêmicas, desprendendo o parasita do MJ para dentro do vacúolo parasitóforo (BROSSIER et al., 2005).

1.2.1 O modelo de motilidade por deslizamento dos Apicomplexas

Apicomplexas são parasitas intracelulares obrigatórios capazes de invadir variados tipos de células, porém não dispõem de mecanismos clássicos de invasão e deslocamento de outras células eucarióticas como flagelos, cílios ou pseudópodes. Por esse motivo, não é adequado utilizar modelos de motilidade regulados por actina de outros organismos para explicar o movimento desses parasitas.

Para que possam realizar a migração tecidual e invasão celular, os organismos Apicomplexas utilizam um mecanismo próprio que é ativo e dependente do substrato (KING, 1988) denominado motilidade por deslizamento (*gliding motility*) (FRÉNAL et al., 2010), que é conservado no filo, já tendo sido descrito em taquizoítas de *T. gondii* (HÅKANSSON et al., 1999), esporozoítas de *Cryptosporidium* spp. (WETZEL et al., 2005), esporozoítas de *Plasmodium* spp. (VANDELBERG, 1974), esporozoítas de *Eimeria* (RUSSEL & SIDEN, 1981), merozoítas de *Babesia bovis* (ASADA et al., 2012) e Gregarinas (KING, 1981). O funcionamento desse mecanismo é controlado pela actina do parasita (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996; WETZEL et al., 2003) e também do hospedeiro (GONZALEZ et al., 2009), durante o processo de entrada do parasita na célula.

Para atravessar a membrana plasmática da célula hospedeira e ter acesso aos seus recursos intracelulares ou realizar a motilidade por deslizamento, o estágio infectante do parasita Apicomplexa é impulsionado ativamente por um motor de

actina/miosina coordenado por uma maquinaria proteica denominada “*glideosome*” (OPITZ & SOLDATI, 2002).

O *glideosome* é constituído por um sistema motor (figura 2) amparado entre a membrana plasmática e o complexo de membrana interno (*inner membrane complex* - *IMC*) do parasita (CARRUTHERS & BOOTHROYD, 2007) que se localiza subjacente à membrana plasmática e é formado por inúmeras vesículas achatadas (MORISSETE & SIBLEY, 2002).

A força motora para o movimento de deslizamento (esquema representado na figura 2) é gerada pela miosina A (MyoA – miosina de classe XIV) (KELLEY & SOLDATI, 2004; PINDER et al., 1998), emparelhada com a miosina de cadeia leve (*myosin light chain* – *MLC*) e inserida no complexo de membrana interno (BERGMAN et al., 2002) por duas proteínas associadas ao deslizamento (*gliding-associated proteins* – *GAPs*), GAP45 e GAP50 (GASKINS et al., 2004). Em 2010, Frénal et al. Identificou a proteína GAP40, cuja função ainda não está totalmente elucidada. O movimento é gerado pela interação dinâmica de MyoA sobre os microfilamentos de actina (actina-F) (BULLEN et al., 2009), que são formados por polimerização da actina monomérica (actina-G) durante o deslizamento (WETZEL et al., 2003). Os microfilamentos de actina estão associados à membrana plasmática da célula hospedeira através da ligação via aldolase (JEWETT & SIBLEY, 2003; SATARNES et al., 2009) ao domínio citosólico de proteínas micronêmicas como a TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) (MORAHAN et al., 2009). Dessa maneira, é possível resumir a cadeia de interações do sistema motor responsável pela motilidade por deslizamento como: TRAP-aldolase-actina-MyoA-MLC-GAP45-GAP50 (BAUM et al., 2005).

Figura 2 – **Modelo do sistema motor responsável pela motilidade por deslizamento em Apicomplexos** (adaptado de Carruther & Boothroyd, 2007). Proteínas micronêmicas transmembrana ligam-se ao receptor da célula hospedeira e à actina-F através da aldolase, dando base para o impulso do motor actina/miosina. A miosina A (MyoA), inserida no complexo de membrana interno (IMC) pelas proteínas associadas ao deslizamento (GAP45/50), interage dinamicamente com a actina-F, resultando na movimentação do parasita.

1.3 Actina

Actina é uma das proteínas mais abundantes em células eucarióticas (POLLARD & BORISY, 2003) e sua estrutura é altamente conservada entre as espécies. Descoberta em 1942 (STRAUB, 1942), essa proteína intracelular apresenta diversas funções vitais em processos celulares como suporte mecânico à célula, formação de vesículas, geração de força contrátil, locomoção, divisão celular e regulação da expressão gênica (BUNNEL & ERVASTI, 2011; POLLARD et al., 2000; ROTTNAR & STRADAL, 2011; SCHOENENBERGER et al., 2011; VISA & PERCIPALLE, 2010).

A molécula de actina (actina-G ou actina monomérica) é composta de uma única cadeia de peptídeos dividida em dois domínios separados por uma fenda que abriga um sítio de ligação de pequenas moléculas como nucleotídeos e cada domínio. Cada domínio é subdividido em dois subdomínios (SD), resultando em SD1 a SD4 (SCHOENENBERGER et al., 2011).

Actina também pode ser encontrada em sua forma filamentosa (actina-F), formada pela polimerização dos monômeros de actina. Filamentos de actina são polímeros em dupla hélice arranjados de forma polarizada com duas extremidades

funcionalmente distintas (POLLARD & BORISY, 2003). Uma das extremidades é chamada de “mais” ou “farpada” (*barbed*) e a outra é a extremidade “menos” ou “pontuda” (*pointed*), as quais são associadas com a polimerização e despolimerização do filamento de actina, respectivamente (POLLARD & BORISY, 2003).

O processo de polimerização da actina envolve a hidrólise irreversível de ATP (WEGNER, 1973) e ocorre a partir da adição de ATP-actina na extremidade “mais” do filamento. Com o passar do tempo, o ATP é hidrolisado, liberando o fosfato, o que resulta na remoção da ADP-actina na extremidade “menos” (DOMINGUEZ & HOLMEZ, 2011; POLLARD & BORISY, 2003). A habilidade dos monômeros de actina de polimerizarem-se espontaneamente em filamentos depende da concentração crítica (C_c) de actina-G, ou seja, da quantidade de actina monomérica presente em estado estacionário na solução (THERIOT, 1994). E a C_c em várias espécies, determinada *in vitro* em condições fisiológicas, é de aproximadamente 0,1 e 0,6 μM nas extremidades “mais” e “menos”, respectivamente (POLLARD, 1986).

Sozinho, esse processo envolvendo hidrólise de ATP, denominado *treadmilling* (WEGNER, 1973), não é suficiente para regular dinâmica da actina na da célula. Para tal, um arsenal de proteínas coletivamente denominadas ABPs (*actin-binding proteins*) liga-se à actina e muitas delas modulam a dinâmica de montagem e desmontagem dos filamentos (POLLARD, 2003). Em 2003, DOS REMEDIOS e colaboradores classificaram e reduziram essas ABPs em sete grupos: 1) Proteínas que se ligam e sequestram monômeros de actina, prevenindo sua polimerização (ex. timosina α_4 e DNase I). 2) Proteínas que levam à despolimerização da actina-F (ex. CapZ e cofilina). 3) Proteínas que se ligam às extremidades dos filamentos de actina bloqueando a dinâmica dos monômeros na extremidade “menos” (ex. tropomodulina) e extremidade “mais” (ex. CapZ). 4) Proteínas que clivam a actina-F (ex. gelsolina). 5) Proteínas que facilitam a formação de feixes de actina e redes em três dimensões (ex. Arp2/3). 6) Proteínas que previnem a despolimerização de filamentos (ex. tropomiosina). 7) Proteínas motoras que utilizam a actina-F para tração (ex. miosina).

1.3.1 Actina nos parasitas Apicomplexas

A grande maioria da actina encontrada em Apicomplexas apresenta-se em sua forma monomérica (DOBROWOLSKI et al., 1997; WETZEL et al., 2003). Essa informação, aparentemente, contrasta com o fato de que filamentos de actina dos parasitas Apicomplexas são indispensáveis para o processo de invasão da célula hospedeira e deslocamento do parasita (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996). Tentativas de encontrar filamentos de actina por imunofluorescência indireta ou microscopia eletrônica falharam, pois a actina de organismos do filo Apicomplexa apresenta propriedades bioquímicas atípicas que levam à formação de filamentos curtos e instáveis (FRÉNAL & SOLDATI-FAVRE, 2009; SAHOO et al., 2006; SCHMITZ et al, 2005, 2010; SCHULER & MATUSCHEWSKI, 2005). Quanto à localização, ensaios de imunomicroscopia eletrônica revelaram que, em taquizoítas extracelulares de *T. gondii*, a actina localiza-se mais intensamente logo abaixo da membrana plasmática (DOBROWOLSKI et al., 1997), o que corrobora com o modelo vigente de funcionamento do *glideosome* (FRÉNAL et al., 2010)

A dinâmica ímpar da actina em parasitas Apicomplexas sugere que o *turnover* da actina seja rigorosamente regulado (MEHTA & SIBLEY, 2010).

O processo de regulação do *turnover* da actina é realizado pelas proteínas que se ligam à actina (*actin-binding proteins* - ABP), pouco conservadas em Apicomplexas (MEHTA & SIBLEY, 2010) e presentes em um reduzido repertório (BAUM et al., 2006). Dentre as ABPs já foram encontradas forminas, profilinas, proteínas de capping, coroninas e fatores de despolimerização da actina (*actin-depolymerizing factor* – ADF) (MEHTA & SIBLEY, 2010). A Formina1, encontrada no polo apical de merozoítas de *Plasmodium falciparum*, tem o papel de formação dos filamentos de actina (BAUM, et al., 2008), enquanto que o fator de depolimerização da actina, encontrado em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*, tem a função de sequestrante de monômeros de actina (JENKINS et al, 2010; MEHTA & SIBLEY, 2010; PLATTNER et al, 2008), sendo fundamental para o processo de regulação do *turnover* dos filamentos de actina de *T. gondii* (MEHTA & SIBLEY, 2011). A profilina de *T. gondii* é essencial para a motilidade deslizante, invasão e egresso celular e virulência em camundongos (PLATTNER et al, 2008). Recentemente a profilina de *N. caninum* foi clonada e mostrou-se capaz de induzir em camundongos a produção de IFN-gama e IL-12 (JENKINS et al, 2010).

A habilidade de monômeros de actina reunirem-se espontaneamente em filamentos depende da concentração crítica (Cc) de actina-G, a qual é estimada em 0,03 μM na extremidade “menos” e 0,18 μM na extremidade “mais” da actina recombinante de *T. gondii* (SAHOO et al., 2006), o que corresponde a uma concentração 3-4 vezes menor que a Cc de actina de leveduras ou outros vertebrados (BAUM et al., 2006).

Genes que codificam a actina já foram clonados em vários membros do filo Apicomplexa. Além disso, sabe-se que as actinas de *T. gondii* e *C. parvum* são codificadas por um único gene (DOBROWOLSKI et al., 1997; KIM et al., 1992), enquanto que o *P. falciparum* apresenta dois genes responsáveis pela expressão de actina (WESSELING et al., 1989).

1.3.2 Drogas com interferência na dinâmica da actina

1.4.2.1 Jasplakinolida (JAS)

Jasplakinolida é um peptídeo cíclico presente naturalmente na esponja marinha *Japis johnstoni* e apresenta como efeito sobre a actina a estabilização dos filamentos e indução da polimerização (BUBB et al., 1994; 2000). Estudos realizados para avaliar a ação da jasplakinolida sobre parasitas Apicomplexas demonstraram que o tratamento com JAS induz a polimerização da actina, causando uma protrusão apical proeminente em taquizoítas de *T. gondii* (SHAW & TILNEY, 1999), além disso, a JAS também inibe a invasão celular de *T. gondii* (POUPEL & TARDIEX, 1999; SHAW & TILNEY, 1999; WETZEL et al., 2003), porém leva a um aumento da velocidade da motilidade por deslizamento desse parasita (WETZEL et al., 2003). SAHOO e colaboradores demonstraram, em 2006, que a formação de filamentos de actina de *T. gondii* também pode ser induzida *in vitro*, após o tratamento com JAS. Em *P. falciparum*, o tratamento com jasplakinolida leva a uma inibição da invasão de eritrócitos por merozoítas (MIZUNO et al., 2002).

1.4.2.2 Citocalasina D (CytD)

A citocalasina D é obtida a partir do fungo *Zygosporum mansonii* (SMYTHE et al., 2008) e age desestabilizando os filamentos de actina e impedindo a sua reorganização (SCHLIWA, 1982; COOPER, 1987). Em Apicomplexas, a CytD bloqueia a motilidade de taquizoítas (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996) e esporozoítas de *T. gondii*, assim como de esporozoítas de *C. parvum* (WETZEL et

al., 2005). Essa substância também impede a invasão de taquizoítas de *T. gondii* em células hospedeiras (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996).

1.3.3 Actina em *Neospora caninum* e Justificativa

A actina de *N. caninum* já foi abordada indiretamente em outros trabalhos como o estudo que realizou a sua identificação no mapeamento de géis de eletroforese 2D de taquizoítas (LEE et al., 2003) e na confecção de uma árvore filogenética baseada na diversidade das actinas de diversas espécies (SKILLMAN, et al., 2011). Entretanto, não há descrições que relacionem a importância da actina em processos celulares de *N. caninum* ou que a caracterize diretamente. Desta forma, este estudo foi realizado visando a caracterização inicial de actina em *N. caninum* (NcAct).

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Clonagem, expressão e caracterização da actina do Apicomplexa *N. caninum*.

2.2 Específicos

- 1) Comparação da sequência proteica NcAct com as actinas de Apicomplexas;
- 2) Clonagem e expressão da sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀;
- 3) Detecção da forma nativa de NcAct por *western blot* 1D e 2D associados à espectrometria de massas em extrato com estabilização da actina;
- 4) Localização da NcAct em *N. caninum* por microscopia confocal;
- 5) Avaliação da dinâmica da NcAct pelo uso de drogas que atuam na dinâmica de actinas e visualização por microscopia confocal;
- 6) Fracionamento das actinas monomérica e filamentosa de *N. caninum* tratados ou não com jasplakinolida (JAS).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção do Parasita: cultura *in vitro* e purificação dos taquizoítas de *N. caninum*

Células Vero foram mantidas em garrafas de 25cm² e 75cm² a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) com 2 mM glutamina (Gibco®) contendo 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e kanamicina (10 µg/ml) (Gibco®).

Foram utilizados taquizoítas da cepa NC1 (DUBEY et al., 1988a), gentilmente cedidos pela Prof Dra Solange M. Gennari, da FMVZ, USP. A manutenção dos taquizoítas foi feita em monocamadas de células Vero com meio RPMI 1640 com 2 mM glutamina (Gibco®) com antibiótico kanamicina (10 µg/ml) a 37°C com 5% CO₂.

Os taquizoítas foram purificados após uma semana a partir da inoculação dos taquizoítas em células Vero. As células infectadas aderidas às garrafas foram removidas com o auxílio de um *scraper* e passados por várias vezes através de agulha 26G1/2 para promover a lise das células infectadas. Essa suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 1000 x g, 4°C. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 2,5 ml de PBS e submetido à coluna PD10 (Sephadex G-25, GE *Healthcare*), previamente equilibrada com PBS e o conteúdo eluído foi recolhido em alíquotas de 1 ml em tubos de 1,5 ml, de um total de 8 ml. Os tubos contendo o eluído foram centrifugados (3300 x g, 3 minutos, 4°C) e todos os *pellets* (geralmente presentes nos tubos 4, 5 e 6) foram unidos em um só tubo e ressuspensionados em 0,5 ml de PBS 1x. Os taquizoítas foram contados em câmara de Neubauer.

3.2 Seleção e análise da sequência NcAct

A sequência que corresponde ao gene que codifica a actina de *N. caninum*, NcAct, foi selecionada a partir de uma busca com a palavra-chave “*actin*” (actina) no banco de dados ToxoDB 6.0 (<http://toxodb.org/toxo/>) (GAJRIA et al., 2008). Dentre as opções obtidas a partir da busca, foi selecionada aquela que apresentou maior porcentagem de identidade com a actina de *Toxoplasma gondii* ACT1 (DOBROWOLSKI et al., 1997), acesso TGME49_009030.

A sequência de actina de *N. caninum* selecionada foi alinhada às sequências de actina de Apicomplexas relacionados (*Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Babesia bovis* e *Eimeria tenella*), assim como à β-actina de macaco-

verde (*Cercopithecus aethiops*) (espécie originária das células Vero), utilizando o software MegAlign (LaserGene, DNA Star).

3.3 Clonagem

A clonagem da sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀, fragmento correspondente à região entre os aminoácidos 201 e 310 do gene *NcAct*, visando a sua expressão heteróloga foi realizada em duas etapas. Inicialmente, a sequência NcAct-base, que corresponde ao gene NcAct acrescido de pequenas regiões UTR 5' e 3' foi clonada em plasmídeo de clonagem pGEM® - *T easy* (Promega) (figura 3).

O plasmídeo pGEM® - *T easy* permite a seleção de células transformantes através da resistência à ampicilina e também pela coloração azul apresentada pelas colônias no meio LB ágar, em presença de X-Gal, possível devido à presença do gene *lacZ*, que é ativado com a ligação do inserto. Além disso, esse plasmídeo permite uma alta eficiência de ligação a produtos de PCR, garantindo que múltiplas cópias sejam feitas das sequências clonadas para armazenamento e posterior manipulação.

Figura 3 – Mapa do plasmídeo pGEM® - *T easy*, da Promega. O mapa mostra a sequência e localização de pontos de referência do plasmídeo. Fonte: Manual técnico da Promega.

Para a expressão heteróloga foi utilizado o pGEM/pET, plasmídeo construído pelo nosso grupo de pesquisa (produto em processo de patenteamento). O pGEM/pET consiste em um híbrido de pGEM® - *T easy* e pET-28a(+) (Novagen®). Para a construção desse plasmídeo, a região do promotor até o terminador *T7* presentes no pET-28a(+) foram inseridas no pGEM® - *T easy*, levando à construção

de um plasmídeo de expressão que confere resistência à ampicilina e apresenta caudas de histidina N e C-terminais, cuja afinidade com resinas de níquel em pH alto permite a sua purificação.

3.3.1 Delineamento de oligonucleotídeos (*primers*)

Os *primers* foram delineados com auxílio do *software* Primer Select (LaserGene, DNA Star) a partir da sequência que codifica a proteína actina de *N. caninum* (código de acesso NCLIV_003440). O primeiro par foi delineado sem a inserção de sítios de restrição e foi baseado nas regiões UTR 5' e 3' do gene de actina. O segundo par delineado teve os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III inseridos (tabela 1). A temperatura de anelamento de cada *primer* foi calculada através do *site* <http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>.

Tabela 1. ***Primers* utilizados para a amplificação do gene *NcAct*.** As bases sublinhadas correspondem aos sítios de restrição. T_m = temperatura de anelamento. pb = aminoácidos.

Primer	Sentido	Sequência sentido 5' - 3'	T _m (°C)	Posição (pb)
NcAct_F	Forward	ACGTTTTCATAGATAAGATG	44,8	(UTR 5')
NcAct_R	Reverso	CTCAGCGTTAAACACCACA	52,9	(UTR 3')
NcAct_F_BamHI	Forward	TTTGGATCCACCACCTCCGCC	42,0	604
NcAct_R_HindIII	Reverso	TTTAAGCTICCAATACCCTCGT	40,0	920

3.3.2 Clonagem da sequência *NcAct*-base

3.3.2.1 Isolamento do RNA total

O isolamento de RNA total de taquizoítas de *N. caninum* foi feito a partir da extração com TrizolTM (Gibco®). As fases orgânica e inorgânica foram separadas por clorofórmio e o RNA foi recuperado da fase inorgânica por precipitação em álcool isopropílico absoluto. O RNA isolado foi quantificado por espectrofotometria UV capilar (GeneQuant, GE *Healthscience*) utilizando parâmetro de absorção da luz em 260 (detecção de nucleotídeos) e 280 nm (detecção de proteínas). Foram utilizadas as amostras cuja relação 260/280 nm estivessem entre 1,6 e 2,0, que indica o grau de pureza adequado.

3.3.2.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de RNA total com transcriptase reversa (GoScript™ *Reverse Transcription System*, Promega). Para tal, a reação foi iniciada com a adição de 2 pmol/μl do *primer* NcAct_R, 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 esfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados à solução de RNA e *primer* uma mistura contendo 4 μl do tampão de reação GoScript™ 5x, 1,2 mM, 0,5 mM de dNTP mix, 20 unidades Weiss de inibidor de ribonuclease recombinante RNasin®, 1 μl de transcriptase reversa GoScript™ 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.

3.3.2.3 Reação de Polimerase em cadeia (PCR)

As amplificações da sequência NcAct-base por PCR foi realizada com o kit *HotStarTaq® DNA Polymerase* (QIAGEN®). Para a reação foram utilizados concentração final de 1 x do tampão de PCR Qiagen 10 x (combinação de KCl e (NH₄)₂SO₄; 15 mM MgCl₂); 200 μM de dNTP mix; 2 pmol de cada *primer* (NcAct_F e NcAct_R); 2 μl das soluções de cDNA; 2,5 unidades de *HotStarTaq DNA Polymerase* e quantidade suficiente para 50 μl de água Milli-Q autoclavada.

A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler®, Eppendorf), iniciando-se por um ciclo de 15 minutos a 95°C para ativação da enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, seguida de dois turnos de cinco ciclos cada e um turno de 25 ciclos. Cada ciclo era composto de desnaturação de 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos (variável por turno) e extensão de 2 minutos a 72°C. O primeiro turno apresentou temperatura de anelamento de 50°C, enquanto que essa temperatura no segundo turno foi de 48°C e 46°C no terceiro turno. Por fim, foi realizada uma incubação de 10 minutos a 72°C para terminação. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0,8%, excisado do gel e purificado.

3.3.2.4 Ligação em vetor de clonagem e transformação em célula eletrocompetente

A sequência oriunda da PCR e purificada foi ligada em vetor de clonagem pGEM® - *T easy*. A reação foi realizada com a adição de 2 µl do produto da PCR a 5 µl do tampão de ligação 2x, 1 µl (50 ng) do vetor pGEM® - *T easy*, 1 µl (3 unidades Weiss) de T4 DNA ligase, 3 µl de água Milli-Q autoclavada e incubação a 4°C por 18 horas. Após a ligação, 2 µl da reação foram transformados em *E. coli* eletrocompetentes TOP 10.

3.3.3 Clonagem da sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀

3.3.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

As amplificações dos fragmentos por PCRs foram realizadas com o kit *HotStarTaq® DNA Polymerase* (QIAGEN®), conforme descrito no item 3.3.2.3. Para reação com finalidade de clonagem foi utilizado o kit *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), sendo as reações constituídas de concentração final de 1 x de tampão de PCR alta fidelidade 10 x (com 15 mM de MgCl₂), 200 µM de dNTP mix; 2 pmol de cada *primer*; 2 µl de plasmídeos ligados ao inserto base; 2,5 unidades de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* e água Milli-Q para um total de 50 µl de reação.

As reações, realizadas em equipamento (Multi Gene II, Labnet) iniciaram-se com um ciclo de 95°C por 15 minutos (kit *HotStarTaq® DNA Polymerase*, QIAGEN®) ou 2 minutos (kit *High Fidelity PCR Enzyme Mix*, Fermentas), seguido de três turnos de ciclos. Os dois primeiros turnos apresentavam cinco ciclos cada, sendo cada ciclo composto de três fases: desnaturação de 30 segundos a 94°C, seguido de 30 segundo anelamento (50° no primeiro turno e 46°C no segundo) e, por fim, 2 minutos a 72°C para extensão. O terceiro turno apresentava 25 ciclos compostos de desnaturação e extensão iguais aos ciclos anteriores e anelamento de 42°C por 30 segundos. Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 0,8% e o produto da reação com o kit *High Fidelity* foi recortado do gel e purificado.

3.3.3.2 Ligação em vetor de clonagem e transformação em células eletrocompetentes

A sequência resultante da purificação do produto de PCR em gel de agarose foi ligada em plasmídeo de clonagem pGEM® - *T easy*, conforme descrito no item 3.2.7.4. A ligação (2 µl) foi transformada em *E. coli* eletrocompetentes TOP 10.

3.3.3.3 Obtenção da sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀ e do plasmídeo de expressão

A sequência resultante da purificação do produto de PCR foi ligada em plasmídeo pGEM® - *T easy*, que foi transformado e cultivado em *E. coli* eletrocompetente TOP10. Os plasmídeos foram extraídos das células por *miniprep* e digeridos com *BamH* I e *Hind* III (Tabela 2). Todo o volume da digestão foi submetido à eletroforese 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 pGEM/pET já preparado.

Tabela 2 – Reações de digestão com *BamH* I e *Hind* III. As reações foram mantidas em banho-maria por 18 horas a 37°C.

	pGEM® - <i>T easy</i>	pGEM/pET
Tampão 10 x <i>FastDigest</i> ®*	3 µl	1,5 µl
<i>BamH</i> I <i>FastDigest</i> ®*	1 µl	0,5 µl
<i>Hind</i> III <i>FastDigest</i> ®*	1 µl	0,5 µl
Plasmídeo	10 µl	5 µl
Água Milli-Q	15 µl	7,5 µl
Volume total	30 µl	15 µl

*O tampão e ambas as enzimas são *FastDigest*®, da Fermentas.

A manutenção do plasmídeo pGEM/pET foi feita em culturas de *E. coli* TOP 10 mantidas em meio LB (meio Luria–Bertani; 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,0) com 50 µg/ml de ampicilina e estocadas em glicerol 60% a -70°C. O estoque foi inoculado (10 µl) em meio LB com 50 µg/ml de ampicilina e incubado por 18 horas a 37°C sob agitação. Após o crescimento, a cultura foi submetida ao *miniprep* para isolamento dos plasmídeos.

Para tornar os plasmídeos aptos à ligação com o fragmento, recebendo uma extremidade coesiva compatível, e linearizá-los, esses passaram por um processo de digestão com as enzimas *BamH* I e *Hind* III (conforme tabela 2).

3.3.3.4 Reação de ligação do vetor expressão com a sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀

A reação de ligação foi realizada entre o plasmídeo pGEM/pET pré digerido com as enzimas *BamH* I e *Hind* III e o fragmento oriundo da reação de digestão com as mesmas enzimas do plasmídeo pGEM® - *T easy* e ocorreu na presença da enzima T4 DNA Ligase (Fermentas). Para a reação foram adicionados 2 µl do tampão T4 DNA Ligase 10 x (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8), 50 a 100 ng do plasmídeo pGEM/pET e o fragmento a uma concentração cerca de três vezes maior que a do plasmídeo, assim como 1 U Weiss da enzima T4 DNA Ligase. A reação foi incubada em banho por 18 horas a 16°C. Após 16 horas, 2 µl da reação de ligação foram transformados em linhagem eletrocompetente de *E. coli* TOP 10.

Das colônias obtidas com a transformação, seis foram isoladamente inoculadas em 5 ml de meio LB com 50 µg/ml de ampicilina, incubadas a 37°C por 18 horas sob agitação. Todas as culturas foram submetidas ao *miniprep* para isolamento dos plasmídeos, que foram digeridos com *BamH* I e *Hind* III (tabela 3) para verificar a presença do inserto, visualizado em gel de agarose 0,8%. Para confirmar que a ligação encontrava-se no plasmídeo pGEM/pET e confirmar a natureza do inserto NcAct₂₀₁₋₃₁₀, foi realizada outra digestão, agora com a enzima *Pst* I, que cliva a ligação entre os plasmídeos pGEM® - *T easy* e pET-28a(+), assim como na posição 819 do gene NcAct.

Tabela 3 – **Reação de digestão do plasmídeo pGEM/pET após a ligação com a sequência de interesse.** As reações foram mantidas em banho a 37°C por 1 hora.

	pGEM/pET após ligação	pGEM/pET após ligação
Tampão 10 x <i>FastDigest</i> ®*	1,5 µl	-
Tampão Orange*	-	1,5 µl
<i>Bam</i> HI <i>FastDigest</i> ®*	0,5 µl	-
<i>Hind</i> III <i>FastDigest</i> ®*	0,5 µl	-
<i>Pst</i> I*	-	0,5 µl
Plasmídeo	5 µl	5 µl
Água Milli-Q	7,5 µl	8,0 µl
Volume total	15 µl	15 µl

*Todas as enzimas e tampões utilizados nas reações são da Fermentas.

Após a digestão, os produtos dos *minipreps* foram transformados em *E. coli* eletrocompetente BL21 (DE3) para expressão.

3.3.4 Purificação dos plasmídeos (minipreps)

Para a realização dos *minipreps* foi utilizado o kit *PureYield® Plasmid Miniprep System* (Promega). Cada *miniprep* foi realizado a partir de uma única colônia de *E. coli* TOP10 ou BL21 (DE3) bem isolada em meio LB ágar (meio Luria-Bertani; 1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% ágar, pH 7,0) com 50 µg/ml ou de estoques em glicerol (60%), que foram inoculados em 5 ml de meio LB (contendo o mesmo antibiótico) e incubados por 18 horas a 37°C. O conteúdo dos tubos contendo as culturas foi transferido para tubos de 1,5 ml, que foram centrifugados a 13000 x g por 1 minuto a 4°C, o sobrenadante foi descartado e esse processo foi repetido até que toda a cultura fosse recuperada em forma de pellet. Foram adicionados 600 µl de água Milli-Q aos pellets formados, que foram ressuspensos completamente. Em seguida, 100 µl do tampão de lise de células foram adicionados, e as soluções foram misturadas por inversões do tubo até que a sua coloração mudasse de azul opaco para um azul claro. O tampão de neutralização a 4°C foi adicionado (350µl) às soluções, que foram homogeneizadas cuidadosamente por inversão até que ficassem totalmente amarelas e com a formação de um precipitado de mesma cor. As amostras foram, então, centrifugadas por 5 minutos a 13000 x g e 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para microcolunas devidamente acondicionadas em tubos coletores. As colunas foram centrifugadas a 13000 x g por

1 minuto a 4°C e os volumes eluídos foram descartados. Às colunas foram adicionados 100 µl do tampão de remoção de endotoxinas e foi feita uma centrifugação de 13000 x g por 1 minuto a 4°C. O tampão de lavagem foi adicionado em seguida (400 µl) e as colunas foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições anteriores. Após descarte do conteúdo eluído, as colunas foram centrifugadas novamente na mesma velocidade e temperatura, agora por 2 minutos para a remoção de traços do tampão de lavagem. Os tubos coletores foram descartados, sendo trocados por tubos de 1,5 ml a serem acoplados às colunas. Finalmente, para a eluição dos plasmídeos, 30 µl de água Milli-Q autoclavada foram adicionados diretamente às matrizes das colunas, que foram incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugadas a 13000 x g por 2 minutos. As soluções eluídas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

3.3.5 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose 0,8%, preparado 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), foram realizadas uma cuba *Easy Cast Mini* (Owl Scientific) contendo tampão TAE sob uma voltagem de 100 V e amperagem livre. As amostras foram preparadas por diluição em Tampão de Corrida (6 x *Orange DNA Loading Dye*, Fermentas) e foram utilizados 5 µl dos marcadores moleculares GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ou GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ambos da Fermentas.

3.3.6 Purificação em gel de agarose

A extração e purificação do DNA a partir de géis de agarose foi feita através do kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE-Healthcare). Inicialmente, a banda de interesse, presente em um gel de agarose e visualizada através da luz UV, foi recortada e extraída do gel com o auxílio de um bisturi limpo e transferida para um tubo de 1,5 ml. A banda recortada, contendo massa de no máximo 400 mg foi incubada com o tampão de captura (10 µl para cada 10 mg do gel) a uma temperatura de 60°C por 15-30 minutos, até a agarose ser completamente dissolvida e o tampão adquirir uma coloração amarela ou laranja-claro. Uma vez dissolvida a agarose, a solução foi transferida à microcoluna GFX *MicroSpin* acoplada a um tubo coletor, incubada à temperatura ambiente por 1

minuto e centrifugada a 13000 x g por 1 minuto a 4°C, para que o fragmento de DNA ligue-se à matriz de sílica da microcoluna. A solução eluída foi descartada e 500 µl do tampão de lavagem foram adicionados à microcoluna, que foi centrifugada sob as mesmas condições anteriores. Novamente o conteúdo eluído foi descartado e a coluna foi submetida a uma centrifugação de 2 minutos a 13000 x g a 4°C para remoção completa do tampão de lavagem. Em seguida, o tubo coletor foi descartado e substituído por um tubo de 1,5 ml, que foi acoplado à microcoluna. Sobre a matriz da microcoluna foram adicionados 10-50 µl de água Milli-Q autoclavada e, após incubação de 1 minuto à temperatura ambiente, a microcoluna foi centrifugada a 13000 x g por 1 minuto a 4°C para recuperação do DNA, que foi armazenado em -20°C.

3.3.7 Preparação de células eletrocompetentes

Uma colônia de células *Escherichia coli* TOP 10 ou BL21 (DE3), previamente plaqueada em meio LB ágar foi repicada e incubada por 18 horas a 37°C em 50 ml de meio LB. Após 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) até OD (densidade ótica) a 600 nm atingir de 0,5 a 0,8 (medida realizada no equipamento Genequant, GE Healthscience). Em seguida, toda a cultura foi incubada em gelo por 30 minutos e centrifugado por 15 minutos a 3000 x g a 4°C. O pellet foi ressuspensão em 500 ml de água (Milli-Q esterilizada) a 4°C e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Feito o procedimento anterior por duas vezes, o pellet resultante foi homogeneizado em 20 ml de glicerol 10% esterilizado, este foi centrifugado (3000 x g, 15 minutos, 4°C) e o pellet obtido foi novamente ressuspensão em glicerol 10%, porém em 1 ml.

Para determinar se as células atingiram concentração mínima para transformação, 7,5 µl do conteúdo obtido foram diluídos em 742,5 µl de água Milli-Q e tiveram sua OD medida a 600 nm. A quantidade de células é ideal se a OD é maior que 0,5, o que corresponde a 1×10^8 UFC.

3.3.8 Transformação em cepas de *E. coli* eletrocompetentes

As reações de transformação ocorreram em cepas de *E. coli* eletrocompetentes TOP 10 ou BL21 (DE3) seguindo o mesmo protocolo. As ligações das sequências em plasmídeos foram transferidas (2 µl) a um tubo 1,5 ml mantido em gelo. A esse

tubo foram transferidos 50 µl de células eletrocompetentes, previamente mantidas e descongeladas em gelo. O conteúdo do tubo, após ser cuidadosamente misturado foi transferido à cubetas de 2 mm e eletroporados sob as seguintes condições: C= 25 µF, PC= 200Ω e V= 2,5kV em equipamento GenePulser Xcell, da BioRad. Após a eletroporação foram adicionados 250µL de meio NYZ+ (1% NZ amina; 0,5% extrato de levedura; 0,5% NaCl; 12 mM MgCl₂; 12 mM MgSO₄; 20 mM glucose) e o material da cubeta transferido para um tubo falcon de 15mL para agitação por uma hora (350 rpm a 37°C). Ao final da incubação, o material foi plaqueado em meio LB ágar com ampicilina (50 µl/ml) e incubado a 37°C por 18 hora s. Caso as células tenham sido transformadas com plasmídeos pGEM® - *T easy*, o meio LB ágar para o plaqueamento final teve a adição de 40 µl de X-Gal (50 mg/ml, Promega) 1 hora antes do plaqueamento.

3.4 Expressão, análise e purificação da proteína recombinante His-NcAct₂₀₁₋₃₁₀

Para a expressão, células *E. coli* eletrocompetentes da cepa BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo pGEM/pET recombinante contendo o fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀. As colônias foram repicadas em meio LB com 50 µg/ml de ampicilina e incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação . Após e ssa incubação, 100 µl de cada cultura foram transferidos, em duplicata, para 3 ml de meio LB com 50 µg/ml de ampicilina presentes nos poços de placas de cultura de células de 6 poços (TPP®). As placas foram incubadas a 37°C até que a densidad e ótica a 600 nm atingisse 0,5 a 0,8 (equipamento GeneQuant, GE *Healthscience*). Atingida a densidade ótica necessária, um dos poços de cada cultura foi induzido com IPTG (1; 0,5; 0,25; 0,125 ou 0,062 mM); o outro poço foi utilizado como controle da expressão; as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C e 120 rpm de agitação. Após a expressão, os conteúdos dos poços foram transferidos para tubos de 1,5 ml e os pellets coletados por centrifugação a 13000 x g por 1 minuto.

3.4.1 Extração total

Os pellets de BL21 (DE3) coletados após a indução da expressão ressuspensos em 700 µl de tampão Ureia 8 M (NaH₂PO₄ 100 mM; 100 mM Tris-Cl; pH 8,0) e submetidas à extração por sonicação (intensidade 7 em *Sonic Dismembrator model* 100, Fischer *Scientific*). Em seguida, os tubos foram centrifugados 10000 x g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes analisados em gel SDS-PAGE 12,5%.

3.4.2 Extração solúvel e insolúvel da proteína His-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ recombinante

A extração solúvel e insolúvel foi feita com a extração sequencial nos seguintes tampões: Tris-Cl (pH 7,5), Tris-Triton (Tris-Cl; 5% Triton X-100) e Ureia 8 M (NaH₂PO₄ 100 mM; 100 mM Tris-Cl; pH 8,0). Inicialmente, o pellet coletado após a indução da expressão foi ressuspensionado em 700 µl de tampão Tris-Cl e sonificado (intensidade 7 em *Sonic Dismembrator model 100*, Fischer Scientific). O tubo foi centrifugado (10000 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 sonificada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi recolhido e o mesmo processo anterior foi repetido com o pellet, agora com o tampão Ureia 8 M. Os sobrenadantes referentes às extrações com os três tampões foram analisados (10 µl de cada amostra) em eletroforese em gel de acrilamida 12,5%.

3.4.3 Purificação da proteína His-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ em resina de níquel

As purificações foram realizadas por cromatografia de afinidade em 500 µl de resina de níquel (Ni Sepharose™ 6 *Fast Flow*, GE Healthcare), cujos átomos de níquel carregados positivamente (Ni⁺²) interagem com a cauda de histidina dos fragmentos recombinantes em pH básico e perdem a capacidade de interação em pH ácido. Essa característica da resina de níquel permite a purificação das proteínas recombinantes à medida que ocorre a diminuição do pH do meio.

A resina foi empacotada em colunas vazias (*Empty Disposable PD-10 Columns*, GE Healthcare) e lavada com 3 ml de tampão Ureia 8 M pH 8,0. Após a lavagem, foram adicionados às colunas fechadas 350 ou 500 µl das amostras, assim como 3 ml de tampão Ureia 8 M e os sistemas foram submetidos à agitação por 10 minutos, permitindo a interação da cauda de histidina com o níquel da resina. Feita a incubação, a resina foi lavada novamente com 3 ml de tampão Ureia 8 M e, em seguida, tampão Ureia 8 M pH 6,3 (6 ml). A amostra foi eluída através do tampão Ureia 8 M pH 4,5 em alíquotas de 500 µl. Para análise das frações eluídas e recolhidas foram utilizados 200 µl da solução de Bradford 1:5 (Coomassie blue G-250, BioAgency), na qual foram misturados 20 µl de cada fração. Frações que apresentaram coloração azul na solução de Bradford foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12,5%, utilizando-se 10 µl de cada amostra.

3.5 Extratos proteicos totais com estabilização de actina de *N. caninum* e Vero

Os extratos de *N. caninum* e de células Vero foram obtidos a partir da incubação das células por 1 hora a 0°C ou 2 horas a 4°C em Tampão de Estabilização de Actina (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 125 mM KCl, pH 7,2) adicionado de glicerol 10%, inibidor de protease (concentração final de 1x, Complete Mini EDTA free, Roche), Triton X-100 1%. A extração foi utilizada em eletroforeses e *western blots* uni ou bidimensionais e ensaio de fracionamento de actina-G e actina-F. Os extratos foram mantidos a -70°C até a sua utilização.

3.6 Imunofluorescência

O anticorpo monoclonal IgG₁ anti- β -actina C4 (Santa Cruz *Biotechnology*®) foi utilizado para localizar a actina dos taquizoítas, que foi visualizada através da fluorescência emitada pelo conjugado anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (*Molecular Probes*®), um succinidil ester que possui a propriedade de absorver a radiação em 495 nm e emitá-la em 519 nm, apresentando a cor verde, detectável em microscopia de fluorescência. O núcleo foi marcado com iodeto de propídeo (IP) (Santa Cruz *Biotechnology*®), agente que se intercala ao DNA e absorve radiação a 488 nm, emitindo a 570 nm, de cor vermelha.

Para a imunofluorescência, foram utilizados taquizoítas purificados. Logo após a purificação, os taquizoítas foram divididos em quatro grupos e tratados com jasplakinolida (5 μ M), citocalasina D (2 μ M), DMSO 1% ou RPMI 1640 por 15 minutos a 37°C sob agitação de 350 rpm (Eppendorf® *Thermomixer Shaker*). Em seguida, esses taquizoítas foram lavados com PBS e fixados com formaldeído 3,65% por uma hora a 25°C sob agitação de 300 rpm. Após a fixação e mais três lavagens, foi adicionada a solução de permeabilização 0,2% de Triton X-100 em PBS, sendo incubada por 40 minutos a 25°C e agitação de 300 rpm, seguida de mais três lavagens e bloqueio com solução de 3% BSA (albumina bovina) e 20 mM de glicina em PBS por 18 horas a 10°C e agitação de 300 rpm. Passadas 18 horas, os taquizoítas foram lavados novamente e incubados com o anticorpo monoclonal anti-actina C4 a uma diluição 1:500 em solução 0,3% BSA e 2 mM de glicina por 45 minutos a 25°C e 300 rpm. Após outra lavagem, eles foram incubados com o conjugado Alexa Fluor® 488 a uma concentração de 2,5 μ l/ml por 30 minutos, 25°C e 300 rpm. A marcação do núcleo foi feita com 0,5 μ M de iodeto de propídeo, incubado por 10 minutos a 25°C a 300 rpm. Terminadas as incubações, os

taquizoítas foram ressuspensos em glicerol 60%, adicionados sobre uma lâmina de microscopia 26 x 76 mm e cobertos por uma lamínula de 24 x 60 mm. A lamínula foi selada com esmalte para evitar a desidratação e, em seguida, foi armazenada a 4°C até a sua utilização.

Para a captação de imagens foi utilizado o microscópio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica *Microsystems*) no Laboratório de Microscopia Confocal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente, utilizado uma objetiva de 100 x com imersão a óleo e a aquisição das imagens foi feita utilizando o laser Argônio 488 nm para o Alexa Fluor® 488 e HeNe 543 nm para o iodeto de propídeo. As imagens captadas foram processadas pelo software Image J 1.46r (*National Institute of Health, USA*).

3.7 Eletroforese em gel de acrilamida

Para a separação de moléculas protéicas com finalidade de detecção de proteínas ou realização de *western blot* foram utilizadas as técnicas de eletroforese em gel de acrilamida uni ou bidimensional.

3.7.1 Eletroforese unidimensional

Foram utilizados géis de acrilamida 10% e 12,5%. Os géis foram submetidos à voltagem de 120 V (um gel) ou 150 V (dois géis) e amperagem livre em tampão Tris-HCl-Glicina (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0.1%). As amostras foram diluídas no 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). Como marcadores moleculares foram utilizados o *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (BioRad) e o marcador pré-corado *Precision Plus Protein™ Dual Color* (BioRad). Os géis a serem utilizados para *western blot* foram corridos até que o marcador correspondente a 25 kDa (*Precision Plus Protein™ Dual Color*, da BioRad) saísse do gel os géis utilizados para corrida de extratos de *E. coli* BL21 (DE3) foram submetidos à eletroforese até que o azul de bromofenol atingisse a região final dos géis.

3.7.2 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional (ou 2D) é uma técnica que separa proteínas por duas de suas características: o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular. Em uma primeira dimensão, a separação pelo pI é feita por focalização isoelétrica, que submete as proteínas a um gradiente de pH sob um campo elétrico, permitindo que elas movam-se até uma posição onde sua carga líquida seja zero. A separação pela massa molecular ocorre em seguida e é feita através da técnica de eletroforese em gel de acrilamida.

3.7.2.1 Primeira dimensão ou focalização isoelétrica

Visando a compatibilidade com a técnica de focalização isoelétrica dos componentes do tampão da amostra a ser submetida à eletroforese bidimensional, 50 a 60% do tampão do extrato (tampão de estabilização de actina, item 3.3) foram substituídos por tampão de amostra (ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 4%). Para isso, 500 µl dos extratos de *N. caninum* e Vero em tampão de estabilização de actina foram concentrados no concentrador Microcon® (Millipore) e, em seguida, tiveram seus volumes completados para 500 µl com tampão de amostra.

Após a modificação do tampão, ao volume correspondente a 50 µg de proteínas de cada amostra foram adicionados 5 µl de inibidor de protease (coquetel de inibidores de protease, Sigma-Aldrich®), 0,75 mg de dithiothreitol (DTT; totalizando 0,2 mM - da Invitrogen™), 5 µl de IPG *buffer* 3-11 NL (GE *Healthcare*) e tampão de reidratação (Ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 4%; traços de azul de bromofenol) para um volume total de 125 µl. Como a focalização isoelétrica deve ocorrer em condições desnaturantes, a presença de ureia no tampão de reidratação garante essa característica às proteínas. A tioureia é adicionada com finalidade de melhorar a solubilização das proteínas, principalmente as hidrofóbicas. Já o CHAPS, no mesmo tampão, é incluído por ser um detergente zwitteriônico, que permite a completa solubilização da amostra e previne a formação de agregados por interação hidrofóbica. O azul de bromofenol é utilizado como um marcador de cor para monitorar a migração das proteínas pela tira. O DTT é adicionado, pois é um agente redutor que quebra as pontes de dissulfetos das proteínas. A importância do IPG *buffer*, que consiste em uma mistura de anfólitos, reside no fato de melhorar a separação das proteínas, pois aumenta a sua solubilidade e produz uma condutividade uniforme através do gradiente de pH.

Os 125 µl da solução preparada foram utilizados para reidratar cada tira de 7 cm (*Rehydrate Immobiline DryStrip gel 3-11 NL*, da *GE Healthcare*), posicionadas no *DryStrip Reswelling Tray* (suporte para reidratação de tiras; *GE Healthcare*) e cobertas de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*, da *GE Healthcare*). O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 18 horas. Após a reidratação, as tiras foram dispostas no suporte apropriado do equipamento *Ettan IPGPhor 3* (*GE Healthcare*), cobertas com óleo mineral e submetidas às condições elétricas indicadas pelo fabricante das tiras (tabela 4) para a focalização isoelétrica. As tiras foram armazenadas a -70°C até a sua utilização.

Tabela 4 – **Condições utilizadas para a focalização isoelétrica das tiras de 7 cm 3-11 NL em equipamento *Ettan IPGPhor 3*.** Corrida efetuada a 20°C e corrente de 50 µA por tira.

Tira de 3-11 NL			
Etapa	Tipo de voltagem	Voltagem (V)	kVh
1	<i>Step and hold</i>	300	0,2
2	<i>Gradient</i>	1000	0,3
3	<i>Gradient</i>	5000	4,0
4	<i>Step and hold</i>	5000	2,0
total			6,5

3.7.2.2 Segunda dimensão

Dando prosseguimento ao método de eletroforese bidimensional, a segunda dimensão inicia-se com o equilíbrio das tiras. Estas foram equilibradas em tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, ureia 6 M, glicerol 30% e SDS 2 %) com 10 mg/ml de DTT sob agitação, seguida de incubação por 15 minutos com tampão de equilíbrio adicionado de 25 mg/ml de iodoacetamida (*GE Healthcare*). O equilíbrio das tiras permite completar a desnaturação das proteínas, uma vez que o DTT mantém as proteínas em sua forma reduzida e a iodoacetamida previne que elas voltem a oxidar-se durante a eletroforese, além disso, o SDS confere às proteínas uma carga negativa, garantindo que elas sejam separadas pela massa molecular.

As tiras equilibradas foram dispostas sobre o gel de acrilamida 12,5% no sistema SE 260 (*GE Healthcare*) e cobertas com o tampão de selamento (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 1%; agarose 0,5% e traços de azul de bromofenol), que solidifica-se

sobre as tiras e o gel, possibilitando a distribuição homogênea da corrente elétrica durante a eletroforese, enquanto que o azul de bromofenol marca visualmente o andamento da corrida. O sistema eletroforético foi submetido a voltagem livre e amperagem constante de 10 mA por 15 minutos para entrada homogênea da amostra no gel e o processo foi completado a 20 mA até o azul de bromofenol atingir o fim do gel. Os géis foram utilizados para *western blot* ou coloração por coomassie R e tiveram alguns *spots* excisados para análise em espectrometria de massas.

3.8 Coloração dos géis de acrilamida por coomassie blue

Para visualização do material proteico presente em géis de acrilamida foi utilizada a coloração com coomassie blue. Após eletroforese unidimensional, o géis foram incubados por 1 hora em solução fixadora (ácido fosfórico 8%; metanol 50%) sob agitação a temperatura ambiente, seguidos de 3 lavagens de 5 minutos cada com água Milli-Q. Após lavagens, os géis foram incubados em solução de coomassie G-250 (sulfato de amônio 180 g/l; metanol 34%; ácido fosfórico 3,5% v/v; coomassie G-250 0,1%) por 3 dias a temperatura ambiente sob agitação. Os géis submetidos à eletroforese bidimensional passaram pelos mesmos processos dos géis unidimensionais, com exceção da coloração que foi realizada com solução de coomassie R (sulfato de amônio 180 g/l; metanol 34%; ácido fosfórico 3,5% v/v; coomassie R 0,1%).

3.9 Captação de imagens

A digitalização das imagens de géis de acrilamida e filmes de *western blot* foi realizada pelo equipamentos *Image Scanner* por meio do *software* LabScan, ambos da GE.

3.10 Western Blot

Géis de acrilamida 1D e 2D contendo extrato de *N. caninum* e células Vero, após eletroforese, foram submetidos à técnica de *western blot*. O conteúdo desses géis foi transferido para membrana de PVDF (0,45 µm, Millipore), previamente incubada em metanol por 5 minutos, em sistema semi-seco (TE PWR 77, GE). No equipamento de transferência, o gel de acrilamida foi posicionado sobre a membrana de PVDF e ambos foram acomodados entre folhas de papel filtro (BioRad) umedecidas em tampão de transferência (Tris 0,25 M; glicina 0,2 M; SDS

0,001%; metanol 15%). A transferência ocorreu a 0,81 mA/cm² de membrana por 1 hora e 15 minutos. Após a transferência, as membranas foram coradas em solução de DB71 (Direct Blue 71 Aldrich 0,08% em 40% de metanol e 10% de ácido acético) por 5 minutos sob agitação e foram marcadas quanto à posição do marcador molecular e início e fim da corrida. As membranas foram, então, descoradas com tampão de descoloração (bicarbonato de sódio 0,15 M; etanol 50%) e foram lavadas com PBS-T (0,5% de Triton X-100 em PBS) por 5 minutos. Após a lavagem, elas foram bloqueadas em PBS-GT (gelatina suína 0,8% em PBS-T) a temperatura ambiente sob agitação. Passada 1 hora, foram feitas três lavagens de 5 minutos cada com PBS-T e as membranas foram, então, incubadas com o anticorpo monoclonal IgG₁ anti-β-actina C4 (Santa Cruz *Biotechnology*®) na diluição 1:2000 (em PBS-GT) por 18 horas a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente três vezes por 5 minutos em PBS-T e incubadas com o anticorpo conjugado de coelho IgG anti-camundongo acoplado à peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 8000 vezes (em PBS-GT).

Para a revelação, as membranas foram expostas à mistura dos reagentes ativadores de peroxidase (Luminol, *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce) em temperatura ambiente por 5 minutos. A quimioluminescência foi detectada por exposição a filme fotográfico em um cassete para exposição a filmes autoradiográficos. Após exposição, o filme foi imerso por 1 minuto em solução de revelação (Exsil MX), seguido de imersão em água e, por fim, 1 minuto de imersão em solução de fixação (Exsil MX).

3.11 Espectrometria de massas (RP-nanoLC-MS/MS)

As bandas ou *spots* de géis de acrilamida 1D e 2D, respectivamente, corados por coomassie G-250 ou coomassie R e que apresentaram equivalentes revelados pelo anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 após o *western blot*, foram submetidas à identificação por espectrometria de massas.

Foram excisados 12 *spots* de géis de acrilamida 2D, nove deles a partir de extrato de *N. caninum* e três de extrato de Vero. Também foram excisadas 3 bandas de géis 1D, duas delas de gel contendo extrato de *N. caninum* e a outra de extrato de Vero. As análises em MS foram feitas em colaboração com Netherlands Proteomics Center, em Utrecht, Holanda utilizando RP-nanoLC-MS/MS, que consiste em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase

reversa miniaturizado e de maior sensibilidade (Agilent 1200 HPLC, da *Agilent Technology*) acoplado a um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap XL™ (*Thermo Fisher Scientific*).

a) Descoloração dos *spots*/bandas

Antes de realizar a digestão das proteínas presentes nos *spots* e bandas, estes foram descorados com solução de bicarbonato de sódio 50 mM pH 8,0. Para isso, os *spots*/bandas foram incubados sob agitação com 100 µl da solução de bicarbonato. Após 10 minutos, a solução de bicarbonato de sódio foi aspirada. Esse processo foi repetido mais uma vez. Feitas essas primeiras lavagens, os *spots*/bandas foram incubados com água Milli-Q, seguidos de incubação com acetonitrila (ACN) 100%, bicarbonato de sódio 50 mM, ACN 100% mais uma vez, mais uma incubação com bicarbonato de sódio, finalizado com ACN 100%. Todas essas incubações foram realizadas em um volume de 100 µl sob vigorosa e rápida agitação em vórtex. A ACN tem a função de secar os fragmentos de gel de agarose e incubações com soluções aquosas alternadas com ACN realizam um “efeito esponja” nos *spots*/bandas.

Finalizada a última incubação com ACN 100%, os tubos foram dispostos no concentrador a vácuo *Speed Vac* (CentriVap Concentrator, Labconco®) para secagem completa dos *spots*/bandas. Digestão em gel das proteínas por tripsina.

b) Digestão

Para a digestão proteica, os *spots*/bandas foram incubados com 0,25 µg de tripsina (Promega) em 50 mM de bicarbonato de sódio pH 8,0 a 37°C por 18 horas. Os peptídeos foram extraídos com ACN 100% e secos em *Speed Vac*.

c) Análise por RP-nanoLC-MS/MS

Os peptídeos secos foram ressuspensos em ácido fórmico 10% e 25% de cada amostra foi submetida ao LTQ-Orbitrap XL™ conectado a um sistema Agilent 1200 HPLC utilizando uma pré-coluna de 100 µm x 20 mm Aqua C18 (Phenomenex) seguida de uma coluna analítica Reprosil C18 (Dr Maisch) de 50 µm x 250 mm.

Foi realizada uma corrida de 60 minutos utilizado gradientes de eluição com solvente A (ácido acético 0,6%) e solvente B (ácido acético 60% em ACN 80%) em uma taxa de vazão de 100 nL/minuto. Os cinco íons de peptídeos mais intensos foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por colisão.

d) Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados através de buscas no banco de dados ToxoDB 6.4 utilizando o *software* Mascot versão 2.3.02 (*Matrix Science*) utilizando parâmetros de tolerância de massa para os peptídeos precursores de 50 ppm e para os fragmentos de íons 0.6 Da, permitindo duas clivagens perdidas. Como modificação fixa, foi utilizada a carbomidometilação da cisteína e a oxidação da metionina foi escolhida como modificação dinâmica. Os filtros dos resultados foram aplicados através do *software* Proteome Discoverer 1.3 (*Thermo Fischer Scientific*), utilizado as opções desvio a 50 ppm, score 20 e rank 1.

3.12 Fracionamento da actina-G e actina-F

Taquizoítas de *N. caninum* foram incubados com 1% de DMSO ou 20 µM de JAS em tampão de estabilização de actina por 10 minutos a 37°C sob agitação. Após incubação, o volume dos tubos foi completado para 6,5 ml com glicerol, Triton X-100 e inibidor de protease (concentrações finais de 10% de glicerol, 1% de Triton X-100 e 1% de inibidor de protease). Os tubos foram incubados por 1,5 hora em gelo para lise dos taquizoítas e, em seguida, foram ultracentrifugados a 100.000 x g em Ultracentrífuga Beckman Coulter TL-100 com rotor 70.1 TI. Os sobrenadantes foram separados e tiveram parte do seu volume concentrado em Microcon® YM-3 (Millipore). Os pellets foram ressuspensos em 1,5 ml de SDS 2%. Sobrenadantes e pellets foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 12,5%, em concentração proporcional, e ao *western blot*.

4. RESULTADOS

4.1 Procura por actina em *Neospora caninum*

A busca pelo gene que codifica a actina de *N. caninum* foi feita no banco de dados ToxoDB, quando foram encontrados quatro resultados possíveis para actina (tabela 5). A partir de um alinhamento entre as sequências listadas na tabela 5 com a actina de *Toxoplasma gondii* (TgACT1) (DOBROWOLSKI et al., 1997), encontrado no ToxoDB com a identificação TGME49_009030, foram encontrados os resultados apresentados na tabela 6. A sequência com maior identidade/similaridade com a TgACT1 é a NCLIV_003440, com 100%/100%, seguida da NCLIV_064780 com 50%/69% e de NCLIV_0061200 e NCLIV_004550 com 35%/57% e 14%/29%, respectivamente.

Tabela 5 – Resultado da busca por actinas de *N. caninum* no banco de dados ToxoDB. MM = massa molecular (kDa) teórica; PI = ponto isoelétrico teórico.

Identificação	Cromossomo	Descrição	MM	PI
NCLIV_003440	Ib	Actina, relacionado	41,908	4,81
NCLIV_061200	XII	Actina, putativo	46,399	4,75
NCLIV_064780	XII	Actina, putativo	42,908	7,68
NCLIV_004950	II	Actina, putativo	54,671	5,63

Tabela 6 – Comparação entre as sequências de actina encontradas em busca no ToxoDB. A tabela indica as percentagens de identidade e similaridade das sequências TgACT1, NCLIV_003440, NCLIV_061200, NCLIV_004950 e NCLIV_006478. A sequência NCLIV_003440 é idêntica à TgACT1.

		NCLIV_061200	NCLIV_004950	NCLIV_006478	TgACT1
NCLIV_003440	Identidade	35%	14%	50%	<u>100%</u>
	Similaridade	57%	29%	69%	<u>100%</u>
NCLIV_061200	Identidade		14%	33%	<u>35%</u>
	Similaridade		29%	53%	<u>57%</u>
NCLIV_004950	Identidade			16%	<u>14%</u>
	Similaridade			31%	<u>29%</u>
NCLIV_006478	Identidade				<u>50%</u>
	Similaridade				<u>69%</u>

A sequência de identificação NCLIV_003440 (GenBank CBZ49859.1), aqui denominada NcAct, foi selecionada para futuras análises por apresentar homologia com TgACT1. A sequência NcAct (NCLIV_003440) apresenta 1538 pb e dois éxons, sem peptídeo sinal. O primeiro éxon apresenta 687 pb e o segundo, 444 pb, codificando, portanto, 373 aminoácidos.

4.2 Análise *in silico* da sequência completa de NcAct

Foi realizado o alinhamento da sequência proteica de NcAct com seus homólogos em Apicomplexas relacionados como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Babesia bovis* e *Eimeria tenella* (figura 4), onde já é possível notar que as sequências dessas espécies são bastante conservadas entre si. A actina ACT1 de *Toxoplasma gondii* apresenta total identidade/similaridade com NcAct (100%/100%), seguida da actina de *Eimeria tenella* com identidade/similaridade de 97%/99% e actina ACT1 de *Plasmodium falciparum* com 93%/97%. As actinas com menor identidade/similaridade são a actina ACT2 de *Plasmodium falciparum* e actina de *Babesia bovis* com 80%/92% e 86%/94%, respectivamente (tabela 7).

Figura 4 – Alinhamento das sequências proteicas da actina de diversos Apicomplexas. As sequências são bastante conservadas entre si. As sequências de actina alinhadas, pela ordem, são: 1_actina (ACT1) de *Plasmodium falciparum*; 2_actina (ACT2) de *Plasmodium falciparum*; 3_actina de *Babesia bovis*; 4_actina de *Eimeria tenella*; 5_actina de *Toxoplasma gondii* e 6_actina de *Neospora caninum*. Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos destacados em cinza representam similaridade.

Tabela 7 – **Comparação entre as sequências de actina em Apicomplexas.** A tabela indica as porcentagens de identidade e similaridade das actinas de *Plasmodium falciparum* ACT1; *Plasmodium falciparum* ACT2; *Babesia bovis*; *Eimeria tenella*; *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. NcAct é idêntica à TgACT1.

		Pf-ACT2	Bb-Act	Et-Act	Tg-ACT1	NcAct
Pf-ACT1	Identidade	78%	85%	92%	93%	<u>93%</u>
	Similaridade	91%	93%	97%	97%	<u>97%</u>
Pf-ACT2	Identidade		77%	80%	80%	<u>80%</u>
	Similaridade		89%	92%	92%	<u>92%</u>
Bb-Act	Identidade			86%	86%	<u>86%</u>
	Similaridade			94%	94%	<u>94%</u>
Et-Act	Identidade				97%	<u>97%</u>
	Similaridade				99%	<u>99%</u>
Tg-ACT1	Identidade					<u>100%</u>
	Similaridade					<u>100%</u>

A sequência proteica NcAct também foi alinhada com a β -actina de macaco-verde (*Cercopithecus aethiops*) (GenBank BAA20266.1), espécie que derivou linhagem de células Vero, utilizada para manutenção de *N. caninum* (figura 5). A porcentagem de similaridade e identidade entre NcAct e Actina de Vero é 93% e 83%.

Figura 5 – **Alinhamento das sequências proteicas da actina de *N. caninum* e β -actina de *Cercopithecus aethiops* (Célula Vero).** As sequências alinhadas, pela ordem, são: 1_ β -actina de *Cercopithecus aethiops* (células Vero); 2_actina de *Neospora caninum* (NcAct). Aminoácidos destacados em preto representam identidade total e aminoácidos destacados em cinza representam similaridade. A barra em vermelho destaca a posição da sequência NcAct₂₀₁₋₃₁₀ em uma região menos conservada entre as duas sequências.

4.3 Clonagem e expressão

Para a clonagem e expressão da sequência contendo os aminoácidos 201 a 310 (NcAct₂₀₁₋₃₁₀), foram delineados dois pares de primers externos à região de transcrição, representados na figura 6 em vermelho e rosa na sequência NcAct (região em azul e verde da figura 6).

Figura 6 – Representação da localização dos **primers** delineados para clonagem de NcAct. Os dois pares de *primers* foram delineados conforme a localização representada na sequência. No retângulo vermelho, a localização do *primer* NcAct_F. No retângulo lilás, a localização do *primer* NcAct_R. Nos retângulos azul e verde, a localização dos *primers* NcAct_F_BamHI e NcAct_R_HindIII, respectivamente. Grifado em amarelo, o íntron. Nas setas, as regiões de início e fim da transcrição.

4.3.1 Clonagem do fragmento NcAct-base

O cDNA obtido por transcrição reversa a partir de RNA foi utilizado na PCR para amplificação do fragmento de NcAct-base (figura 7). O fragmento já amplificado foi clonado no plasmídeo pGEM® - T *Easy*, que, em seguida, foi submetido à digestão, sendo detectado o fragmento de aproximadamente 1200 pb (o esperado seria 1173 pb).

Figura 7 – **Amplificação por PCR do fragmento NcAct-base.** O fragmento NcAct-base foi amplificado por PCR, resultando em fragmentos de tamanho esperado. Em gel de agarose 0,8%. O fragmento NcAct-base foi amplificado a partir de cDNA de *N. caninum*, utilizando-se os primers NcAct_F e NcAct_R. Nos poços: 1 = Marcador molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix); 2 = amostra após PCR. Marcador molecular indicando 6000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800 e 500 pares de bases (pb). Na seta, o fragmento de interesse amplificado.

4.3.2 Clonagem do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀

O fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi amplificado por PCR (figura 8) utilizando como fonte de DNA o fragmento NcAct-base ligado ao plasmídeo pGEM® - T *Easy*, mostrado no item anterior. Os fragmentos obtidos a partir da PCR foram clonados em pGEM® - T *Easy* e submetidos à reação de digestão, permitindo a detecção de um fragmento um pouco maior que 250 pb em gel de agarose 0,8%, sendo esperado 327 pb (figura 9). Após clonagem em pGEM/pET e posterior digestão do mesmo com *BamH* I e *Hind* III (figura 10, A) foi confirmada a presença de inserto entre 250 e 500 pb (esperado 327 pb). Para confirmação do resultado, outra digestão foi realizada no plasmídeo pGEM/pET recombinante, agora com a enzima *Pst* I (figura 10, B), liberando os fragmentos de 788 e 281 pb, que correspondem à sequência do pET 28 mais parte do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀, uma vez que este fragmento é digerido pela enzima *Pst* I na posição 819 pb (figura 10, C).

Figura 8 – **Amplificação por PCR do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀**. O fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi amplificado por PCR, resultando em fragmentos de tamanho esperado. Em gel de agarose 0,8%. O fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi amplificado com base no fragmento NcAct-base ligado ao pGEM® - T Easy, utilizando-se os primers NcAct_F_BamHI e NcAct_R_HindIII. Nos poços: 1 = Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2 = amostra após PCR. Marcador molecular indicando 250, 500, 750, 1000, 1500, 3000 e 6000 pares de bases (pb). Na seta, o fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ amplificado.

Figura 9 – **Digestão do plasmídeo pGEM® - T Easy com as enzimas BamH I e Hind III após ligação com o fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀**. A digestão do plasmídeo liberou um fragmento de tamanho esperado, ou seja, 327 pb. Em gel de agarose 0,8%. O plasmídeo pGEM® - T Easy recombinante foi digerido com as enzimas BamH I e Hind III e liberou o fragmento de interesse. Nos poços: 1 = Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2 = amostra digerida. Marcador molecular indicando 250, 500, 750, 1000, 1500, 2500, 3000, 3500, 4000 e 6000 pares de bases (pb). Na seta, o fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀.

Figura 10 – Digestão do plasmídeo pGEM/pET recombinante. As digestões confirmaram a ligação do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ no plasmídeo pGEM/pET. Em gel de agarose 0,8%. Nos poços: 1 = Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2 = amostras após digestões. **A)** O plasmídeo pGEM/pET recombinante foi digerido com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III, liberando o fragmento de interesse, com tamanho esperado de 327 pb. O marcador molecular indicando 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000 e 6000 pares de bases (pb). Na seta, o fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀. **B)** O plasmídeo recombinante pGEM/pET foi digerido com a enzima *Pst* I e liberou os fragmentos apontados nas setas com os símbolos *, & e #, cujos tamanhos esperados eram de 3000, 788 e 281 pb, respectivamente. **C)** Representação esquemática do plasmídeo pGEM/pET ligado ao fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀, mostrando os sítios de restrição para a enzima *Pst* I. Os símbolos *, & e # correspondem aos fragmentos apontados em B).

4.3.3 Expressão heteróloga do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀

O plasmídeo pGEM/pET, contendo o fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀, transformado em cepa de *E. coli* BL21 (DE3) e induzido com IPTG gerou proteína recombinante de aproximadamente 20 kDa, que permaneceu predominante nos corpos de inclusão obtidos no extrato proteico por sonicação com tampão Ureia 8 M em todas as concentrações de IPTG testadas (figura 11).

Após purificação em coluna de níquel, a proteína recombinante foi recuperada em quantidade significativa, apesar de alguns contaminantes que aparecem como bandas fracas com pesos moleculares de aproximadamente 50 ou 150 kDa, assim como uma banda próxima de 20 kDa um pouco abaixo da banda de interesse (figura 12).

Figura 11 – **Expressão das proteínas recombinantes NcAct₂₀₁₋₃₁₀ com variação na concentração de IPTG.** Géis de acrilamida 12,5% corados por coomassie G-250. A proteína recombinante NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi expressa sob diferentes concentrações de IPTG por 2 horas a 37°C e permaneceu solúvel em tampão Ureia 8 M em todas as induções apresentando-se como uma banda evidente em arroximadamente 20 kDa. Poços 2 a 4= amostras não induzidas, poços 5 a 7= 1mM IPTG, poços 8 a 10= 0,5 mM IPTG, poços 12 a 14= 0,25 mM IPTG, poços 15 a 17= 125 uM IPTG, 18 a 20 = 62,5uM IPTG. Nos poços: 1 e 11 = marcador molecular (*Precision Plus Protein™ Standard*); 2, 5, 8, 12, 16, 18 = Amostras em tampão Tris-Cl; 3, 6, 9, 13, 17, 19 = Amostras em Triton X-100; 4,7,10,14,18,20 = Em tampão ureia 8 M; Os retângulos vermelhos indicam as bandas de expressão.

Figura 12 – **Purificação da proteínas recombinantes NcAct₂₀₁₋₃₁₀.** Gel de acrilamida 12,5% corado por coomassie G-250. Purificação em coluna de níquel da amostra sonicada com tampão ureia 8 M após expressão induzida por 1 mM de IPTG a 37°C por 2 horas. É possível visualizar a banda correspondente à proteína recombinante em arroximadamente 20 kDa assim como alguns contaminantes que aparecem um pouco abaixo da banda de interesse e também como bandas de arroximadamente 50 e 150 kDa. Nos poços: 1 = marcador molecular (*Precision Plus Protein™ Standard*, BioRad); 2 a 6 = alíquotas eluídas em tampão ureia 8 M pH 4,5. Marcador molecular indicando 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 quilodáltons (kDa). O retângulo vermelho indica as bandas de expressão purificadas enquanto que as flechas indicam algumas bandas de contaminantes.

4.4 Caracterização da actina nativa de *N. caninum* (NcAct) por *western blot* e SDS-PAGE

4.4.1 SDS-PAGE e *Western blot* 1D

O anticorpo monoclonal IgG₁ anti-β-actina C4 reagiu com o extrato de *N. caninum* em *western blot*, apresentando duas bandas de aproximadamente 43 e 45 kDa nos extratos de *N. caninum* em tampão de estabilização de actina e tampão de amostra (figura 13, B, poços 2 e 4) e 43 kDa nos extratos de células Vero (figura 13, B, poços 1 e 3). As bandas correspondentes também puderam ser visualizadas em gel de acrilamida 10% (figura 13, A).

Figura 13 – **Localização da actina nativa de *N. caninum* (NcAct) a partir de eletroforese em gel de acrilamida e *western blot* 1D.** **A)** Gel de acrilamida contendo extratos de *N. caninum* e células Vero em tampão de estabilização de actina, onde é possível visualizar as bandas correspondentes àquelas identificadas por *western blot*. Gel de acrilamida 10% corado por coomassie G-250. Nos poços: 1 = marcador molecular (*Precision Plus Protein™ Standard Dual Color*); 2 = extrato de células Vero (V); 3 = extrato de *N. caninum* (Nc). Marcador molecular indicando 37, 50, 75, 100, 150 e 250 quilodáltons (kDa). O retângulo vermelho indica as bandas correspondentes às actinas. **B)** *Western blot* com extrato de *N. caninum* ou células Vero em tampão de estabilização de actina e tampão de amostra, reagindo com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4. Em ambos os tampões os extratos de *N. caninum* revelam duas bandas de 43 e 45 kDa, enquanto que os extratos de Vero apresentam uma banda de 43 kDa. Nos poços: 1 = extrato de células Vero (V) em tampão de estabilização de actina; 2 = extrato de *N. caninum* (Nc) em tampão de estabilização de actina; 3 = extrato de células Vero (V) em tampão de amostra; 4 = extrato de *N. caninum* em tampão de amostra, marcador molecular à esquerda.

4.4.2 SDS-PAGE e *Western blot* 2D

O *western blot* bidimensional realizado a partir do extrato de *N. caninum* revelou uma série de *spots* com pls variando de 5,2 a 5,8, dispostos em duas fileiras com diferentes massas moleculares variando em torno de 45 kDa (figura 14, B). Esse padrão pode ser localizado no gel de acrilamida 2D (figura 14, A). Já o *western blot* bidimensional com o extrato de células Vero mostrou três *spots* com pls de 5,2 a 5,7 e aproximadamente 43 kDa (figura 14, D), que também puderam ser localizados no gel de acrilamida 2D (figura 14, C).

Figura 14 – **Localização da actina nativa de *N. caninum* (NcAct) em a partir de eletroforese em gel de acrilamida (A e C) e *western blot* 2D (B e D).** **A)** Extrato de *N. caninum* em 40% de tampão de estabilização de actina e 60% de tampão de amostra em gel de acrilamida 12,5% 2D corado com coomassie blue R. O retângulo vermelho indica os *spots* correspondentes à actina, revelados por *western blot*. **B)** *Western blot* de extrato de *N. caninum* em 40% de tampão de estabilização de actina e 60% de tampão de amostra reagindo com anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 (1:2000) e conjugado anti-camundongo (1:8000). Na seta, os *spots* revelados pelo anticorpo, que correspondem a uma série de *spots* com variados pls e massas moleculares. **C)** Extrato de células Vero em 50% de tampão de estabilização de actina e 50% de tampão de amostra em gel de acrilamida 12,5% 2D corado com coomassie blue R. O retângulo vermelho indica os *spots* correspondentes à actina, revelados por *western blot*. **D)** *Western blot* de extrato de células Vero em 50% de tampão de estabilização de actina e 50% de tampão de amostra com anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 (1:2000) e conjugado anti-camundongo (1:8000). Na seta, os *spots* revelados pelo anticorpo, formando uma fileira com três *spots* apresentando pls variados. Em todas as figuras, marcador molecular à esquerda indicando 15, 20, 25, 37, 50, 75 e 150 quilodáltons (kDa).

4.4.3 Espectrometria de massas (MS/MS)

Os *spots* e bandas analisados por espectrometria de massas (MS/MS) estão destacados na figura 15. Foram analisados três *spots* provenientes do gel 2D de extrato de células Vero (figura 15, A), nove *spots* do gel 2D de *N. caninum* (figura 15, B) e três bandas do gel 1D, sendo uma do extrato de células Vero e duas de *N. caninum* (figura 15, C). As análises dessas bandas e *spots* revelaram a presença de actina de diversas espécies nos extratos de células Vero a partir da busca no banco NCBI (tabela 15), já a busca dessas mesmas amostras no banco ToxoDB 6.4 não revelou a presença de actina de *N. caninum*. A análise das bandas e *spots* de géis contendo extrato de *N. caninum* mostrou que a actina cujo acesso é NCLIV_003440, NcAct, aparece em todos os resultados (tabela 8). A busca no NCBI do extrato de *N. caninum* não deixa claro se a banda e *spots* de menor peso molecular são de origem da Vero, pois há *hits* tanto para mamíferos e peixes como para *T. gondii* e outros parasitas, podendo representar uma mistura de NcAct e actina de Vero ou apenas NcAct. Os peptídeos envolvidos nas identificações da actina NCLIV_003440 (NcAct) e das actinas encontradas no NCBI estão listados na tabela 9. Quando listados os peptídeos obtidos a partir dos *spots* 1B a 6B que foram identificados como NcAct (em ToxoDB) e os peptídeos identificados como pertencentes a outras actinas (em NCBI), a maior parte deles mostra-se pertencente à NcAct, enquanto que os peptídeos dos *spots* 7B a 9B identificados como NcAct são minoria.

Figura 15 – **Spots e bandas excisados dos géis de acrilamida 1D e 2D para análise em espectrometria de massas.** **A)** Extrato de células Vero em 50% de tampão de estabilização de actina e 50% de tampão de amostra em gel de acrilamida 12,5% 2D corado com coomassie blue R. Marcador molecular indicando 15,20,25,37,50 e 75 quilodáltons (kDa). Setas de 1 a 3 indicam os *spots* excisados do gel.. **B)** Extrato de *N. caninum* em 40% de tampão de estabilização de actina e 60% de tampão de amostra em gel de acrilamida 12,5% 2D corado com coomassie blue R. Marcador molecular indicando 15, 20, 25, 37, 50 e 75 quilodáltons (kDa). Setas de 1 a 9 indicam os *spots* excisados do gel. **C)** Extratos de *N. caninum* e células Vero em tampão de estabilização de actina. Gel de acrilamida 10% 1D corado por coomassie G-250. Nos poços: 1 = marcador molecular (*Precision Plus Protein™ Standard Dual Color*); 2 = extrato de células Vero (V); 3 = extrato de *N. caninum* (Nc). Marcador molecular indicando 37, 50, 75, 100, 150 e 250 quilodáltons (kDa). Setas de 1 a 2 indicam as bandas excisadas do gel.

Tabela 8 – **Identificação dos spots e bandas por espectrometria de massas.** Estão listadas as actinas identificadas em cada amostra após busca em NCBI e ToxoDB e os seus respectivos scores. Todas as amostras de *N. caninum* e Vero apresentaram resultados de actina em NCBI e apenas as amostras de Vero não apresentaram resultados de actina em ToxoDB. A numeração dos spots/bandas está de acordo com a numeração representada na figura 15: o número corresponde à numeração atribuída aos spots ou bandas de cada gel e a letra, à identificação do gel. Na coluna Identificação NCBI foram citados os resultados com maior score.

	Dimensão do gel	Spots/bandas	Identificação NCBI	Score NCBI	Identificação ToxoDB	Score ToxoDB
Vero	1D	1C	2724046 – β -actina (<i>Mustela putorius furo</i>)	210	Sem identificação	
		1A	1703123 - Actina, citoplasmática tipo 5	605,08	Sem identificação	
	2D	2A	49868 - actina, putativa (aa 27 a 375) (<i>Mus musculus</i>)	320,75	Sem identificação	
		3A	1703106 - Actina-1	299,06	Sem identificação	
<i>N. caninum</i>	1D	2C	Actina, cytoplasmic 1 (<i>Osmerus mordax</i>)	249	NCLIV_003440	915,23
		3C	237840731 - actina (<i>T. gondii</i>)	157	NCLIV_003440	331,17
	2D	1B	321227373 - Actina (<i>Kazachztania exigua</i>)	34	NCLIV_003440	33,26
		2B	319893874 - α -actina (<i>Pachycentron canadum</i>)	54	NCLIV_003440	96,88
		3B	2724046 - β -actina (<i>Mustela putorius furo</i>)	98	NCLIV_003440	465,31
		4B	124806845 - actina (<i>P. falciparum</i>)	80	NCLIV_003440	675,66
		5B	237840731 - actina (<i>T. gondii</i>)	89	NCLIV_003440	705,17
		6B	86562730 - actina (<i>Symbiodinium</i> sp.)	39	NCLIV_003440	90,5
		7B	161376754 - actina (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	231	NCLIV_003440	203,3
		8B	161376754 - β -actina (<i>Rachycentron canadum</i>)	236	NCLIV_003440	256,99
		9B	161376754 - β -actina (<i>Rachycentron canadum</i>)	170	NCLIV_003440	203,3

Tabela 9 – **Peptídeos obtidos na identificação por espectrometria de massas (MS/MS) dos spots excisados do gel de acrilamida 2D contendo extrato de *N. caninum*.** Peptídeos originados da digestão com tripsina e identificados por espectrometria de massas como componentes da sequência da actina NCLIV_003440 (em vermelho), dos resultados da busca no NCBI (em preto) e peptídeos em comum com ambos (em verde). Dos spots 1B a 6B maior parte dos peptídeos foi identificada como NcAct (em ToxoDB), enquanto que nos spots 7B a 9B diferença diminui.

Spots (2D) <i>N. caninum</i>	Peptídeos		
1B	AGVAGDDAPR DCYVGDEAQS		
2B	AGVAGDDAPR LTKELTSLAPSTMK ELTSLAPSTMK IWHHTFYNELR VAPEEHPVLLTEAPLNPK DCYVGDEAQS	VVAPPERK LDLAGRDLTEYMMK IKVVAPPERK	
3B	SYELPDGNIITVGNER GGTTMYEGIGER LCYIALDFDEEMK VAPEEHPVLLTEAPLNPK AVFPSIVGKPK DCYVGDEAQS ELTSLAPSTMK	AGVAGDDAPR NPGIMVGMEEK IWHHTFYNELR TTFDSIMK DLTEYMMK NPGIMVGMEEKDCYVGDEAQS EEYDESGPSIVHR	YPIEHGIVTNWDDMEK TVLSGGTTMYPGIADR
4B	CPEALFQPSFLGK SYELPDGNIITVGNER DCYVGDEAQS KDLYGNVVLSSGGTTMYEGIGER AGVAGDDAPR VAPEEHPVLLTEAPLNPK VVAPPER LCYIALDFDEEMK NPGIMVGMEEK	IWHHTFYNELR AVFPSIVGKPK NPGIMVGMEEKDCYVGDEAQS ELTSLAPSTMK GYGFTTSAEKEIVR DCYVGDEAQS GYGFTTSAEK AAEDSSDIEK DLTEYMMK	GEEDVQALVVDNGSGNVK YELPDGNIITVGNER YPIEHGIVTNWDDMEK TTFDSIMK
5B	DCYVGDEAQS KDLYGNVVLSSGGTTMYEGIGER SYELPDGNIITVGNER AGVAGDDAPR LCYIALDFDEEMK ELTSLAPSTMK DLTEYMMK GYGFTTSAEK	AVFPSIVGKPK CPEALFQPSFLGK VAPEEHPVLLTEAPLNPK IWHHTFYNELR NPGIMVGMEEK LTKELTSLAPSTMK VVAPPERK VVAPPER	NPGIMVGMEEKDCYVGDEAQS GYGFTTSAEKEIVR NPGIMVGMEEKDCYVGDEAQS IKVVAPPERK FRCPEALFQPSFLGK YPIEHGIVTNWDDMEK TTFDSIMK
6B	AGVAGDDAPR VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGNIITVGNER	NPGIMVGMEEKDCYVGDEAQS ELTSLAPSTMK GYGFTTSAEK	

7B	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	EEEIAALVVDNGSGMCK	GYSFTTTAER
	NPGIMVGMEEK	AGFAGDDAPR	SYELPDGQVITIGNER
	IWHHTFYNELR	AVFPSIVGRPR	KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR
	AVFPSIVGKPK	HQGVMVGMGQK	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
	DCYVGDEAQSK	DLTDYLMK	EITALAPSTMK
8B	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	ELTS LAPSTMK	KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR
	IWHHTFYNELR	EEEIAALVVDNGSGMCK	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
	AGVAGDDAPR	HQGVMVGMGQK	
	NPGIMVGMEEK	DLTDYLMK	
	AVFPSIVGKPK	GYSFTTTAER	
	DCYVGDEAQSK	SYELPDGQVITIGNER	
9B	IWHHTFYNELR	AGVAGDDAPR	DLTDYLMK
	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	EEEIAALVVDNGSGMCK	SYELPDGQVITIGNER
	DCYVGDEAQSK	EITALAPSTMK	KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR
	GYGFTTSAEK		

4.5 Imunofluorescência

O anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 reconheceu a actina de taquizoítas de *N. caninum* previamente purificados e tratados com JAS e Cyt D e nos controles tratados com 1% de DMSO e RPMI 1640. A marcação com o anticorpo anti- β -actina C4 (1:500) e Alexa Fluor® 488 (2,5 μ l/ml) em taquizoítas controle revelou uma localização periférica da NcAct, próxima à membrana plasmática (figuras 16 e 17, nas setas). Em taquizoítas tratados com 1% de DMSO a localização da actina aparece um pouco mais pontual e dispersa pelo citoplasma quando comparada à actina de taquizoítas tratados com RPMI 1640.

Em taquizoítas tratados com 5 μ M de JAS, essa mesma marcação revelou um padrão pontual da NcAct pelo citoplasma das células (figura 18). Os “pontos” de actina estão dispostos tanto na região apical (figura 18, C, seta1) quanto na posterior (figura 18, C, seta2). Já taquizoítas tratados com 2 μ M de Cyt D apresentaram uma marcação menos intensa e homogênea pelo citoplasma dos taquizoítas (figura 19, nas setas).

Figura 16 – **Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* em RPMI 1640.** Taquizoítas purificados e mantidos em RPMI 1640 por 15 minutos a 37°C, marcados com anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 e visualizados por Alexa Fluor® 488. Núcleo marcado com iodeto de propídeo (IP). A marcação revelou uma localização periférica de actina, (setas). **A)** Marcação do núcleo com 0,5 μ M de iodeto de propídeo. **B)** Marcação da NcAct com anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 1:500 e Alexa Fluor® 488 2,5 μ l/ml. **C)** Sobreposição das figuras A e B. As barras representam 5 μ m.

Figura 17 – Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* tratados com DMSO 1%. Taquizoítas purificados tratados com 1% de DMSO por 15 minutos a 37°C, marcados com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 e visualizados por Alexa Fluor® 488. Núcleo marcado com iodeto de propídeo (IP). A marcação revelou uma localização de actina dispersa no citoplasma com maior parte localizada na perifeira (setas). **A)** Marcação do núcleo com 0,5 μM de iodeto de propídeo. **B)** Marcação da NcAct com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 1:500 e Alexa Fluor® 488 2,5 μl/ml. **C)** Sobreposição das figuras A e B. As barras representam 5 μm.

Figura 18 – Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* tratados com 5 μM de jasplakinolida. Taquizoítas purificados tratados com 2 μM de JAS por 15 minutos a 37°C, marcados com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 e visualizados por Alexa Fluor® 488. Núcleo marcado com iodeto de propídeo (IP). A marcação revelou um padrão pontual de actina nas regiões apical e posterior (seta 1) ou somente na região apical (seta 2). **A)** Marcação do núcleo com 0,5 μM de iodeto de propídeo. **B)** Marcação da NcAct com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 1:500 e Alexa Fluor® 488 2,5 μl/ml. **C)** Sobreposição das figuras A e B. As barras representam 5 μm.

Figura 19 – **Imunolocalização de NcAct por microscopia confocal em taquizoítas de *N. caninum* tratados com 2 µM de citocalasina D.** Taquizoítas purificados tratados com 2 µM de Cyt D por 15 minutos a 37°C, marcados com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 e visualizados por Alexa Fluor® 488. Núcleo marcado com iodeto de propídeo (IP). A marcação mostrou uma localização da actina dispersa pelo citoplasma (setas). **A)** Marcação do núcleo com 0,5 µM de iodeto de propídeo. **B)** Marcação da NcAct com anticorpo monoclonal anti-β-actina C4 1:500 e Alexa Fluor® 488 2,5 µl/ml. **C)** Sobreposição das figuras A e B. As barras representam 5 µm.

4.6 Fracionamento da actina-G e actina-F

O ensaio de fracionamento da actina-G e actina-F por ultracentrifugação a 100.000 x g com taquizoítas tratados com JAS ou DMSO (controle) permitiu a observação tanto da porção solúvel (sobrenadante) em tampão com detergente, quanto da porção insolúvel (pellet), ou seja, a actina-G presente na porção solúvel e a actina-F na insolúvel em ambos os tratamentos. No controle, a banda contendo actina-G (figura 20, poço 1) aparece aproximadamente com a mesma intensidade que a banda contendo actina-F (figura 20, poço 2). Já após o tratamento com 20 μ M de JAS, a intensidade da banda de actina-F (figura 20, poço 4) aparece nitidamente mais intensa que a banda de actina-G (figura 20, poço 3), indicando polimerização da actina dos taquizoítas. Quando os resultados do *western blot* mostrado na figura 20 é analisado do ponto de vista das isoformas de NcAct, é possível notar que as bandas de actina-F aparecem com a massa molecular menor, quando comparadas às bandas correspondentes às actina-G.

Figura 20 – **Ensaio de fracionamento da actina em suas formas monomérica (actina-G) e filamentosa (actina-F) por ultracentrifugação.** Fracionamento da actina-G e actina-F por ultracentrifugação a 100.000 x g em tampão de estabilização da actina adicionado de 10% de glicerol, 1% de Triton X-100 e inibidor de protease. *Western blot* com anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 (1:2000) e conjugado anti-camundongo (1:8000). No controle, as bandas correspondentes a actina-G e actina-F aparecem na mesma intensidade, enquanto que após o tratamento com JAS a intensidade da banda de actina-F aumenta, em relação à banda de actina-G. Nos poços: 1 = sobrenadante a partir de taquizoítas controle tratados com 1% DMSO; 2 = pellet a partir de taquizoítas controle tratados com 1% DMSO; 3 = sobrenadante a partir de taquizoítas tratados com 20 μ M de JAS; 4 = pellet a partir de taquizoítas tratados com 20 μ M de JAS. Marcador molecular indicando 20, 25, 37 e 50 quilodáltons (kDa).

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho iniciaram a caracterização da actina de *N. caninum* (NcAct), proteína essencial para o processo de motilidade por deslizamento em parasitas Apicomplexas (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996), até então pouco investigada nessa espécie.

Inicialmente, a actina cujo acesso é NCLIV_003440 (NcAct) foi selecionada dentre quatro possíveis sequências que também são descritas como actina no banco de dados ToxoDB (tabela 5). A seleção foi baseada na homologia com a actina de *T.gondii* (TgACT1).

O fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi clonado e expresso em *E. coli* BL21 (DE3). A escolha do fragmento entre os aminoácidos 201 e 310 foi feita por duas razões. A primeira devido a tentativas anteriores, sem sucesso, de expressar a sequência completa de NcAct, ligada ao plasmídeo pET-28a(+), em *E. coli* BL21 (DE3), o que forçou a busca de novas estratégias. Uma das hipóteses levantadas para tal insucesso foi que a presença de vários códons raros para *E. coli* na sequência NcAct impossibilitava a sua tradução pela cepa BL21 (DE3). A partir do mapeamento de códons raros foram delineados *primers* que abrangessem uma região com menos códons desse tipo. A segunda razão para a escolha do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi a seleção de uma região com certa divergência em relação à β -actina de células Vero (figura 5), visando uma futura confecção de anticorpo que seja o mais específico possível.

A indução da expressão do fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ foi feita a 37°C por 2 horas em células *E. coli* BL21 (DE3) sob diversas concentrações de IPTG. Em todas as induções o fragmento foi expresso e a proteína traduzida permaneceu insolúvel, aparecendo somente em tampão Ureia 8 M. Tentativas de obtenção de proteína recombinante solúvel foram feitas a 24°C, com as mesmas concentrações de IPTG, porém His-NcAct₂₀₁₋₃₁₀ permaneceu em tampão Ureia 8 M (resultados não mostrados).

Também foi realizado o alinhamento das sequências proteicas de alguns parasitas Apicomplexas com a NcAct. Dentre as actinas de *Plasmodium falciparum*, a PfACT1, que é expressa tanto nos estágios sanguíneos assexuados, quanto nas formas sexuadas, e a PfACT2, estágio-específica e expressa predominantemente em estágios sexuais (WESSELING et al., 1989), a PfACT1 apresenta identidade/similaridade maiores que a PfACT2, 93%/97% da primeira contra

80%/92% da última. Essa diferença pode ser explicada pela maior relação evolucionária da PfACT2 com α -actina (muscular) do que com a β -actina (citoplasmática) de vertebrados (WESSELING et al., 1988, 1989).

A partir dos alinhamentos, e em concordância com SKILMAN e colaboradores, 2011, nota-se a presença dos resíduos de aminoácido K/R 270 em todas as sequências, com exceção da BbACT, e do resíduo G200 em PfACT1, EtACT, TgACT1e NcAct. Esses aminoácidos foram apontados como críticos para a instabilidade dos filamentos de actina de parasitas Apicomplexas, uma vez que a presença de ambos os resíduos na mesma sequência só aparece em parasitas desse filo. (SKILLMAN et al., 2011).

A sequência de TgACT1 é idêntica à NcAct, entretanto, quando comparados os resultados de imunodeteção por *western blot*, a partir de taquizoítas, utilizando o anticorpo monoclonal anti- β -actina C4, que reconhece um epitopo altamente conservado da actina (LESSARD, 1988), TgACT1 aparece como uma única banda de 44 kDa (DOBROWOLSKI et al., 1997) enquanto que NcAct mostra-se em duas bandas de aproximadamente 43 e 45 kDa (preditos 41,9 kDa), confirmadas após permeabilização dos taquizoítas em dois tampões diferentes (tampão de amostra e tampão de estabilização de actina). Esses resultados permitem deduzir que, apesar da identidade de 100%, ambas as espécies apresentam diferenças no processamento pós-traducional dessa proteína. Porém, para afirmações mais conclusivas há a necessidade de um anticorpo mais específico, uma vez que o anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 pode reconhecer actinas de todas as espécies, havendo a possibilidade de reconhecer a actina de células Vero na banda inferior do *western blot*.

Investigando uma pouco mais a característica, até então única em Apicomplexas, da NcAct de apresentar-se em mais de uma banda no *western blot*, o extrato de *N. caninum* foi submetido ao *western blot* a partir de géis de acrilamida 2D e revelou uma série de isoformas da actina, com pls variando de 5,2 a 5,8 e massas moleculares concordando com *blot* 1D. Nove *spots* foram analisados por espectrometria de massas, que confirmou sua identidade como NcAct, descartando a presença de isoformas decorrentes da modulação da expressão de mais de um gene, como ocorre em *Plasmodium falciparum* (WESSELING et al., 1988). Essa característica de NcAct de apresentar-se em vários *spots* em géis 2D, com diferentes pls já havia sido relatada em um estudo sobre o mapa de eletroforese 2D

de *N. caninum* (LEE et al., 2003). Em protozoários, diferentes isoformas, visualizadas por *western blot* 2D já foram descritos em *Trypanosoma cruzi* (CEVALLOS et al., 2011) e *Dictyostelium discoideum* (KISHI et al., 1998). Isoformas de actina em função de modificações pós-traducionais já foram descritas em *Drosophyla*, cujo *western blot* com anticorpo anti-actina específico revela duas bandas, uma de 42 e outra de 51 kDa, sendo a maior, a *arhrin*, modificada por ubiquitinação (BURGESS et al., 2004). Outras modificações pós-traducionais já foram caracterizadas em actinas como arginilação (KARAKOZOVA et al., 2006), acetilação (KIM et al., 2006), fosforilação (GU et al., 2003; KISHI et al., 1998), carbonilação (CASTRO et al., 2012), s-nitrosilação (LU et al., 2009), metilação (NYMAN et al., 2002) e glutationilação (PIZARRO & OGUT, 2009). Vale ressaltar que nenhuma modificação desse tipo foi descrita em actina de Apicomplexas até o momento, e uma análise mais minuciosa dos espectros obtidos não permitiu chegar a conclusões sobre qual tipo (ou quais tipos) de modificações pós-traducionais NcAct está sofrendo.

Drogas que atuam na actina, como jasplakinolida (JAS) (BUBB et al., 1994) e citocalasina D (CytD) (COOPER, 1987), vêm sendo amplamente utilizadas em ensaios com Apicomplexas. Por atuarem na polimerização (JAS) ou despolimerização (CytD) da actina, essas drogas são utilizadas com o objetivo de elucidar mecanismos envolvendo a actina e sua função na motilidade por deslizamento. JAS e CytD foram utilizadas no presente trabalho em ensaio de localização da NcAct em taquizoítas tratados ou não com essas drogas e ficou evidente que ambas alteram o padrão de distribuição da NcAct. Em taquizoítas tratados com 5 μ M de JAS, NcAct apareceu em uma ou duas regiões pontuais de actina pelo citoplasma, provavelmente causadas pela sua polimerização, sem estarem, necessariamente, localizadas na região apical. Não foram visualizadas protrusões apicais, ou seja, prolongamentos do citoplasma na região apical do parasita, como foram observados em taquizoítas de *T. gondii* (SHAW & TILNEY, 1999; WETZEL et al., 2003; AGRISANO et al., 2012) e merozoítas de *P. falciparum* (MIZUNO et al., 2002) e merozoítas, esporozoítas e oocinetos de *Plasmodium berghei* (AGRISANO et al., 2012), este último utilizado uma anticorpo específico contra um epitopo conservado entre as sequências proteicas da actina de Apicomplexas (aminoácidos 239 a 253 em *T. gondii*), que diferencia-se da actina não muscular de mamíferos. Em WETZEL e colaboradores (2003), o tratamento

com 2 μ M de JAS de taquizoítas de *T. gondii* transgênicos que expressavam YFP-ACT1 resultou em uma marcação polarizada nas regiões apical e posterior da célula, indicando que a localização dos filamentos após tratamento com JAS não ocorrem somente na região apical.

Em taquizoítas tratados com 2 μ M de CytD, NcAct apareceu difusa pelo citoplasma da célula e pouco marcada. Em *P. falciparum*, o tratamento com CytD não alterou a disposição da actina no citoplasma em relação ao controle, isto é, ela permaneceu disposta de maneira homogênea pelo citoplasma (SMYTHE et al., 2008). Taquizoítas de *N. caninum* controle tratados com 1% de DMSO ou somente com RPMI apresentaram uma distribuição pontual abundante da actina predominantemente nas regiões periféricas, próximas à membrana plasmática da célula. Em DOBROWOLSKI et al., 1997, marcações em *T. gondii* com o anticorpo específico anti-ACT1 e também com o anticorpo monoclonal anti- β -actina C4 apresentaram resultados semelhantes entre si, com uma marcação difusa pelo citoplasma que permanecia mais intensa ao redor da célula, com preferência de TgACT1 pelas regiões apical e posterior do taquizoítas. Anteriormente, alguns trabalhos reportaram que a actina de *T. gondii* encontrava-se principalmente na região apical do parasita (CINTRA & De SOUZA, 1985; ENDO et al., 1988; YASUDA et al., 1988).

É conhecido que a formação de filamento de actina é essencial para o processo de invasão e locomoção de *T. gondii* (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996) e que, apesar dessa importância, grande parte da actina encontrada em *T. gondii* estão na forma monomérica, sem detecção dos filamentos por sedimentação (DOBROWOLSKI et al., 1997). Em *N. caninum*, um ensaio preliminar de visualização física por *western blot* das porções de actina solúvel e insolúvel em detergente através do seu fracionamento por ultracentrifugação a 100.000 x g por 1 hora foi realizado nesse trabalho e sugere que a actina se encontra em quantidades equilibradas de actina-G e actina-F na célula e confirma os resultados de imunofluorescência, de que a JAS apresenta efeito sobre a actina desse parasita, sendo possível a detecção dos filamentos. Apesar da concentração de JAS extremamente alta utilizada nesse ensaio, quando comparada a concentrações utilizadas em outros trabalhos com Apicomplexas (SAHW & TILNEY, 1999; POUPEL & TARDIEUX, 1999; DOBROWOLSKI et al., 1997) e da actina de *T. gondii* ter-se mostrado sensível a doses baixas de até 0,031 μ M de JAS (WETZEL et al., 2003), o

ensaio realizado com a NcAct já é um indicativo da ação dessa droga sobre a citada proteína. Além disso, como NcAct apresenta-se no *western blot* 1D como duas bandas de tamanhos diferentes, aparentemente o fracionamento acarreta em separação das isoformas (figura 20).

Neste trabalho a actina de *N. caninum* foi avaliada quanto à sua capacidade de polimerização e despolimerização com o uso de drogas que atuam na dinâmica da actina como a JAS e Cyt D. Para o estudo *in vivo* da dinâmica da actina é necessário prever a regulação desse processo por proteínas denominadas *actin-binding proteins* (ABPs ou proteínas que se ligam à actina), que têm a capacidade de ligar-se à actina e influenciar a dinâmica dessa proteína. Sabe-se que o repertório dessas proteínas em organismos Apicomplexas é reduzido com relação a outros Eucariotos, além disso, a maneira como as APBs influenciam a dinâmica da actina é pouco conhecido (MEHTA & SIBLEY, 2010). A identificação e elucidação do papel dessas proteínas podem contribuir para o entendimento de mecanismos que envolvem a dinâmica da actina em *N. caninum*, podendo revelar potenciais alvos terapêuticos para o controle da neosporose.

Os resultados apresentados neste trabalho iniciaram a caracterização da actina de *N. caninum*, indicando a localização dessa proteína em taquizoítas e mostrando que NcAct é sensível a drogas como JAS e CytD. Os resultados mostraram, principalmente que, apesar da sequência proteica de NcAct ser idêntica à de TgACT1, ambas apresentam divergências quanto ao processamento pós-traducional, o que indica que podem divergir também quanto a características funcionais dessas proteínas *in vivo*. As isoformas de actina de *N. caninum* merecem ser investigadas quanto ao tipo de modificação pós-traducional sofrida e o quanto isso interfere na motilidade por deslizamento desse parasita.

6. CONCLUSÕES

- 1) A NcAct é idêntica à TgACT1, com identidade e similaridade de 100% entre ambas. Comparada com outras espécies, a NcAct tem maior identidade/similaridade com a actina de *Eimeria tenella* (97%/99%), seguida da PfACT1 (93%/97%), da actina de *Babesia bovis* (86%/94%) e PfACT2 (80%/92%).
- 2) O fragmento NcAct₂₀₁₋₃₁₀ pode ser expresso pelo plasmídeo pGEM/pET em *E. coli* BL21 (DE3) com 0,0625 a 1 mM de IPTG a 37°C por 2 horas.
- 3) Em sua forma nativa, NcAct apresenta-se em duas bandas de 43 e 45 kDa em gel de acrilamida 1D e em nove isoformas em gel de acrilamida 2D.
- 4) A NcAct, em sua maior parte, localiza-se na região periférica de taquizoítas de *N. caninum*.
- 5) A jasplaskinolida e a citocalasina D alteram a disposição da NcAct em taquizoítas de *N. caninum*.
- 6) A jasplaskinolida é capaz de aumentar a quantidade NcAct polimerizada em taquizoítas de *N. caninum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; GENNRI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 142, p. 71-77, 2006.

ANGRISANO, F.; DELVES, M. J.; STURM, A.; MOLLARD, V.; McFADDEN, G.I.; SINDEN, R. E.; BAUM, J. A GFP-Actin reporter line to explore microfilament dynamics across the malaria parasite lifecycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 182, n. 182, p. 93-96, 2012.

ASADA, M.; GOTO, Y.; YAHATA, K.; YOLOYAMA, N.; KAWAI, S.; INOUE, N.; KANEKO, O.; KAWAZU, S. Gliding Motility of *Babesia bovis* Merozoites Visualized by Time-Lapse Video Microscopy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35227, 2012.

BAUM, J.; PAPENFUSS, A.T.; BAUM, B.; SPEED, T. P.; COWMAN, A. F. A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5197-5208, 2006.

BAUM, J.; RICHARD, D.; HEALER, J.; RUG, M.; KRNAJSKI, Z.; GILBERGER, T. W.; GREEN, J. L.; HOLDER, A. A.; COWMAN, A. F. Regulation of apicomplexan actin-based motility. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 621-628, 2006.

BAUM, J.; TONKIN, C. J.; PAUL, A.S.; RUG, M.; SMITH, B. J. ;GOULD, S. B.; RICHARD, D.; POLLARD, T. D.; COWMAN, A. F. A Malaria Parasite Formin Regulates Actin Polymerization and Localizes to the Parasite-Erythrocyte Moving Junction during Invasion. **Cell host & microbe**, v. 3, n. 3, p. 188-198, 2008.

BERGMAN, L. W.; KAISER, K.; FUJIOKA, H.; COPPENS, I.; DALY, T. M.; FOX, S.; MATUSCHEWSKI, K.; NUSSENZWEIG, V.; KAPPE, S. H. I. Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 1, p. 39-49, 2003.

BILLKER, O.; LOURIDO, S.; SIBLEY, L. D. Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites. **Cell host & 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. **Z Parasitenkd.** v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BRAGA, M. S. C. O.; ANDRÉ, M. R.; JUSI, M. M. G.; FRESCHI, C. R.; TEIXEIRA, M. C.; MACHADO, R. Z. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 107-111, 2012.

BROSSIER, F. et al. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 11, p. 4146-4151, 2005.

BRUHN, F. R. P.; FIGUEIREDO, V. C.; ANDRADE, G. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ROCHA, C. M. B. M.; GUIMARÃES, A. M. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in rural areas in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 161-164, 2012.

BUBB, M. R.; SENDEROWICZ, A. M.; SAUSAVILLE, E. A.; DUNCAN, K. L.; KORN, E. D. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 21, p. 14869-14871, 1994.

BUBB, M. R.; SPECTOR, I.; BEYER, B. B.; FOSEN, K. M. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5163-5170, 2000.

BULLEN, H. E.; TONKIN, C. J.; O'DONNELL, R. A.; THAM, W. H.; PAPENFUSS, A. T.; GOULD, S.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S.; GILSON, P. R. A Novel Family of Apicomplexan Glideosome-associated Proteins with an Inner Membrane-anchoring Role. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 37, p. 25353-25363, 2009.

BUNNELL, T. M.; ERVASTI, J. M. Structural and Functional Properties of the Actin Gene Family. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 21, n. 3, p. 255-266, 2011.

BURGESS, S.; WALKER, M.; KNIGHT, P. J.; SPARROW, L.; SCHIMITZ, S.; OFFER, G.; BULLARD, B.; LEONARD, K.; HOLT, J.; TRINICK, J. Structural Studies of Arthrin: Monoubiquitinated Actin. **Journal of Molecular Biology**, v. 341, n. 5, p. 1161-1173, 2004.

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. Receptor-ligand interaction and invasion: Microneme proteins in apicomplexans. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 33-45, 2008.

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

CASTRO, J. P.; OTT, C.; JUNG, T.; GRUNE, T.; ALMEIDA, H. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 4, p. 916-925, 2012.

CEVALLOS, A. M.; SEGURA-KATO, Y. X.; MERCHANT-LARIOS, H.; MANNING-CELA, R.; HERNÁNDEZ-OSORIO, L. A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; AMBROSIO, J. R.; REYNOSO-DUCOING, O.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi*: Multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 249-259, 2011.

CINTRA, W.; SOUZA, W. D. Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of submicroscopic cytology**, v. 17, n. 4, p. 503-508--, 1985.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Quantitative Detection of *Neospora caninum* in Bovine Aborted Fetuses and Experimentally Infected Mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 4, p. 1473-1478, 1987.

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

DAHER, W.; SOLDATI-FAVRE, D. Mechanisms controlling glideosome function in apicomplexans. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 408-414, 2009.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 99-104, 2002.

DOBROWOLSKI, J. M.; NIESMAN, I. R.; SIBLEY, L. D. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 37, n. 3, p. 253-262, 1997.

DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 933-939, 1996.

DOMINGUEZ, R.; HOLMES, K. C. Actin Structure and Function. **Annual Review of Biophysics**, v. 40, n. 1, p. 169-186, 2011.

DOS REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V.; TSUBAKIHARA, M.; BERRY, D. A.; NOSWORTHY, N.J. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 433-473, 2003.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B.; BARTA, J.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.; BOWMAN, D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.; HOWE, D.; JENKINS, M.; KOBAYASGU, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.; MATTSSON, J.; McALLISTER, M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.; SPEER, C.; TREES, A.; UGGLA, A.; UPTON, S.; WILLIAMS, D.; LINDSAY. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

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

DUBEY JP, HATTEL AL, LINDSAY DS, TOPPER MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J Am Vet Med Assoc.**, v.193(10), p.1259-63, 1988 (a).

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

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

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

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc.** v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988 (b).

DZIERZINSKI, F.; MORTUAIRE, M.; CESBRON-BELAUW, M. F.; TOMAVO, S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 574-582, 2000.

ENDO, T.; YAGITA, K.; YASUDA, T.; NAKAMURA, T. Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 75, n. 2, p. 102-106--, 1988.

FERNANDES, B. C. T. M.; GENNARI, S.; SOUZA, S.; CARVALHO, J.; OLIVEIRA, W.; CURY, M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais - Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.

FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A.; DE PAULA, V.; DIAS, R. SOUZA, S.; GENNARI, S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 161-166, 2004.

FIGUEREDO, L. A.; DANTAS-TORRES, F.; DE FARIA, E. B.; GONDIM, L. F. P.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; MOTA, R. A. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 9-13, 2008.

FRÉNAL, K.; POLONAI, V.; MARG, J. B.; STRATMANN, R.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D.. Functional Dissection of the Apicomplexan Glideosome Molecular Architecture. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 4, p. 343-357, 2010.

FRÉNAL, K.; SOLDATI-FAVRE, D. Role of the Parasite and Host Cytoskeleton in Apicomplexa Parasitism. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 6, p. 602-611, 2009.

GAJRIA, B.; BAHL, A.; BRESTELLI, J.; DOMEER, J.; FISCHER, S.; GAO, X.; HEIGES, M.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; MACKEY, A. J.; PINNEY, D. F.; ROOS, D. S.; STOECKERT, C. J.; WANG, H.; BRUNK, B. P. ToxoDB: an integrated

Toxoplasma gondii database resource. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl 1, p. D553-D556, 2008.

GASKINS, E.; GILK, S.; DeVORE, N.; MANN, T.; WARD, G.; BECKERS, C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Cell Biology**, v. 165, n. 3, p. 383-393, 2004.

GENNARI, S. M. YAI, L.; D'ÁURIA, S.; CARDOSO, S.; KWOK, O.; JENKINS, M.; DUBEY, J. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 177-179, 2002.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; MATEUS-PINILLA, N. E.; PITT, W. C.; MECH, L. D.; NELSON, M. E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1361-1365, 2004a.

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

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A.; SANTOS, P.; JESUS, E.; RIBEIRAO, M.; FERNANDES, H.; ALMEIDA, M.; FREIRE, S.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.

GONDIM, L. S.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M.; GONDIM, L. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 121-124, 2010.

GONZALEZ, V.; COMBE, A.; DAVID, V.; MALMQUIST, N. A.; DELORME, V.; LEROY, C.; BLAZQUEZ, S.; MÉNARD, R.; TARDIEUX, I. Host Cell Entry by Apicomplexa Parasites Requires Actin Polymerization in the Host Cell. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2009

GU, L.; ZHANG, H.; CHEN, Q.; CHEN, J. Calyculin A-induced actin phosphorylation and depolymerization in renal epithelial cells. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 54, n. 4, p. 286-295, 2003.

HÅKANSSON, S.; MORISAKI, H.; HEUSER, J.; SIBLEY, L. D. Time-Lapse Video Microscopy of Gliding Motility in *Toxoplasma gondii* Reveals a Novel, Biphasic Mechanism of Cell Locomotion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 11, p. 3539-3547, 1999.

JENKINS, M. C. TUO, W.; FENG, X.; CAO, L.; MURPHY, C.; FETTERER, R. *Neospora caninum*: Cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profilin. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 4, p. 357-362, 2010.

JEWETT, T. J.; SIBLEY, L. D. Aldolase Forms a Bridge between Cell Surface Adhesins and the Actin Cytoskeleton in Apicomplexan Parasites. **Molecular Cell**, v. 11, n. 4, p. 885-894, 2003.

JR., J. G.; SOUZA.; BERGAMASCHI, D.; GENNARI, S. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 1-8, 2004.

KAFSACK, B. F. C.; CARRUTHERS, V. B.; PINEDA, F. J. Kinetic modeling of *Toxoplasma gondii* invasion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 249, n. 4, p. 817-825, 2007.

KARAKOZOVA, M.; KOZAK, M.; WONG, C. C. L.; BAILEY, A. O.; YATES, J. R.; MOGILNER, A.; ZEBROSKI, H.; KASHINA, A. Arginylation of β -Actin Regulates Actin Cytoskeleton and Cell Motility. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 192-196, 2006.

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

KIM, K.; GOOZÉ, L.; PETERSEN, C.; GUT, J.; NELSON, R.G. Isolation, sequence and molecular karyotype analysis of the actin gene of *Cryptosporidium parvum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 105-113, 1992.

KIM, S. C. SPRUNG, R.; CHEN, Y.; XU, Y.; BALL, H.; PEI, J.; CHENG, T.; KHO, Y.; XIAO, H.; GRISHIN, N. V.; WHITE, M.; YANG, X. J.; ZHAO, Y. Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey. **Molecular Cell**, v. 23, n. 4, p. 607-618, 2006.

KING, C. A. Cell motility of sporozoan protozoa. **Parasitology Today**, v. 4, n. 11, p. 315-319, 1988.

KING, C. A. Cell surface interaction of the protozoan Gregarina with concanavalin a beads - implications for models of gregarine gliding. **Cell Biology International Reports**, v. 5, n. 3, p. 297-305, 1981.

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

KISHI, Y.; CLEMENTS, C.; MAHADEO, D.; COTTER, D.; SAMESHIMA, M. High levels of actin tyrosine phosphorylation: correlation with the dormant state of *Dictyostelium* spores. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 19, p. 2923-2932, 1998.

LEE, E. G.; KIM, J. H.; SIN, Y. S.; SHIN, G. W.; SUH, M. D.; KIM, D. Y.; KIM, Y. H.; KIM, G. S.; JUNG, T.S. Establishment of a two-dimensional electrophoresis map for *Neospora caninum* tachyzoites by proteomics. **Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 2339-2350, 2003.

LESSARD, J. L. Two monoclonal antibodies to actin: One muscle selective and one generally reactive. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 10, n. 3, p. 349-362, 1988.

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

LU, J.; KATANO, T.; OKUDA-ASHITAKA, E.; OISHI, Y.; URADE, Y.; ITO, S. Involvement of S-nitrosylation of actin in inhibition of neurotransmitter release by nitric oxide. **Molecular Pain**, v. 5, n. 1, p. 58, 2009.

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

MCCANN, C. M. ; MCALLISTER, M.; GONDIM, L.; SMITH, R.; CRIPPS, P.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. & TREES, A. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1631-1639, 2007.

MEHTA, S.; SIBLEY, L. D. Actin depolymerizing factor controls actin turnover and gliding motility in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 8, p. 1290-1299, 2011.

MEHTA, S.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* Actin Depolymerizing Factor Acts Primarily to Sequester G-actin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6835-6847, 2010.

MELO, D. P. G.; DA SILVA, A. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BASTOS, S. A. & BOAVENTURA, C. M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 15, n. 3, p. 105-109, 2006.

MINERVINO, A. H.; RAGOZO, A. M.; MONTEIRO, R. M.; ORTOLANI, E. L. & GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarém, Pará, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 254-256, 2008.

MIZUNO, Y.; MAKIOKA, A.; KAWAZU, S. I.; KANO, S.; KAWAI, S.; AKAKI, M.; AIKAWA, M. & OHTOMO, H. Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v. 88, p. 844-848, 2002. 10.1007/s00436-002-0666-8.

MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; ANDRESA, G.; SANTOS, H. A.; MACEDO JUNIOR, G. L.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z. & BALDANI, C. D.. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 312-317, 2011.

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

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 21-38, 2002.

MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; DA SILVA, R. T.; DE ALMEIDA, C. R. R. & LOPES, C. W. G. Distribuição de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras dos municípios de Resende e Rio Claro, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 101-104, 2006.

NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite host-cell interactions. **Experimental Parasitology**, v. 104, n. 3-4, p. 149-158, 2003.

NYMAN, T.; SCHULER, H.; KORENBAUM, E.; SCHUTT, C. E.; KARLSSON, R. & LINDBERG, U. The role of MeH73 in actin polymerization and ATP hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 4, p. 577-589, 2002.

OPITZ, C.; SOLDATI, D. "The glideosome": a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 597-604, 2002.

OROZCO, M. A.; MORALES, E.; SALMERÓN, F. Characterization of the Inflammatory Response in the Uteri of Cows Infected Naturally by *Neospora caninum*. **Journal of Comparative Pathology**, n. 0, p. 1-9, 2012.

OSHIRO, L. M.; MATOS, M. D. F. C.; OLIVEIRA, J. M. D.; MONTEIRO, L. A. & ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 133-138, 2007.

PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P.; BISHOP-STEWART, J.; BHARGAVA, M. K.; MILLARD, P. J.; MAO, F.; LEUNG, W.-Y. & HAUGLAND, R. P. Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1179-1188, 1999.

PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M. & MARSOLAIS, G.. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998. eng.

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

PINDER, J.; FOWLER, R.; DLUZEWSKI, A.; BANNISTER, L.; LAVIN, F.; MITCHELL, G.; WILSON, R. & GRATZER, W. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 13, p. 1831-1839, 1998.

PIZARRO, G. O.; OGUT, O. Impact of Actin Glutathionylation on the Actomyosin-S1 ATPase. **Biochemistry**, v. 48, n. 31, p. 7533-7538, 2009. PMID: 19580330.

PLATTNER, F.; SOLDATI-FAVRE, D. Hijacking of Host Cellular Functions by the Apicomplexa. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 471-487, 2008.

POLLARD, T. D. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 6, p. 2747-2754, 1986.

POLLARD, T. D.; BLANCHON, L.; MULLINS, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, n. 1, p. 545-576, 2000.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-465, 2003.

POUPEL, O.; TARDIEUX, I. *Toxoplasma gondii* motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 9, p. 653-662, 1999.

RODRIGUES, A.; GENNARI, S.; AGUIAR, D.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.; MISKA, K.; VIANNA, M. & DUBEY, J. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 3-4, p. 139-150, 2004.

RODRIGUES, A.; GENNARI, S.; PAULA, V.; AGUIAR, D.; FUJII, T.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R. & DUBEY, J. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 21-24, 2005.

ROMANELLI, P.; FREIRE, R.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.; OGAWA, L.; PAULA, V. D.; GARCIA, J. & NAVARRO, I. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 202-207, 2007.

ROSSI, G.; CABRAL, D.; RIBEIRO, D.; PAJUABA, A.; CORRÊA, R.; MOREIRA, R.; MINEO, T.; MINEO, J. & SILVA, D. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 252-259, 2011.

ROTTNER, K.; STRADAL, T. E. Actin dynamics and turnover in cell motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 569-578, 2011.

RUSSELL, D. G.; SINDEN, R. E. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. **Journal of Cell Science**, v. 50, n. 1, p. 345-359, 1981.

SAHOO, N.; BEATTY, W.; HEUSER, J.; SEPT, D. & SIBLEY, L. D. Unusual Kinetic and Structural Properties Control Rapid Assembly and Turnover of Actin in the Parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 2, p. 895-906, 2006.

SALABERRY, S. R. S.; OKUDA, L. H.; NASSAR, A. F. D. C.; CASTRO, J. R. D. & LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep flocks of Uberlândia county, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 148-151, 2010.

- SARTOR, I.; FILHO, A. G.; VIANNA, L.; PITUCO, E.; PAI, V. D. & SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 413-418, 2005.
- SCHLIWA, M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. **The Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 1, p. 79-91, 1982.
- SCHMITZ, S.; GRAINGER, M.; HOWELL, S.; CALDER, L. J.; GAEB, M.; PINDER, J. C.; HOLDER, A. A. & VEIGEL, C. Malaria Parasite Actin Filaments are Very Short. **Journal of Molecular Biology**, v. 349, n. 1, p. 113-125, 2005.
- SCHMITZ, S.; SCHAAP, I. A. T.; KLEINJUNG, J.; HARDER, S.; GRAINGER, M.; CALDER, L.; ROSENTHAL, P. B.; HOLDER, A. A. & VEIGEL, C. Malaria Parasite Actin Polymerization and Filament Structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 47, p. 36577-36585, 2010.
- SCHOENENBERGER, C. A.; MANNHERZ, H. G.; JOCKUSCH, B. M. Actin: From structural plasticity to functional diversity. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 10, p. 797-804, 2011.
- SCHÜLER, H.; MUELLER, A. K.; MATUSCHEWSKI, K. A *Plasmodium* Actin-depolymerizing Factor That Binds Exclusively to Actin Monomers. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 9, p. 4013-4023, 2005.
- SEEBER, F.; BOOTHROYD, J. C. *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Gene**, v. 169, n. 1, p. 39-45, 1996.
- SHAW, M. K.; TILNEY, L. G. Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: Visualization of actin filaments in a protozoan parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 16, p. 9095-9099, 1999.
- SHAW, M.; COMPTON, H.; ROOS, D. & TILNEY, L. Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 7, p. 1241-1254, 2000.
- SIBLEY, L. D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.
- SKILLMAN, K. M.; DIRAVIYAM, K.; KHAN, A.; TANG, K.; SEPT, D. & SIBLEY, L. D. Evolutionarily Divergent, Unstable Filamentous Actin Is Essential for Gliding Motility in Apicomplexan Parasites. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002280, 2011.
- SMYTHE, W. A.; JOINER, K. A.; HOPPE, H. C. Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 452-464, 2008.
- SOARES, H. S.; AHID, S. M.; BEZERRA, A. C.; PENA, H. F.; DIAS, R. A. & GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 211-214, 2009.

SPECTOR, I.; SHOCHET, N.; KASHMAN, Y. & GROWEISS, A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. **Science**, v. 219, n. 4584, p. 493-495, 1983.

STARNES, G. L.; COINCON, M.; SYGUSCH, J. & SIBLEY, L. D. Aldolase Is Essential for Energy Production and Bridging Adhesin-Actin Cytoskeletal Interactions during Parasite Invasion of Host Cells. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 4, p. 353-364, 2009.

THERIOT, J. A. Regulation of the actin cytoskeleton in living cells. **Seminars in Cell Biology**, v. 5, n. 3, p. 193-199, 1994.

TIEMANN, J. C.; SOUZA, S. L.; RODRIGUES, A. A.; DUARTE, J. M. & GENNARI, S. M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 73-76, 2005.

TREES, A.; DAVISON, H.; INNES, E. & WASTLING, J. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1195-1200, 1999.

UENO, T.; GONÇALVES, V.; HEINEMANN, M.; DILLI, T.; AKIMOTO, B.; DE SOUZA, S.; GENNARI, S. & SOARES, R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 547-552, 2009. 10.1007/s11250-008-9220-8.

VAN POPPEL, N. F.; WELAGEN, J.; DUISTERS, R. F.; VERMEULEN, A. N. & SCHAAP, D. Tight control of transcription in *Toxoplasma gondii* using an alternative tet repressor. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 443-452, 2006.

VANDERBERG, J. P. Studies on the Motility of *Plasmodium* Sporozoites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 527-537, 1974.

VISA, N.; PERCIPALLE, P. Nuclear Functions of Actin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 4, 2010.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S. & BAUERMANN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1948-1951, 2006.

WEGNER, A. Head to tail polymerization of actin. **Journal of Molecular Biology**, v. 108, n. 1, p. 139-150, 1976.

WESSELING, J. G.; SMITS, M. A.; SCHOENMAKERS, J. G. G. Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 30, n. 2, p. 143-153, 1988.

WESSELING, J. G.; SNIJDERS, P. J.; VAN SOMEREN, P.; JANSEN, J.; SMITS, M. A. & SCHOENMAKERS, J. G. Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 167-176, 1989.

WETZEL, D. M.; SCHMIDT, J.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; DUBEY, J. P. & SIBLEY, L. D. Gliding Motility Leads to Active Cellular Invasion by *Cryptosporidium parvum* Sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5379-5387, 2005.

WETZEL, D.; HÅKANSSON, S.; HU, K.; ROOS, D. & SIBLEY, L. Actin Filament Polymerization Regulates Gliding Motility by Apicomplexan Parasites. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 2, p. 396-406, 2003.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; DUBEY, J. P. & GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* Antibodies in Capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) From São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 766-766, 2008.

YASUDA, T.; YAGITA, K.; NAKAMURA, T. & ENDO, T. Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology research**, v. 75, n. 2, p. 107-113, 1988.