UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação funcional da proteína anônima relacionada à trombospondina
2 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1)

Luiz Miguel Pereira

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação funcional da proteína anônima relacionada à trombospondina
2 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1)

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Luiz Miguel Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 30/08/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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

PEREIRA, LUIZ MIGUEL

Avaliação funcional da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1). Ribeirão Preto, 2013.

169 p.: ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Yatsuda, Ana Patrícia.

1. *Neospora caninum*. 2. Transfecção. 3. Manipulação genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Miguel Pereira

Avaliação funcional da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1).

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho a Deus e
à minha família que sempre me apoiou.*

“O destino baralha as cartas, e nós jogamos.”
Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

Aos meus pais Maria Aparecida (Zi) e Miguel pela educação e apoio;

Aos meus irmãos Luana e Francisco (Nê) pelo apoio e boa convivência;

A Mariana Bronzon pelo carinho, amor e apoio na reta final de conclusão do Doutorado;

A técnica Maraísa Palhão Verri pelo apoio a toda hora e momentos descontraídos;

A técnica Tânia Mara pela ajuda e amizade no início do Doutorado;

As colegas de bancada Luciana Baroni, Letícia Pollo e Aline Bononi, pela ajuda e ganho de experiência como equipe, além da amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado.

Aos vizinhos Marília Ishisawa, Henrique Frank, Ivana Furtado e Jéssica Moreto pela amizade, momentos engraçados e idas ao bandex;

Aos colegas de república Wellington (Pêssego) e Felipe (Marelão), pela boa convivência e amizade;

Ao *Neospora caninum* e *Escherichia coli* que colaboraram;

A Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, pelas oportunidades, orientação, liberdade para pesquisar e amizade;

A todos que me apoiaram.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Processo invasivo e importância das micrônomas	2
1.2 Proteínas Anônimas Relacionadas a Trombospondina (TRAPs).....	4
1.3 TRAPs em <i>Neospora caninum</i>	6
1.4 Manipulação genética através do sistema de expressão induzível por TetR/tetO.....	6
1.5 Inserção de genes em <i>N. caninum</i>	8
1.6 Expressão e purificação de proteínas em <i>E. coli</i> e <i>N. caninum</i>	10
1.7 Justificativa	11
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Manutenção e purificação do parasita	14
3.1.1 Linhagem de <i>N. caninum</i>	14
3.1.2 Cultura de <i>N. caninum</i>	14
3.2 Técnicas gerais de biologia molecular	14
3.2.1 Extração de DNA genômico de <i>N. caninum</i>	14
3.2.2 Extração de RNA.....	15
3.2.3 Síntese de cDNA total	15
3.2.4 Reação da polimerase em cadeia	15
3.2.5 Purificação do gel de agarose	16
3.2.6 Ligação de insertos no pGEM	16
3.2.7 Transformação em células Top10 e seleção das colônias	17
3.2.8 Purificação dos plasmídeos (minipreps).....	17
3.2.9 Preparo de fragmentos para ligação	18
3.2.10 Preparo de plasmídeos para ligação	18
3.2.11 Ligação.....	18
3.3 Expressão de NcMIC2-like1 recombinante solúvel	19
3.3.1 Detecção da região solúvel	19
3.3.2 Obtenção do fragmento Nc1081 e ligação a NcMic2-like1	19
3.3.3 Expressão em BL21 e purificação.....	21
3.4 Transfecção e seleção de taquizoítas resistentes.....	22
3.4.1 Transfecção transiente sobre <i>N. caninum</i>	22
3.4.1.1 Comparação entre os promotores RPS13 e Tubulina de <i>N. caninum</i> e RPS13 de <i>T. gondii</i>	23
3.4.2 Transfecção estável em <i>N. caninum</i>	23
3.4.3 Expressão de cloranfenicol acetil-transferase (CAT-ELISA)	23

3.5 Técnicas para detecção de proteínas	24
3.5.1 SDS-PAGE primeira dimensão (1D).....	24
3.5.2 SDS-PAGE segunda dimensão (2D).....	24
3.5.3 Western blot	25
3.5.4 Espectrometria de massas	25
3.6 Dihidrofolato Redutase – Timidilato Sintase (DHFR-TS) de <i>N. caninum</i>	26
3.6.1 Análise da sequência NcDHFR-TS	26
3.6.2 Obtenção de <i>N. caninum</i> resistente a pirimetramina	27
3.6.2.1 Mutação por PCR, QuikChange® XL site directed mutagenesis kit da Stratagene.....	27
3.7 Expressão, detecção e ensaios funcionais baseados na expressão da β -galactosidase	29
3.7.1 Ensaio de β -galactosidase de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z (construção dos plasmídeos será detalhada em resultados).....	29
3.7.2 Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z através de SDS-PAGE 1D e 2D.....	29
3.7.3 Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z por precipitação de X-GAL.....	30
3.7.4 Ensaio de crescimento de <i>N. caninum</i> NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z	30
3.7.5 Otimização do ensaio de invasão.....	31
3.8 Resgate de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/Tub-tetO/Lac-Z do genoma de <i>N. caninum</i>	31
3.9 Detecção de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR....	32
3.10 Purificação de NcDHFR-CAT/His de <i>N. caninum</i>	32
3.11 Controle da expressão em <i>N. caninum</i> por tetraciclina	33
3.11.1 Controle transiente da expressão de Lac-Z pelo sistema TetR/tetO em <i>N. caninum</i>	33
3.11.2 Indução da expressão por tetraciclina de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR estáveis e transfectados com NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z (transiente).....	34
3.11.3 Incubação dos controles estáveis apenas com NcTub-tetO (CAT ou NcDHFRM2M3) com tetraciclina	34
3.11.4 Cálculo do aumento da expressão	35
3.12 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Expressão transiente em <i>N. caninum</i>	36
4.1.1 Substituição dos promotores de <i>T. gondii</i> por <i>N. caninum</i>	36
4.1.2 Transfecção transiente da construção com os promotores de <i>T. gondii</i> (TgRPS13 tetO/Lac-Z) sobre <i>N. caninum</i>	39
4.1.3 Transfecção transiente de Tet-O/Lac-Z com promotor RPS13 de <i>N. caninum</i>	40
4.1.4 Comparação dos promotores NcRPS13tetO/Lac-Z, NcTubtetO/Lac-Z e TgRPS13 tetO/Lac-Z.....	41
4.2 Transfecção estável em <i>N. caninum</i>	42
4.2.1 Resistência a cloranfenicol.....	42
4.2.1.1 Transfecção da construção de <i>T. gondii</i> (TgSAG-CAT/TgTub YFP-TetR) em <i>N. caninum</i>	42

4.2.1.2 Construção de vetores com resistência a cloranfenicol.....	43
4.2.1.2.1 Construção da sequência produtora de cloranfenicol acetil-transferase pelo promotor SAG 1 e DHFR de <i>N. caninum</i>	43
4.2.1.2.2 Detecção de CAT em taquizoítas transfectados com SAG-CAT e DHFR-CAT selecionados com cloranfenicol	46
4.2.1.2.3 Detecção de SAG-CAT e DHFR-CAT nos taquizoítas transfectados e selecionados	47
4.2.2 Dihidrofolato Redutase – Timidilato Sintase de <i>N. caninum</i> (NcDHFR-TS)	48
4.2.2.1 Obtenção da sequência codificadora completa de DHFR-TS de <i>N. caninum</i>	48
4.2.2.2 Análise das sequências homólogas de NcDHFR-TS	49
4.2.2.3 Obtenção da sequência mutante NcDHFRM2M3	53
4.2.2.4 Construção do vetor DHFR mutante	54
4.2.2.5 Detecção de TgDHFR-DHFRM2M3 em <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> após transfecção e seleção	56
4.2.2.6 Híbridos NcDHFR-DHFRM2M3 e TgDHFR-DHFRM2M3.....	57
4.2.3 <i>N. caninum</i> nocaute para hipoxantina-xantina-guanina fosforibosiltransferase (HXGPRT).....	60
4.2.3.1 Construção do vetor HXGPRT-CAT e HXGPRT-DHFRM2M3	61
4.2.3.2 Vetor com a sequência de cloranfenicol acetil transferase flanqueada pelo promotor e região 3' UTR de HXGPRT	63
4.2.3.3 Vetor com a sequência de diidrofolato redutase-timidilato sintase mutada (DHFRM2M3) de <i>N. caninum</i> flanqueada pelo promotor e região 3' UTR de HXGPRT	64
4.3 Expressão estável de Lac-Z em taquizoítas resistentes a pirimetamina (DHFRM2M3) e cloranfenicol (CAT)	65
4.3.1 Construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z	65
4.3.1.1 Seleção dos clones	66
4.3.1.2 Ensaio de β -galactosidase de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z	67
4.3.1.3 Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z através de SDS-PAGE 1D	68
4.3.1.4 Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z através de SDS-PAGE 2D	69
4.3.1.5 Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z por precipitação de X-Gal	70
4.3.1.5.1 Verificação em taquizoítas isolados	70
4.3.1.5.2 Detecção de taquizoítas aderidos e invasivos.....	71
4.3.1.6 Ensaio de crescimento de <i>N. caninum</i> NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z	73
4.3.1.7 Otimização do ensaio de invasão.....	75
4.3.2 Expressão estável de Lac-Z em taquizoítas resistentes a cloranfenicol (CAT).....	76
4.3.2.1 Construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z	76
4.3.2.1.1 Seleção dos clones	77
4.3.2.1.2 Ensaio de β -galactosidase de NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z	78
4.3.2.1.3 Detecção de β -galactosidase de taquizoítas estáveis por SDS-PAGE 1D	79
4.3.2.1.4 Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z isolados	80
4.3.3 Verificação das transfecções estáveis	81

4.3.3.1 Verificação da integração de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z no genoma de <i>N. caninum</i>	81
4.3.3.2 Integração letal de NcDHFR-CAT, NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR no genoma de <i>N. caninum</i>	84
4.3.4 Expressão de YFP (proteína amarelo fluorescente) em <i>N. caninum</i>	85
4.3.4.1 Construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/TubYFP-TetR (expressão de YFP TetR)	85
4.3.4.1.1 Seleção dos clones	87
4.3.4.1.2 Detecção de taquizoítas fluorescentes	88
4.3.4.2 Ligação de YFP e TetR com o vetor NcDHFR-CAT/NcTub YFP-TetR	89
4.3.4.2.1 Seleção dos clones	90
4.4 Inserção de novos sítios no plasmídeo NcDHFR-DHFRM2M3 e marcação de proteínas com cauda de histidina	91
4.4.1 Ligação da região de clonagem/expressão de pET28 em pGEM	91
4.4.1.1 Inserção dos sítios de restrição do vetor pET28 para o vetor NcDHFR-DHFRM2M3	94
4.4.2 Marcação de NcDHFRM2M3 e CAT com cauda de histidina (His-tag)	96
4.4.2.1 NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His marcado com His-tag	97
4.4.2.1.1 Transfecção com NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His e seleção com pirimetamina	99
4.4.2.2 Marcação de CAT com His-tag	99
4.4.2.2.1 DHFR-CAT/His completo (com DHFR 3' UTR)	102
4.4.2.2.2 Seleção dos clones transfectados com NcDHFR-CAT/His completo e incompleto	103
4.4.2.2.3 Purificação de CAT/His e comparação com os controles <i>N. caninum</i> selvagem e células Vero em coluna de níquel	104
4.5 Controle da expressão de Lac-Z pelo sistema TetR/tetO em <i>N. caninum</i>	105
4.5.1 Controle transiente da expressão.....	105
4.5.2 Indução da expressão por tetraciclina de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR estáveis e transfectados com NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z (transiente).....	107
4.5.3 Incubação dos controles estáveis apenas com NcTub-tetO (CAT ou NcDHFRM2M3) com tetraciclina	108
4.6 Detecção e manipulação de NcMic-like1.....	110
4.6.1 Obtenção da sequência completa de NcMic2-like1 para expressão	110
4.6.1.1 Construção do vetor de expressão com promotor de Tubulina	112
4.6.1.2 Ligação da sequência NcTub-tetO/NcDHFRM2M3 truncado/His em Topo Zero Blunt	116
4.6.2 Inserção e expressão de NcMIC2-like1 em <i>N. caninum</i>	118
4.6.2.1 Ligação de NcTub-tetO/NcMic2-like1 ao vetor NcDHFR-CAT	119
4.6.2.2 Ligação de NcTub-tetO/NcMic2-like1 ao vetor NcDHFR-DHFRM2M3	122
4.6.3 Construção de vetores para a deleção de NcMic2-like1	124
4.6.3.1 Delineamento dos primers.....	125
4.6.3.2 Obtenção do promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1	126
4.6.3.3 Ligação de 3' UTR NcMic2-like1 em NcDHFRM2M3	128
4.6.3.4 Ligação do promotor NcMic2-like1 em NcDHFRM2M3	129
4.6.4 Localização de NcMIC2-like1 e NcMIC2 por western blot 2D	134

4.6.5 Expressão de NcMIC2-like1 solúvel em pET28 com cauda solúvel Nc 1081	136
4.6.5.1 Obtenção da sequência Nc1080	136
4.6.5.2 Solubilidade de NcMIC2-like1/Nc1080 em ureia, expressão e purificação de NcMIC2-like1/Nc1080	138
4.6.5.3 Espectrometria de massas	139
5 DISCUSSÃO.....	140
6 CONCLUSÕES.....	154
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

RESUMO

PEREIRA, L.M. **Avaliação funcional da proteína anônima relacionada à trombospondina 2 de *Neospora caninum* (NcMIC2-like1)** 2013. 169f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Neospora caninum é um protozoário Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório que possui o cão e outros canídeos como hospedeiros definitivos e os bovinos como principais hospedeiros intermediários. Causa nos primeiros encefalopatia e nos últimos abortos com perda da fertilidade, gerando prejuízos significativos na pecuária mundial. Como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium*, *N. caninum* possui um sistema específico de secreção que permite a invasão ativa do parasita na célula hospedeira, formação do vacúolo parasitóforo e replicação. Devido ao seu ciclo intracelular, várias estratégias foram desenvolvidas para caracterizar o processo de invasão no filo, como deleção ou controle da expressão de genes envolvidos. Entre os genes com papel importante no processo invasivo, NcMic2-like1 possui destaque já que o soro contra essa proteína recombinante inibiu 60% da invasão de *N. caninum in-vitro*. Essa proteína micronêmica possui domínios adesivos (uma integrina e seis trombospondinas) que atuam na ligação entre os receptores da célula hospedeira e o motor de actina e miosina do parasita, possibilitando a invasão ativa. O objetivo central do trabalho foi o desenvolvimento de ferramentas genéticas para a deleção e hiperexpressão de NcMic2-like1 e outras proteínas em *N. caninum* para a compreensão profunda desse mecanismo, além da caracterização, localização e expressão de NcMic2-like1. Para isso dois modelos baseados na resistência a drogas e integração ao genoma do parasita foram construídos. Um se baseia na resistência contra cloranfenicol (pelo gene Cloranfenicol Acetil Transferase – CAT) e o outro contra pirimetamina (pela mutação da Dihidrofolato Redutase–Timidilato Sintase – DHFRM2M3). As sequências que conferem resistência foram ligadas ao promotor e região 3' UTR de três genes de *N. caninum*, NcSAG1 (ou SAG1-like); NcDHFR ou NcHXGPRT conferindo resistência às drogas após transfecção. A esses vetores de resistência foram ligadas duas sequências do controle de expressão por tetraciclina, o sistema TetR/tetO. Adaptando o sistema de *T. gondii* para *N. caninum*, TetR foi expresso sob controle do promotor RPS13 ou Tubulina de *N. caninum* e tetO controlou a expressão de Lac-Z (β -galactosidase),

uma enzima repórter. TetR e tetO foram transfectados de modo estável utilizando os vetores CAT e DHFRM2M3. O sistema foi responsivo à adição de tetraciclina, além de indicar um meio provavelmente independente de TetR quando apenas tetO foi avaliado em *N. caninum*. Foi possível expressar Lac-Z em *N. caninum*, possibilitando o desenvolvimento e padronização de ensaios de invasão, crescimento e detecção do taquizoíta. Também foi realizada a detecção de YFP (proteína amarelo fluorescente) nos taquizoítas transfectados com YFP fundida em TetR. Essas ferramentas de inserção e deleção de genes possibilitaram a construção de vetores para a hiper expressão ou deleção de NcMic2-like1. Para hiper expressão o vetor foi obtido pela substituição de Lac-Z pelo gene NcMic2-like1. Para deleção de NcMic2-like1 o vetor foi desenvolvido pela ligação do seu promotor e região 3' UTR à CAT ou NcDHFRM2M3, que promove a substituição do gene alvo pelos de resistência por recombinação homóloga. Adicionalmente foram desenvolvidas formas para a expressão e purificação de proteínas em *N. caninum*. Também foi obtida a solubilização de NcMIC2-like1 recombinante pelo sistema pET28 após a adição de uma cauda solúvel amplificada do genoma de *N. caninum*. O desenvolvimento de métodos de manipulação genética é um fato inédito para *N. caninum* e possibilitará estudos moleculares mais profundos sobre os mecanismos de invasão e replicação, onde NcMic2-like1 aparece como primeira candidata para esses ensaios.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; Transfecção; NcMic2-like1; Micronemas; Controle de expressão

ABSTRACT

PEREIRA, L.M. **Functional evaluation of the thrombospondin related anonymous protein 2 from *Neospora caninum* (NcMIC2-like1)** 2013. 169f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The Apicomplexa protozoan *Neospora caninum* is an obligate and intracellular parasite that has the dog and other canids as definitive host and especially cattle as intermediate hosts. It causes respectively encephalopathy, abortions and loss of fertility causing deep economic impact at the world livestock. As *Plasmodium* and *Toxoplasma gondii*, *N. caninum* has a specific system of active secretion, which allows the invasion of the parasite into the host cell, the establishment of parasitophorous vacuole and replication. Due to the intracellular cycle of parasite, several strategies have been developed to characterize the invasion process of the phylum, such as deletion or control of expression of related genes. Among the genes with an important role in the invasive process, NcMic2-like1 stands out, once the serum against the recombinant form inhibited the *in vitro* invasion of *N. caninum* up to 69%. This microneme protein has adhesive domains (one integrin and six thrombospondins) acting between the host cell receptors and the actin/myosin motor of the parasite, allowing the active invasion. The main aim of this work was the development of genetic tools for deletion and overexpression of NcMic2-like1 and other proteins in *N. caninum* for a deep understanding of this mechanism, in addition to the characterization, localization and expression of NcMic2-like1. Therefore two models based on the drug resistance and integration into the genome of the parasite were constructed. One was based on the resistance against chloramphenicol (chloramphenicol acetyl transferase gene by - CAT) and the other against pyrimethamine (by mutation of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase - DHFRM2M3). The sequences that confer these two drug resistance patterns have been ligated to the promoter and the 3' UTR region of three genes from *N. caninum*, NcSAG1 (or SAG1-like); NcDHFR or NcHXGPRT, conferring resistance to the drugs after transfection. These vectors were ligated to two sequences that confer resistance controlled by tetracycline, the TetR / tetO system. The *T. gondii* system was adapted for *N. caninum*. TetR was expressed under the control of *N. caninum* tubulin promoter and tetO controlled the expression of Lac-Z (β -galactosidase), a reporter enzyme. TetR and tetO were stably inserted in *N. caninum* after transfection

with the vectors based on CAT and DHFRM2M3. The system was responsive following tetracycline presence, in addition to a TetR independent mechanism in *N. caninum*. Moreover, it was possible to express Lac-Z in *N. caninum* enabling the development and standardization of invasion, growth and detection tachyzoite assays. It was also possible to detect through fluorescence microscopy the YFP (yellow fluorescent protein) in tachyzoites transfected with YFP fused to TetR.. The tools for gene insertion and deletion allowed the construction of vectors for hiperexpression or deletion of NcMic2-like1. For hiperexpression the vector was obtained by the replacement of the Lac-Z by the NcMic2-like1 gene. For the NcMic2-like1 deletion the vector was achieved after the ligation of its promoter and 3' UTR region to CAT or NcDHFRM2M3. This approach leads to the replacement of the target gene by the resistance gene through homologous recombination. Furthermore approaches for expression and purification of proteins in *N. caninum* were developed. Also, a soluble recombinant NcMIC2-like1 form was obtained with pET28 system added with a soluble tail amplified from a genome region of *N. caninum*. The development of genetic manipulation methods is an unprecedented event for *N. caninum* and will enable deeper molecular studies over mechanisms of invasion and replication, where NcMic2-like1 is the first candidate for these assays.

Keywords: *Neospora caninum*; Transfeccion; NcMic2-like1; Micromene; Expression control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas no processo invasivo do Apicomplexa <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Figura 2 – Ilustração esquemática da complexidade de domínios em proteínas TRAP de parasitas Apicomplexas	5
Figura 3 – Representação esquemática do sistema de controle de expressão TetR/teto em <i>T. gondii</i>	8
Figura 4 – Representação do vetor pET28/NcMic2-like1/Nc1080	20
Figura 5 – Mutação por PCR QuikChange® XL <i>site directed</i> mutagenesis kit da Stratagene.....	28
Figura 6 – Substituição dos promotores TgRPS13 e TgTub (<i>T. gondii</i>) por NcRPS13 e NcTub (<i>N. caninum</i>).....	37
Figura 7 – Construção de NcRPS13tetO/Lac-Z e NcTubYFP-TetR	38
Figura 8 – Avaliação da expressão de Lac-Z por taquizoítas transfectados transientemente com a construção contendo os promotores de <i>T. gondii</i> (TgRPS13tetO/Lac-Z)	39
Figura 9 – Avaliação da expressão de Lac-Z por taquizoítas transfectados transientemente com a construção contendo os promotores de <i>N. caninum</i> (NcRPS13 tetO/Lac-Z)	40
Figura 10 – Comparação da atividade de β -galactosidase entre promotores de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	42
Figura 11 – Construção de SAG-CAT e DHFR-CAT	45
Figura 12 – Detecção de atividade da enzima cloranfenicol acetil transferase (CAT) por CAT-ELISA (Roche).....	46
Figura 13 – Detecção por PCR das sequências SAG-CAT e DHFR-CAT nas linhagens de <i>N. caninum</i> selecionadas com cloranfenicol	47
Figura 14 – Amplificação da sequência completa DHFR-TS de <i>N. caninum</i> e ligação em pGEM	49
Figura 15 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de DHFR-TS em <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	51
Figura 16 – Mutação M3 sobre NcDHFR-TS de <i>N. caninum</i>	53
Figura 17 – Mutação M2 sobre NcDHFRM3 de <i>N. caninum</i>	54

Figura 18 – Construção de DHFR-DHFRM2M3 em <i>N. caninum</i>	54
Figura 19 – Ligação da sequência NcDHFRM2M3 de <i>N. caninum</i> no vetor DHFR..	56
Figura 20 – Amplificação da sequência TgDHFRM2M3 no DNA de <i>N. caninum</i> e <i>T.gondii</i> transfectados e selecionados com pirimetamina	57
Figura 21 – Sítios de restrição e mutações nos vetores TgDHFR-DHFRM2M3 e NcDHFR-DHFRM2M3	58
Figura 22 – Híbrido TgDHFR-DHFRM2M3EcoRI/NcDHFR-Nc3'DHFR	58
Figura 23 – Ligação do promotor e região mutada de DHFR de <i>T. gondii</i> com a parte complementar de DHFR e 3' UTR de <i>N. caninum</i>	59
Figura 24 – Construção de HXGPRT-DHFRM2M3 e HXGPRT-CAT em <i>N. caninum</i>	61
Figura 25 – Amplificação da região promotora e 3' UTR da <i>hipoxantina</i> -xantina-guanina fosforibosiltransferase (<i>HXGPRT</i>) de <i>N. caninum</i>	62
Figura 26 – Construção do vetor NcHXGPRT-CAT a partir de NcDHFR-CAT	63
Figura 27 – Construção do vetor NcHXGPRT-DHFRM2M3 a partir de HXGPRT-CAT	64
Figura 28 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z	65
Figura 29 – Obtenção do vetor DHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z	66
Figura 30 – Atividade da enzima β -galactosidase de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z após invasão sobre células vero.....	67
Figura 31 – Possível localização de β -galactosidase expressa por <i>N. caninum</i> transfectado com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z em gel 1D.....	68
Figura 32 – Possível localização de β -galactosidase expressa por <i>N. caninum</i> transfectado com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z em gel 2D.....	69
Figura 33 – Detecção de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z corados pelo kit β -Gal staining set (Roche).....	70
Figura 34 – Detecção de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z em células vero corados pelo kit β -Gal staining set (Roche).....	71
Figura 35 – Comparação macroscópica entre taquizoítas de <i>N. caninum</i> NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e Nc selvagens concentrados	72

Figura 36 – Multiplicação de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z monitorada pela atividade de β -galactosidase	73
Figura 37 – Diferença da atividade de β -galactosidase entre taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z incubados por 24 e 72 hrs.....	74
Figura 38 – Atividade de β -galactosidase avaliada em <i>N. caninum</i> t NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z com diferentes concentrações de SDS e TritonX ...	75
Figura 39 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z	76
Figura 40 – Obtenção do vetor DHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z	77
Figura 41 – Atividade da enzima β -galactosidase de taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z após invasão sobre células vero	78
Figura 42 – Possível localização de β -galactosidase expressa por <i>N. caninum</i> transfectado com NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z em gel 1D	79
Figura 43 – Detecção de taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z corados pelo kit β -Gal staining set (Roche)	80
Figura 44 – Comparação macroscópica entre taquizoítas de <i>N. caninum</i> NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z e Nc selvagens concentrados.....	81
Figura 45 – Resgate de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z do genoma de <i>N. caninum</i>	83
Figura 46 – Resgate de NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z do genoma de <i>N. caninum</i>	84
Figura 47 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTubYFP-TetR	86
Figura 48 – Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTubYFP-TetR	87
Figura 49 – Fluorescência emitida por taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR	88
Figura 50 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTubYFP-TetR..	89
Figura 51 – Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/NcTubYFP-TetR.....	90
Figura 52 – Vetores utilizados para a construção de pGEM-pET28.....	91
Figura 53 – Região de expressão/ligação de pET28 amplificada.....	92
Figura 54 – Estratégia para construção do vetor pGEM-pET28.....	93
Figura 55 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/pET28.....	94

Figura 56 – Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/pET28	95
Figura 57 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/ His	97
Figura 58 – Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His.....	98
Figura 59 – Amplificação de CAT com sítio XhoI.....	99
Figura 60 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/His	100
Figura 61 – Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/His	101
Figura 62 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/His com região 3'UTR	102
Figura 63 – Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/His completo.....	103
Figura 64 – Purificação do extrato de <i>N. caninum</i> selvagem, vero e NcDHFR- CAT/His em níquel sepharose.....	104
Figura 64 – Indução da expressão de Lac-Z por adição de tetraciclina	106
Figura 65 – Efeito da tetraciclina sobre taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR (estável) e NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z (transiente).....	107
Figura 66 – Efeito da tetraciclina sobre taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z (estável)	108
Figura 67 – Efeito da tetraciclina sobre taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub- tetO/Lac-Z (estável).....	109
Figura 68 – Amplificação, purificação e ligação em pGEM de NcMic2-like1 completo	111
Figura 69 – Amplificação do promotor Tubulina com sítios HindIII e AvrII	113
Figura 70 – Estratégia para construção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His	114
Figura 71 – Obtenção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His.....	115
Figura 72 – Estratégia para construção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His em Topo Zero Blunt.....	116
Figura 73 – Obtenção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His (Topo Zero Blunt)	117
Figura 74 – Estratégia para construção do vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1	118

Figura 75 – Obtenção do vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1	119
Figura 76 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1	120
Figura 77 – Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1...	121
Figura 78 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/NcMic2-like1	122
Figura 79 – Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/NcMic2-like1	123
Figura 80 – Estratégia para deleção de NcMic2-like1	124
Figura 81 – Amplificação do promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1	126
Figura 82 – Ligação do promotor e região 3' UTR NcMic2-like1 em pGEM	127
Figura 83 – Estratégia para construção do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3	128
Figura 84 – Estratégia para construção do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3 .	129
Figura 85 – Obtenção do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3	130
Figura 86 – Estratégia para construção do vetor NcMic2-like1-CAT	131
Figura 87 – Obtenção do vetor NcMic2-like1-CAT	132
Figura 88 – PCR sobre o vetor NcMic2-like1-CAT	133
Figura 89 – Detecção de NcMIC2-like1 por western blot 2D pelo soro anti-NcMIC2-like1 e localização em SDS-PAGE 2D corado por coomassie G	134
Figura 90 – Tratamento de pET28/NcMic2-like1/Nc1080 com BamHI, HindIII e XhoI	137
Figure 91 – Avaliação de solubilidade de NcMIC2-like1/Nc1080	138
Figura 92 – A fonte de unidades de carbono para a síntese de dTMP depende de DHFR-TS	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Primers para amplificação da sequência 1081	19
Tabela 2	– Primers utilizados para amplificação dos promotores dos genes RPS13 e tubulina	36
Tabela 3	– Primers utilizados para construção de SAG-CAT e DHFR-CAT.....	43
Tabela 4	– Primers utilizados na amplificação e mutação NcDHFR	48
Tabela 5	– Identidade e similaridade entre as sequências DHFR-TS de <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	52
Tabela 6	– Primers utilizados na construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3.....	55
Tabela 7	– Primers utilizados na construção dos vetores NcHXGPRT-CAT e NcHXGPRT-DHFRM2M3	68
Tabela 8	– Primers para amplificação da região de ligação/expressão de pET28	92
Tabela 9	– Primers utilizados para a obtenção de NcMic2-like1 completo	110
Tabela 10	– Primers utilizados na obtenção do promotor Tubulina.....	112
Tabela 11	– Primers utilizados na obtenção do promotor ou região 3' UTR para deleção de NcMic2-like1	125
Tabela 12	– Dados de espectrometria de massas dos spots 1, 2, 3 e 4	135
Tabela 13	– Composição de aminoácidos de Nc1080	136

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- °C** – Graus Celsius
[5,6-³H] - Trítio
1D – Uma dimensão
2D – Duas dimensões
3' UTR – Região 3' não transcrita (3' Untranslated Region)
A - Ampere
AMA-1 – Antígeno de Membrana Apical (Apical Membrane Antigen)
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
CAT – Cloranfenicol acetil transferase
cDNA – DNA complementar
CH₂CH₄folato - 5,10-metilenetetrahidrofolato
CHAPS - (3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amonio]-propano- sulfonato)
CID - Dissociação induzida por colisão
cm² – Centrímetro quadrado
CPRG - Clorofenolred-β-D-galactopiranoside
CS - Circumsporozoíta
CSP - Proteína do circumsporozoíta
CTRP - Proteína relacionada a circumsporozoíto e trombospondina anônima
Da - Dalton
DHFR-TS – Dihidrofolato redutase - Timidilato sintase
DIG - Digoxigenina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNAse I - Ácido desoxirribonuclease I
dNTP - Desoxirribonucleotídeo
dTMP - Desoxitimidina monofosfato
DTT - Ditioneitol
dUMP - Desoxiuridina monofosfato
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESTs – Expressed sequence tag
F - Faraday
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g - grama
g - gravidade
G_{1/2} – Calibre (agulha)
GE – General Electric

GFP – Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein)
Gly – Glicina
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
GSK - GlaxoSmithKline
GST - Glutathione S transferase
h(s) - Hora
H2folato - Diidrofolato
H4folato - Tetraidrofolato
His – Cauda de histidinas (6X)
HXGPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
IAGG – Isoleucina-Alanina-Glicina-Glicina
IPG – Immobilized pH Gradient
IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosida
K₂HPO₄ - Fosfato de potássio dibásico
KCl – Cloreto de potássio
KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico
l - Litro
LB – Luria Bertani
m - metro
M – Mol/litro
M2 – Mutação M2
M3 – Mutação M3
MAP – Proteína associada a micronema
MBP – Proteína de ligação a maltose
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MgSO₄ – Sulfato de magnésio
MIC1 – Proteína micronêmica 1
MIC2 – Proteína Micronêmica 2
min - Minuto
MJ – Moving Junction
MS - Massa
NaCl – Cloreto de sódio
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nc-1 – *Neospora caninum* linhagem 1
Nc1080 – Contig 1080 de *Neospora caninum*
NcMIC2-like1 – Proteína micronêmica 2 tipo 1 de *Neospora caninum*
NcMIC2- Proteína micronêmica 2 de *Neospora caninum*

NL – Não linear
pb – Par de base
PBS – Tampão fosfato salino
PBST - Tampão fosfato salino tween
PCR – Reação da polimerase em cadeia
Pf – *Plasmodium falciparum*
pH - Potencial hidrogeniônico
POD - Peroxidase
ppm – Partículas por milhão
PVDF - fluoreto de polivinilideno
R² – Coeficiente de determinação
RNA - Ácido ribonucleico
RNase H - Ácido ribonuclease H
RONs - Proteínas do pescoço das roptrias
ROPs – Proteínas das roptrias
rpm – Rotação por minuto
RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
RPS13 – Proteína ribossomal S13
SAG – Proteína de superfície -Major surface antigen
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese de acrilamida em Dodecil sulfato de sódio
SEP - Peptídeo para aumento da solubilidade
Ser - Serina
SRS29B – Sequência relacionada à SAG 29B
STH - Serina hidroximetil-transferase
SUMO - Small ubiquitin-like modifier
TE – Tris EDTA
tetO - Operador de tetraciclina
TetR – Repressor de tetraciclina (Tetracycline repressor)
TRAP – Proteína anônima relacionada à trombospondina
Tris - 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Trx - Tio redoxina
TSR ou TSP-1 – Relacionado à trombospondina ou trombospondina
Tub – Promotor tubulina
U – Unidade enzimática
USP – Universidade de São Paulo
UV – Ultravioleta
V - Volt

vWFa – Fator de von Willebrand tipo A

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

YFP – Proteína fluorescente amarela (Yellow fluorescent protein)

Ω - Ohm

Δ – Nocaute

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Neospora caninum é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, estritamente relacionado a *Toxoplasma gondii*. A primeira descrição da síndrome neosporose em cães foi em 1984 por BJERKAS e colaboradores (BJERKÅS et al., 1984) e em bezerros em 1987, quando foi isolado e nomeado em 1988 por DUBEY e colaboradores (DUBEY et al., 2006; DUBEY et al., 1988). Devido a semelhanças morfológicas e com o ciclo possuindo dois tipos de hospedeiros com cinética parecida, os casos anteriores a sua descoberta foram reportados como causados por *T. gondii*, encobrindo a ação desta nova espécie de parasita (HEMPHILL et al., 2006).

N. caninum possui o cão (*Canis familiaris*) coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004; LINDSAY et al., 1999; MCALLISTER et al., 1998), dingos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobos cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011) como hospedeiros definitivos e os bovinos entre os hospedeiros intermediários com maior impacto sobre as atividades humanas, enquanto *T. gondii* possui o gato como hospedeiro definitivo e humanos, ovinos e caprinos como principais hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2007). Apesar da semelhança vários estudos indicam diferenças morfológicas, estruturais, moleculares e antigênicas entre as duas espécies (COWPER et al., 2012; DUBEY, LINDSAY, 1996; HEMPHILL, 1999; HOWE, SIBLEY, 1997a). Uma característica biológica comum importante entre *N. caninum* e *T. gondii* reside na baixa especificidade celular *in vitro*, pois ambos são capazes de infectar diversos tipos celulares; aparentemente todas as células nucleadas (DUBEY, LINDSAY, 1996; HEMPHILL, 1996).

A transmissão de *N. caninum* pode ocorrer via transplacentária de uma maneira altamente eficiente causando a neosporose fetal, com perdas relacionadas a aborto fetal, morte neonatal, doenças clínicas e subclínicas de bezerros (CORBELLINI et al., 2002; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003; TREES et al., 2002; WILLIAMS et al., 2000) além de redução da fertilidade e diminuição do valor de matrizes infectadas, levando a importantes perdas econômicas no setor de criação bovina (TREES et al., 1999). Possíveis vias de transmissão pós-natal do parasita são através da ingestão de oocistos contendo esporozoítas, os quais são disseminados através das fezes de cães infectados (hospedeiros definitivos) ou pela ingestão de tecidos infectados, tais como fetos abortados, placenta ou outro tecido

bovino infectado contendo taquizoítas ou cistos teciduais com bradizoítas. (ANDERSON et al., 2007; DIJKSTRA et al., 2001; TREES, WILLIAMS, 2005). *N. caninum* já foi detectado nos hospedeiros definitivos e/ou intermediários em diversos países e em praticamente todos os continentes (DUBEY, SCHARES, 2011; DUBEY et al., 2007). No Brasil *N. caninum* foi isolado em 2001 (GONDIM et al., 2001) a partir de tecido cerebral de cães e foi descrita soropositividade em bovinos em vários estados brasileiros em amostras oriundas do Norte (AGUIAR et al., 2006; MINERVINO et al., 2008), Sudeste (GUEDES et al., 2008; MUNHOZ et al., 2006), Sul (CORBELLINI et al., 2002; GUIMARAES et al., 2004) e Centro Oeste (MELO et al., 2006; OSHIRO et al., 2007). Foi descrita a presença de anticorpos contra *N. caninum* em caprinos (MORAES et al., 2011), ovinos (FIGLIUOLO et al., 2004; MORAES et al., 2011; ROMANELLI et al., 2007; ROSSI et al., 2011; SALABERRY et al., 2010; SOARES et al., 2009; UENO et al., 2009), capivaras (YAI et al., 2008), cães (BRUHN et al., 2012; de SOUSA et al., 2012; FERNANDES et al., 2004; FIGUEREDO et al., 2008; GENNARI et al., 2002; MINEO et al., 2001), gatos (BRAGA MDO et al., 2012), veado dos pampas (TIEMANN et al., 2005) e búfalos d'água (RODRIGUES et al., 2005).

1.1 – Processo invasivo e importância das micronemas

Todos Apicomplexas são parasitas intracelulares obrigatórios e invadem as células hospedeiras por um mecanismo conservado e extremamente bem sucedido. Por ser um processo dirigido pelo parasita, exige que o mesmo utilize seu próprio sistema de actina/miosina (DOBROWOLSKI et al., 1997; DOBROWOLSKI, SIBLEY, 1996; FRENAL et al., 2013; MEISSNER et al., 2002; SOLDATI et al., 2001; STARNES et al., 2009).

A invasão da célula hospedeira pelo estágio infectante do Apicomplexa é composta por um processo multi-fatorial (ilustrado na figura 1, CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007). O primeiro passo é a interação inicial entre parasita e célula hospedeira, intermediado principalmente por proteínas de superfície como SAG 1. Com a interação inicial concluída, há a descarga das proteínas das micronemas (entre estas TRAP), responsáveis pela reorientação e formação de ligações mais rígidas com moléculas do hospedeiro, possibilitando a ligação com o motor de actina/miosina do parasita. A entrada do parasita ocorre após a secreção de

proteínas das roptrias (RONs e ROPs) que se associam à proteína micronêmica AMA 1, resultando na junção de movimento (MJ), base para a formação do vacúolo parasitóforo. A liberação do parasita da junção de movimento, completando o processo invasivo, ocorre pela proteólise das proteínas micronêmicas pelas rombóides, num domínio conservado dentro da região transmembrana.

Figura 1 – Etapas no processo invasivo do Apicomplexa *Toxoplasma gondii* (CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007). O processo multifatorial se inicia com o reconhecimento pelas proteínas de superfície do taquizoíta (ex. SAG 1) e hospedeiro (1). A liberação das proteínas micronêmicas (MICs) possibilita a ligação entre ligantes e o motor de actina/miosina (MyoA) (2). O início da invasão ocorre com a interação entre as proteínas das roptrias (RONs e ROPs) e AMA 1, formando a junção de movimento (MJ, 3) e o vacúolo parasitóforo (4 e 5). Por fim o parasita é liberado da junção pela clivagem das proteínas micronêmicas pelas rombóides (ROMs) (6 e 7).

A interação entre as moléculas de superfície do hospedeiro com o motor actina/miosina do parasita é intermediada por módulos que são homólogos a domínios adesivos de eucariotos superiores, já sendo comprovada sua capacidade de ligação às células hospedeiras (BROSSIER, SIBLEY, 2005; COWPER et al., 2012; DI CRISTINA et al., 2000). Estes motivos estão presentes em uma ou múltiplas cópias e um grande número de combinações destes blocos foram identificados, sendo cada proteína micronêmica estruturalmente única. A diversidade das adesinas presentes nas micronemas pode abrir rotas alternativas e fortalece a capacidade invasiva dos Apicomplexas, possibilitando invadir diferentes tipos

celulares em diferentes estágios de seu ciclo (SOLDATI et al., 2001).

1.2 – Proteínas Anônimas Relacionadas a Trombospondina (TRAPs)

Uma família de proteínas micronêmicas bem conservada entre os Apicomplexas são as Proteínas Anônimas Relacionadas a Trombospondina (TRAP). Com diversas denominações, membros TRAP existem em esporozoítas de *Plasmodium* (TRAP), em oocinetos de *Plasmodium* (CTRP) e em *T. gondii* (MIC2) (DESSENS et al., 1999; HUYNH et al., 2004; MENARD, 2000; STARNES et al., 2006; SULTAN et al., 1997; WAN et al., 1997). Existem membros de TRAP em outros Apicomplexas, como em *Babesia bovis* (GAFFAR et al., 2004), *Eimeria tenella* (EtMIC1 e 4), (TOMLEY et al., 2001), *N. caninum* (NcMIC2) (LOVETT et al., 2000) e NcMIC2-like1 (PEREIRA et al., 2011) e *Cryptosporidium parvum* (CpMIC-1), (PUTIGNANI et al., 2008), porém os estudos que levaram ao modelo atual de invasão foram baseados em manipulações genéticas realizadas em *Plasmodium* e *T. gondii*. Todos os membros TRAP em Apicomplexas são proteínas transmembranas tipo I e possuem um número variável de dois domínios adesivos extracelulares: i) domínio I de integrinas ou domínio tipo A do fator de von Willebrand (vWFa) e ii) trombospondina tipo I (TSR ou TSP-1) (STARNES et al., 2006). A figura 2 mostra a representação esquemática dos domínios em diferentes proteínas TRAP. O número dos motivos TSP e vWa em *T. gondii*, *E. tenella* e NcMIC2 de *N. caninum* são idênticos, enquanto NcMIC2-like1 possui seis TSPs.

Figura 2- Ilustração esquemática da complexidade de domínios em proteínas TRAP de parasitas Apicomplexos. NcMIC2-like1: *N. caninum* (PEREIRA et al., 2011), NcMIC2: *N. caninum*, número de acesso: AAF01565, TgMIC 2: *T. gondii*, AAB63303, EtMIC1: *E. tenella*, M73495, BbTRAP: *B. bovis*, AAS58046, PfTRAP: *Plasmodium falciparum*, AAC1867.

A integrina A de TRAP de *T. gondii* está relacionada a interações com heparina, heparina sulfato, condroitina sulfato A e C, importantes para o processo de invasão de *T. gondii*, e estas associações foram mediadas em parte por TRAP (BROSSIER, SIBLEY, 2005; PIHLAJAMAA et al., 2013).

As trombospondinas estão envolvidas na interação com glicoconjugados sulfurados, altamente variáveis e encontrados na superfície celular, gerando a esta molécula especificidade para com a superfície celular (CEREDE et al., 2005; DUBREMETZ et al., 1998). A região transmembrana das TRAPs de Apicomplexos mostra alto grau de conservação e contém resíduos hidrofóbicos curtos. Neste domínio ocorre a clivagem pelas rombóides da região IAGG, estando claramente conservado entre várias proteínas micronêmicas (DOWSE, SOLDATI, 2004).

Todas as proteínas TRAP possuem uma cauda C-terminal envolvida na interação de TRAP com aldolase, que por sua vez recruta F-actina (BAUM et al., 2006; JEWETT, SIBLEY, 2003; KAPPE et al., 1999; STARNES et al., 2009). A força gerada pelo motor de actina/miosina puxa TRAP em direção ao pólo posterior e causa o movimento do parasita para dentro da célula.

1.3 - TRAPs em *Neospora caninum*

Análises preliminares de ESTs de *N. caninum* nos despertaram para a presença de uma segunda potencial proteína TRAP, além da já descrita NcTRAP (correspondente a NcMIC2), passando a ser denominada de NcMIC2-like1. Essa proteína foi caracterizada, clonada e com o anti-soro contra a forma recombinante foi possível detectar sua forma nativa (integral e formas processadas), além de inibir o processo invasivo de *N. caninum in-vitro* (PEREIRA et al., 2011).

A deleção de MIC2 em *T. gondii* é letal, sendo possível o controle da expressão desta molécula via genética reversa apenas pela transfecção com sistemas induzíveis de tetraciclina (MEISSNER et al., 2002). Tal ferramenta permite controlar a expressão e os efeitos desta em procedimentos como a capacidade invasiva do taquizoíta. As ferramentas para o desenvolvimento destes sistemas foram iniciadas neste trabalho, com destaque para a inserção e expressão de NcMIC2-like1 de maneira estável, além da construção de vetores para a deleção de NcMIC2-like1 por dois métodos de seleção, por cloranfenicol e pirimetamina.

1.4 – Manipulação genética através do sistema de expressão induzível por TetR/tetO

A partir das descrições de que muitas proteínas contidas nos micronemas possuem um papel na invasão, como AMA-1 e MIC2/TRAP de *Plasmodium* (PETERSON et al., 1989; ROBSON et al., 1988), *T. gondii* (BROSSIER, SIBLEY, 2005; DONAHUE et al., 2000) e *N. caninum* (LOVETT et al., 2000; PEREIRA et al., 2011; ZHANG et al., 2007), vários estudos foram desenvolvidos para elucidar o processo de invasão.

Um dos principais objetivos da maioria dos trabalhos que focam em métodos preventivos é o desenvolvimento de vacinas, baseadas em formas recombinantes de proteínas chaves (INNES, VERMEULEN, 2006) ou formas vivas ou atenuadas (INNES et al., 2011). Entretanto a complexidade envolvendo a invasão permite a evasão do parasita, não sofrendo significativamente os efeitos dos anticorpos formados contra proteínas específicas. Portanto o desenvolvimento de sistemas para controle da expressão de genes cruciais e seus respectivos efeitos oferecem novos resultados na descrição e profilaxia de *Plasmodium* (MERRICK,

DURASINGH, 2010) e *T. gondii* (KIM, WEISS, 2004).

Entre os métodos para controle da expressão, o sistema TetR/tetO foi aplicado com sucesso em *T. gondii* (HUTSON et al., 2010; MEISSNER et al., 2001; MEISSNER et al., 2002; VAN POPPEL et al., 2006). Esse sistema foi identificado como um operon que opera em bactérias gram negativas na presença de tetraciclina, basicamente na sua expulsão da região periplasmática, um mecanismo denominado efluxo, o que leva a resistência bacteriana (ZHANEL et al., 2004). O sistema é composto por TetR, uma proteína dimérica que se liga ao sítio teto, uma sequência nucleotídica, reprimindo a expressão do operon. A expressão é ativada após a interação da tetraciclina com o dímero TetR, liberando este da sequência teto, permitindo a expressão do operon e o mecanismo de resistência (KLEINSCHMIDT et al., 1988; ORTH et al., 2000). O sistema foi adaptado para *T. gondii*, TetR é expresso pelo promotor tubulina e os sítios teto estão “downstream” ao promotor RPS13, que controla a expressão do gene Lac-Z (β -galactosidase) (fig 3) (van POPPEL et al., 2006).

Adicionalmente, TetR foi expresso de modo estável pela sequência codificadora da cloranfenicol acetil transferase (CAT) flanqueada pelo promotor e região 3' do gene SAG de *T. gondii* (TgSAG1)(van POPPEL et al., 2006) .

Figura 3 – Representação esquemática do sistema de controle de expressão TetR/teto em *T. gondii*. (VAN POPPEL et al., 2006). (1) A expressão de TetR é regulada pelo promotor de tubulina; (2) O dímero de TetR na ausência de tetraciclina se liga aos sítios teto no promotor RPS13 bloqueando a expressão de Lac-Z; (3) A tetraciclina interage com TetR que sofre uma mudança conformacional, se liberando dos sítios teto, permitindo a expressão de Lac-Z.

1.5 - Inserção de genes em *N. caninum*

A forma taquizoíta dos Apicomplexa é haploide, portanto é possível incluir genes por recombinação homóloga (LIMENITAKIS, SOLDATI-FAVRE, 2011). Em *T. gondii* são utilizados vetores para a inserção de genes de modo estável baseados na resistência contra cloranfenicol, pela cloranfenicol acetil transferase (CAT) ou a Dihidrofolato Redutase – Timidilato Sintase mutada (DHFR-TS).

A resistência ao cloranfenicol foi obtida em *T. gondii* pela expressão do gene Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT) controlado pelo promotor SAG1, a primeira transfecção estável em Apicomplexas (KIM et al., 1993). A resistência contra pirimetamina foi inicialmente detectada em *Plasmodium* de pacientes não responsivos ao tratamento com inibidores de folatos, o que posteriormente foi

relacionado a mutações pontuais no gene Dihidrofolato Redutase – Timidilato Sintase (DHFR-TS) (COWMAN et al., 1988; PETERSON et al., 1988; TANAKA et al., 1990). Mutações na sequência DHFR-TS de *T. gondii* geraram cepas com níveis diferentes de resistência a pirimetamina. Um vetor baseado em duas mutações pontuais, chamadas M2M3 (TgDHFR-DHFRM2M3), foi aplicada com sucesso na integração no genoma (DONALD, ROOS, 1993).

Além de adquirir resistência, os vetores podem carrear sequências para a expressão de repórteres, como Lac-Z e YFP. Lac-Z é um gene adaptável para a marcação de diversos modelos celulares, pela expressão da enzima β -galactosidase, que cliva a lactose e seus análogos. Dois desses análogos são extensivamente aplicados para detecção de células que expressam Lac-Z, a Clorofenol red- β -D-galactopiranosida (CPRG) e 5-bromo-4-cloro-indol- β -D-galactopiranosida (X-Gal). A clivagem de CPRG converte a solução amarela para vermelho proporcionalmente à atividade de Lac-Z e é aplicado para avaliação da expressão de genes, detecção de células e como parâmetro para lise celular. A clivagem de X-Gal forma um dímero insolúvel (uma dimerização espontânea entre dois 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol), que precipita na forma de sais azuis, indicativo de expressão gênica e localização de células.

Em *T. gondii* a expressão de Lac-Z foi padronizada em 1997 (SEEBER, BOOTHROYD, 1996) e aplicado para localização, como controle de expressão gênica, avaliação de drogas e como parâmetro de lise em ensaios de secreção.

YFP, ou a proteína fluorescente amarela é uma proteína fluorescente derivada da GFP por mutação (ORMO et al., 1996). Essa tem origem na medusa *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al., 1962) e é aplicada em diversos modelos celulares como marcador de expressão ou para detecção de células (STEPANENKO et al., 2008). A expressão de YFP em *T. gondii* é aplicada para detecção e também como marcador de genes utilizados em ensaios de expressão e localização de genes (CHALFIE, 1995). A proteína fluorescente está associada com TetR, que além da possibilidade de controle da expressão, permite a marcação do taquizoíta por fluorescência.

Estes métodos de localização aparecem como uma alternativa para ensaios mais caros ou insalubres como incorporação de trítio [5,6- ^3H] ou PCR em tempo real.

1.6 - Expressão e purificação de proteínas em *E. coli* e *N. caninum*

Adicionalmente aos métodos de detecção de parasitas e genes, o aprimoramento da purificação de proteínas recombinantes é importante para a descrição de proteínas relacionadas a compreensão e combate da neosporose e outras doenças provocadas por Apicomplexas. A expressão de proteínas recombinantes de *N. caninum* em *E. coli* é bem estabelecida (DEBACHE et al., 2009; PEREIRA et al., 2011; ZHANG et al., 2007), porém o problema da solubilidade persiste, requerendo o uso de métodos laborosos como a diálise, filtração em gel, diluição e diluição em fase sólida (TSUMOTO et al., 2003). O desenvolvimento de métodos que poupam tempo e energia, como a ligação de sequências que melhoram a solubilidade e mantem a grande capacidade expressiva do sistema bacteriano foi um parâmetro explorado nesse trabalho. *N. caninum*, como outros organismos, possuem sequências de DNA (expressas ou não) que acopladas ao sistema de expressão, podem melhorar a solubilidade das proteínas obtidas. A sequência encontrada no contig 1080 do genoma de *N. caninum* indicou que há regiões no genoma com sequências repetitivas de resíduos negativos. Tal metodologia abre possibilidades tanto na obtenção de proteínas relacionadas ao processo invasivo/replicativo de *N. caninum* quanto enzimas de uso industrial.

A expressão bacteriana apresenta algumas desvantagens, como a limitação das possibilidades de modificação pós traducional, e a formação de proteínas insolúveis e inativas pela conformação errônea pelo seu sistema de tradução/enovelamento (BRONDYK, 2009). Sistemas de expressão em outros modelos como leveduras (CEREGHINO, CREGG, 1999), células de insetos (KOST et al., 2005) e células de mamíferos (Werner et al., 1998) foram desenvolvidas e proteínas purificadas pela adição de uma cauda composta por seis histidinas e purificação em coluna de níquel. Apesar de bem padronizado para diversos modelos, o filo Apicomplexa carece dessa forma de obtenção, purificação e aplicação de proteínas recombinantes expressas pelo próprio parasita.

Apesar da importância de *N. caninum* como parasita da área veterinária e dos avanços na área de imunologia e bioquímica relacionadas, este ainda carece de mecanismos moleculares, já bem estabelecidos para *T. gondii* e *Plasmodium*. A compreensão mais abrangente do funcionamento de proteínas relacionadas ao ciclo do parasita como NcMIC2-like1 abre novas perspectivas para o combate da

neosporose. Para esta compreensão é necessário desenvolver ferramentas moleculares como a inserção ou deleção deste gene e posterior verificação dos seus efeitos sobre o parasita. Os resultados da caracterização, obtenção e manipulação genética de NcMic2-like1 oferecerão uma nova referência para a pesquisa sobre *N. caninum* e para todo filo Apicomplexa.

1.7 - Justificativa

Neospora caninum é um parasita Apicomplexa relacionado a abortos e perda de fertilidade em bovinos, o que leva a grandes prejuízos para a pecuária mundial. Possui um mecanismo de invasão próprio e ativo, como todos os membros do filo, que permite a invasão e replicação na célula hospedeira. Esse mecanismo depende da secreção de proteínas contidas em organelas (micronemas, roptrias e grânulos densos), com destaque para as que ligam as moléculas adesivas da célula hospedeira ao motor de actina miosina do parasita. É nessa capacidade de invasão e replicação que reside alguns pontos que, se bem entendidos, levariam a uma nova frente de combate a neosporose. Além do entendimento da reação imune e fatores bioquímicos do parasita, há a possibilidade de manipulação genética das suas formas taquizoítas, contribuindo para o entendimento do funcionamento de genes relacionados à sobrevivência. As principais ferramentas de manipulação são a inserção e deleção de genes por recombinação homóloga. Vetores compostos pelo promotor e região 3'UTR de genes do parasita são ligados às sequências codificadoras de genes de resistência a cloranfenicol (CAT) ou pirimetamina mutada (DHFRM2M3) que, após transfecção, conferem resistência estável e integração ao genoma haplóide dos taquizoítas. Esse efeito possibilita não somente a deleção ou inserção de genes como também viabiliza a adaptação de sistemas de controle de expressão. Dentre estes métodos, o sistema TetR/tetO ativada pela tetraciclina aparece como opção, amplificando conhecimentos sobre a função de genes e proteínas. Essa forma de avaliar genes foi adaptada para *T. gondii* e *Plasmodium*, porém ainda é pouco desenvolvido para *N. caninum*. O foco desse trabalho foi o desenvolvimento de formas de inserção e deleção de genes em *N. caninum*, baseadas na resistência a cloranfenicol e pirimetamina, como também aplicação do sistema TetR/tetO de modo estável. A manipulação molecular de *N. caninum* permite a marcação do taquizoíta com genes repórteres e a padronização de métodos para

avaliar os processos invasivo e replicativo, além da hiperexpressão e deleção de genes. O gene de escolha expressa a proteína micronêmica NcMIC2-like1 que em trabalhos anteriores inibiu grande parte do processo invasivo *in vitro* (PEREIRA et al., 2011). A compreensão da função dessa proteína depende das ferramentas desenvolvidas nesse trabalho e coloca NcMic2-like1 como a primeira a ser caracterizada de modo molecular, que guiará o delineamento de ensaios para outros genes e definirá sua capacidade como alvo terapêutico, que até o momento se revelou promissor.

2 – OBJETIVOS

- Adaptação do sistema TetR/tetO para *N. caninum*;
- Desenvolvimento de métodos de inserção e deleção de genes em *N. caninum*;
- Desenvolvimento de ferramentas moleculares para expressão recombinante em *E. coli* e *N. caninum*;
- Finalização da caracterização, identificação e solubilização de NcMIC2-like1;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Manutenção e purificação do parasita

3.1.1 - Linhagem de *N. caninum*

O isolado de *N. caninum* utilizado neste trabalho foi o Nc-1 (DUBEY et al., 1988), cedida gentilmente pela Prof Dra Solange M. Gennari, da FMVZ, USP.

3.1.2 - Cultura de *N. caninum*

Os taquizoítas foram cultivados em monocamadas de células VERO mantidas em garrafas de 25cm² e 75cm² a 37°C com 5% CO₂, em meio RPMI 1640 com 2 mM de glutamina (Gibco) contendo 5% de soro fetal bovino (Gibco) e penicilina/estreptomicina (50U ou µg/ ml). Os taquizoítas foram purificados a cada 5 dias após passagem na coluna PD10 (Sephadex G-25, Amersham Biosciences), previamente equilibrada em PBS. Após contagem o conteúdo foi centrifugado (12.000g por 3 min, 4°C) e o pellet resuspendido em volume adequado de meio RPMI 1640 (2 x 10⁷ taquizoítas/ml de meio).

3.2 - Técnicas gerais de biologia molecular

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

Para extração de DNA genômico de *N. caninum* foram utilizados taquizoítas purificados e resuspendidos em tampão de lise (40 mM TRIS-HCl pH 8,0; 80 mM de EDTA pH 8,0; 2% de SDS e 0,1 mg/ml de proteinase K), incubados a 37°C por 1 hora e o DNA extraído com clorofórmio:fenol (1:1) e precipitado com acetato de sódio (pH 5,0) e etanol por 18hs a -20°C. O pellet final foi ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.0, 1 mM EDTA). A concentração de DNA foi quantificada por espectrometria UV capilar (Genequant, GE Healthcare).

3.2.2 - Extração de RNA

O processo de extração de RNA total de taquizoítas de *N. caninum* foi feito com Trizol™ (Gibco-BRL), tratado com DNase I (New England Biolabs) e quantificado por espectrometria UV capilar (Genequant, GE Healthscience), medida da relação entre os comprimentos de onda de 260nm (pico de detecção de nucleotídeos) e 280nm (pico de detecção das proteínas). Apenas amostras com relação 260/280nm entre 1,6 e 2,0 foram utilizadas.

3.2.3 - Síntese de cDNA total

Ao RNA total (1,5µg) foram adicionados 1µl do primer poli-T (2 pmol/µl), e 1µl de dNTP (10mM de cada base). A amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos para eliminar possíveis estruturas secundárias, resfriada em gelo por dois minutos e centrifugada a 13000 g por 30 segundos a 4°C. Foi adicionado 4µl de tampão da enzima transcriptase reversa 5X (GoScript™ 5X Reaction Buffer, Promega), 2µl de DTT 0,1M (Ditiotreitol), 1µl de inibidor de ribonuclease (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega, 40U/µl), 1µl da enzima transcriptase reversa (GoScript™ Reverso Transcriptase, Promega, 15U/µl). A amostra foi homogeneizada, centrifugada e incubada a 25°C por 10 minutos, em seguida a 37°C por 50 minutos em banho-maria para polimerização. Posteriormente foi incubada a 70°C por 15 minutos para inativação, em banho seco, seguido de 2 minutos no gelo. Para eliminar o RNA hibridizado à nova molécula de cDNA, foi utilizado 1µl da ribonuclease RNase H (2U, Invitrogen) com incubação por 20 minutos a 37°C em banho-maria.

3.2.4 - Reação da em cadeia da polimerase (PCR)

Para realização da PCR foi utilizado tampão PCR Buffer, 10x (HotStarTaq, Qiagen) contendo 0,2 mM de dNTP mix; 1,5 mM de MgCl, 20 pmol de cada primer e 100 ng de DNA ou 2 µl de cDNA e 1 unidade de DNA polimerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Quiagen) em um volume total de 50 µl. Para clonagem, a enzima HotStarTaq foi substituída pela HotStar HiFidelity DNA

Polymerase, ambas da Qiagen. As condições da PCR foram padronizadas, baseadas em desnaturação a 94°C, 15 minutos; e três ciclos a diferentes temperaturas de anelamento, iniciando com 5 ciclos de 30 segundos a 94°C; 5 ciclos de 30 segundos a 60°C; 5 ciclos de 2 minutos a 72°C; seguido de 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 5 ciclos de 30 segundos a 55°C, 5 ciclos de 2 minutos a 72°C e 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a 50°C e 25 ciclos de 2 minutos a 72°C, com ciclo final de 10 minutos a 72°C.

3.2.5 - Purificação do gel de agarose

Para a purificação de DNA do gel de agarose foi utilizado o illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit da GE Healthcare. O procedimento consistiu em excisar o fragmento de um gel de agarose medindo sua massa dentro de um peso máximo de 400 mg. Foi adicionado o volume em µl equivalente a massa em µg volumes de tampão de captura, incubado por 10 minutos a 50°C e homogeneizado em vortex por 2 a 3 minutos até o gel não ser mais visível na mistura. O gel solubilizado foi pipetado sobre uma coluna spin acondicionada em tubo de 2ml, obedecendo sempre um limite de 800 µl para cada conjunto. Após centrifugação a 10000 g por 1 minuto, o volume eluído foi descartado e a coluna recolocada sobre o mesmo suporte. Após a adição de 700µl de tampão de lavagem, a amostra foi centrifugada a 10000g por 1 minuto, descartando o filtrado e mantendo a coluna sobre o mesmo tubo, centrifugado por mais 1 minuto a 10000g retirando o tampão residual. A coluna foi colocada sobre um novo tubo de 1,5 ml e adicionado 30µl de tampão de eluição, centrifugado a 10000g por 1 minuto, obtendo-se o material genético.

3.2.6 - Ligação de insertos no pGEM

A reação de ligação foi feita com 1 U weiss da enzima T4 DNA Ligase (Promega), 50 ng do vetor pGEM Teasy (Promega), 1 a 3 µl do fragmento a ser inserido e água milli-Q para volume final de 10 µl. A reação foi incubada a 4° C por 18 horas.

3.2.7 - Transformação em células Top10 e seleção das colônias

O plasmídeo ligado ao inserto foi inserido em *E.coli* eletrocompetentes (Top10, Invitrogen) por eletroporação. A solução contendo a ligação (1 µl) foi homogeneizada com 50 µl da suspensão de bactérias competentes em cubetas de eletroporação (2 mm, Bio-Rad) em gelo e submetidas a um pulso elétrico no aparelho GenePulser Xcell Bio-Rad (capacitância de 25 µF; resistência de 200 Ω; voltagem de 2,5 kV). Após o pulso elétrico foi adicionado 250 µl de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10mM MgSO₄ e 20mM de glucose) a temperatura ambiente. Este material foi transferido para tubo de 15 ml, incubado por 1h a 37°C e 350 rpm. Após incubação a suspensão foi plaqueada em placas com meio LB (meio Luria-Bertani, composto de 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl, agar e pH 7,0) com ampicilina (50µg/ml, Sigma) e 40µl de X-Gal (no caso de plasmídeos ligados a pGEM, 80ug/ml, Promega) e incubadas a 37°C por 16 horas. Foram escolhidas colônias isoladas e inoculadas em tubos de 50 ml com 5 ml de meio LB líquido e ampicilina (50µg/ml), por aproximadamente 16 horas. Os plasmídeos foram extraídos das suspensões por mini-prep.

3.2.8 - Purificação dos plasmídeos (minipreps)

Os plasmídeos foram purificados pelos kits o illustraplasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare) ou Axyprep Plasmid Miniprep (Axygen) que possuem basicamente as mesmas etapas. Cada suspensão de bactérias transformadas foi transferida para um tubo de 2 ml e centrifugada a 12000g por 5 min e o pellet recebeu 175 µl (GE) ou 250 µl (Axygen) do tampão de ressuspensão. As amostras foram resuspendidas em vortex e receberam 175 µl (GE) ou 250 µl (Axygen) de tampão de lise, homogeneizada gentilmente, incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, neutralizada com 350 µl (GE e Axxygen) de tampão de neutralização e gentilmente homogeneizada até a formação do precipitado. O sobrenadante foi obtido por centrifugação a 12000g por 10 minutos, transferido para uma coluna de separação devidamente acondicionada em um tubo coletor, centrifugado por 1 min a 12000g e descartado o líquido. As colunas de sílica foram lavadas com 400 µl (GE) ou 700 µl (Axygen) de tampão de lavagem, centrifugadas por um minuto a 12000g e o

processo repetido. Após descarte do tampão de lavagem, procedeu-se a uma nova centrifugação (2 min a 12000g) para limpar a coluna de traços do tampão de lavagem. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores, e cada amostra recebeu 50µl de água MiliQ autoclavada a 60°C, sendo centrifugadas por 1min a 12000g. As colunas foram descartadas e o material eluído continha o plasmídeo.

3.2.9 - Preparo de fragmentos para ligação

Todos os fragmentos utilizados foram ligados em pGEM com os sítios de restrição adequados. Os plasmídeos contendo os fragmentos foram digeridos com as enzimas específicas (10U de cada enzima BamHI, HindIII, XhoI, EcoRI, PstI, AvrII, XbaI, NotI, BglII, NruI) por 3 horas e submetidos à eletroforese em gel de agarose, excisão do fragmento e purificação (item 3.2.5), eluídos em 30 µl de água mili-Q autoclavada. A integridade e quantidade dos fragmentos foram avaliadas após corrida de 8 µl da amostra em gel de agarose.

3.2.10 - Preparo de plasmídeos para ligação

Os plasmídeos (4000 ng) foram tratados com as suas respectivas enzimas de restrição (10U de cada enzima por 3 horas). Todo o conteúdo foi purificado por eletroforese em gel de agarose, onde as bandas de tamanhos esperados foram cortadas e purificadas (item 3.2.5) em 30 µl de água mili-Q autoclavada. Por fim, 8 µl das amostras foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose e submetidas à reação de ligação com seu respectivo fragmento.

3.2.11 - Ligação

O plasmídeo tratado (50 a 100 ng) e três vezes (de 150 a 300 ng) o respectivo fragmento oriundo da digestão de pGEM, foram submetidos a reação de ligação. Estes receberam 2µl de 10X tampão de ligação (Fermentas), 2 µl de DTT 100mM (Ditiotreitol), e quantidade de água livre de nuclease (água Milli-Q autoclavada) para completar 19 µl. A este conjunto foi adicionado 0,5 U weiss (1 µl) de ligase (Fermentas) previamente diluída em tampão de ligação 1X na proporção

1:1 (1 parte de ligase 1 U weiss/ μ l e 1 parte de tampão de ligação 1X). Cada reação foi incubada em banho-maria por 18 horas a 16°C e 1,0 μ l de cada reação foi transformada na linhagem hospedeira *Escherichia coli* Top 10.

3.3 - Expressão de NcMIC2-like1 recombinante solúvel

3.3.1 - Detecção da região solúvel

Um fragmento hipotético de 300 pb formado por um par de codons de ácido glutâmico e ácido aspártico foram organizados em tandem e submetido a um blast contra o genoma de *N. caninum* presente no banco de dados do Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/n_caninum). A solubilidade do fragmento detectado e fusionado à sequência de NcMIC2-like1 foi avaliada pelo programa Recombinant Protein Solubility Prediction of University of Oklahoma (<http://www.biotech.ou.edu/>).

3.3.2 - Obtenção do fragmento Nc1081 e ligação a NcMic2-like1

Após o blast, dentre as sequências com similaridade ao fragmento hipotético, o contig (1081) continha uma região mais solúvel de 185 pb com alta concentração de resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico. Esta região foi amplificada por PCR com primers forward (Forsol hind) e reverso (Revsol Xho) contendo os respectivos sítios de restrição HindIII e XhoI (tabela 1).

Tabela 1 - **Primers para amplificação da sequência 1081.** Um par de primers forward (Forsol Hind) e reverso (Revsol Xho) foram delineados para amplificação da região mais solúvel do contig 1081. Estes receberam respectivamente sítios de restrição *HindIII* e *XhoI* (indicados em negrito na tabela) para ligação em NcMic2-like1. A tabela indica o nome (For, forward e Rev, reverse), a sequência 5' – 3' e os sítios de restrição em negrito.

Nome	Sequência 5' - 3'
Forsol Hind	TTT AAGCTT GCGGAAGATAAAGAGGAGGAA
Revsol Xho	TTT CTCGAGCTT CGAGCGATTCTGCTTCT

O fragmento obtido foi excisado do gel e purificado com o kit illustra™

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit da GE Healthcare, subclonado no pGEM (pGEM t-easy, Promega) e inserido na cepa *E. coli* Top10 eletrocompetente. A subclonagem se fez necessária para armazenamento da sequência, dispensando a realização de PCRs para a sua obtenção, etapa passiva de contaminações. O plasmídeo pGEM-Nc1080 foi purificado com o kit Axyprep Plasmid Miniprep (Axygen) e tratado com HindIII e XhoI. O fragmento Nc1080 liberado foi excisado, purificado e ligado ao vetor pET28/NcMic2-like1 (PEREIRA et al., 2011) previamente tratado com as mesmas enzimas, gerando o vetor pET28/NcMic2-like1/Nc1081 (fig 4, A e B).

B

Sequência NcMic2-like1/Nc1081

```

1  GTGTCACTAG  TGCAGGCAGC  GTCAAATGAA  GCGGGCGATC  AACTTCAAAC
51  ATGTACGAAG  GTTATGGACT  TGTTCGTGCT  TGTTCATGAT  TCCGCCAGTA
101  TTGGGTCGAG  GAATTTTCGAG  CAAGTCCGCA  AATTTGTTCT  GGATTTTCATA
151  GACTTGGTTC  CCATCTCCTC  TGAAGAGGTT  CACCTTTCGG  TGGTGACCTT
201  CGCGGACTCA  CCGCAGGACG  TCTTCACTTT  CAAGCAACCT  CAGGCAACCA
251  ACAAGCAACT  GGCGAAAGAA  GCATTTAAAT  ACCTGAGATA  CCGGAGGGGG
301  GGAAGTACGG  CGACGGACAA  AGGCCTTATA  CGCGCACGCC  GATACCTCAC
351  CCGCCCCGTG  TATGGCACGC  GAGCGAACGT  ACCGAAGGTG  CTGGTGCTCA
401  TGACAGATGG  CGAATCGGAC  AGGCATTACG  ACACCATCCA  AGCTGCGGAC
451  CAAGCAAGAG  CTGAGGGCAT  TTCGGTTTTT  GTTGTGGCG  TTGGAATGGC
501  CAACCCTGTA  GAGTGCCGTG  GTGTCTGTGG  GTGCGGGAGG  TACGGCCCTT
551  GTCCGCAGTT  TATCATGTCC  AACTGGAACG  AACTGGTACA  AACTGTTCGAT
601  TCGATTATGG  GTGAAGTGTG  CAAGAAATTG  CCCAAAGATG  CAGAGTGCAG
651  CGAGTGGAGC  GAATGGTCGG  GGTGCACAGC  CTCTTGTGGC  GCCGGCACGC
701  GCACCAAAC  TCGGAAGCAA  CTGTCCCCGC  CGCTGGCTGG  AGATCCCCCA
751  TGCGACAAC  GCGAGCCGAT  GATGGGCAAA  ACGTGTGAAG  ATCTTGGAGG

```

```

801 TCTTGTGAGG GTTGAGGATT GCAACCAGGG CGAGTGCCCC CAGGACGCCG
851 GCTGTGGAAC GTGGGGCGAA TGGACTTCGT GGTCGGCTAC ATGTGGGCAT
901 GCATCGCGCA GCCGTAAGCG CGAGGGATAT AACACTCCGC CGCCAAGAGG
951 CGCTGGGCTG CTCTGTGAGC AGAAGCGACC TCCTGTTCCC CGAGAGCAAA
1001 GCGAGGAGAC GGATTTTCGCT CCGTGTCTCT GCAACCAAGT TCCGGGAGAG
1051 TGGACGGACT GGTCTGTTTG CTCGGCCACC TGTGGAGGCG GAACGCGACA
1101 CAGAAGTCGG TCAGGATCTC CGCAGGCGGA AGATAAAGAG GAGGAAGATG
1151 AAGAGGCGGA AGATGAAGCG ACGGAAGATA AAGAGGCGGA AGATAAAGAG
1201 GCGGAAGATG AAGAGGCGGA AGAGGAAGAG GCGGAAGAGG AAGAGGCGGA
1251 AGATGACGAA CAGAACGAAG AGGAAGAGGG AGAGGAAAGA GAAGCCGAAT
1301 CGCTCGAAGC

```

Figura 4: **Representação do vetor pET28/NcMic2-like1/Nc1080.** O fragmento 1080 foi tratado com HindIII e XhoI e ligado em “frame” com NcMic2-like1 em plasmídeo pET28 e as proteínas fundidas foram flanqueadas por duas caudas de histidina. A = Esquema de NcMic2-like1/Nc1080; B = Sequência genômica de NcMic2-like1/Nc1080. O fragmento Nc1080 está destacado em cinza.

O vetor pET28/NcMic2-like1/Nc1080 foi clonado em *E. coli* TOP10 eletrocompetente e após confirmação por sequenciamento o vetor foi clonado em *E. coli* BL21 para expressão.

3.3.3 - Expressão em BL21 e purificação

Para a expressão, a cepa *E. coli* BL21 foi transformada com pET28/NcMic2-like1 e pET28/NcMic2-like1/Nc1080 e as culturas incubadas com 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranoside (IPTG) por 2 horas, acompanhadas pelo controle sem IPTG. As culturas foram centrifugadas e os pellets resultantes foram sonicados para extração e purificação das proteínas. Para o clone pET28/NcMIC2-like1 os pellets foram sonicados em tampão ureia 0,5; 1; 2; 4 e 8M e uma alíquota de cada um separado em eletroforese SDS-PAGE 10% e coradas com comassie G. Os pellets do clone pET28/NcMIC2-like1/Nc1080 foram sonicados com tampão Tris 10 mM (pH 8,0) e a fração solúvel recebeu ureia sólida até atingir 8M. Esta fração foi purificada em uma coluna PD10 (GE) preenchida com sepharose-níquel (Ni Sepharose 6 Fast flow, GE). Após preparo da coluna, a fração foi adicionada e o líquido eluído. A coluna foi lavada sucessivamente com tampão ureia 8M pH 8,0;

ureia 8M pH 6,3; um gradiente de Tris 10 mM com imidazol (10, 20 e 50 mM) e a proteína NcMIC2-like1/Nc1080 foi eluída após a adição de Tris 10 mM com 250 mM de imidazol. As proteínas eluídas foram detectadas após reação com uma solução de Bradford e analisadas após eletroforese SDS-PAGE 12,5% coradas por comassie blue G.

3.4 - Transfecção e seleção de taquizoítas resistentes

Vetores que serviram de base para a expressão de Lac-Z e YFP/TetR foram aplicados para o controle da expressão por tetraciclina em *T. gondii* (van Poppel et al., 2006). Para a expressão de Lac-Z, o vetor TgRPS13-tetO/Lac-Z controlado pelo promotor RPS13 de *T. gondii*, foi substituído pelos promotores RPS13 e Tubulina (Tub) de *N. caninum*, gerando os vetores NcRPS13-tetO/Lac-Z e NcTub-tetO/Lac-Z. Para a expressão de YFP/TetR, o promotor de tubulina do vetor de *T. gondii* TgTub-YFP/TetR, foi substituído pelo homólogo de *N. caninum*, resultando no vetor NcTub-YFP/TetR.

3.4.1 - Transfecção transiente sobre *N. caninum*

Taquizoítas purificados ($1,7 \times 10^7$) em 250 μ l de tampão de eletroporação (KCl 120 mM; CaCl₂ 0,15 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 100mM, pH 7,6; Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico 25 mM; EDTA 2 mM; MgCl₂ 5mM) acrescido de 5 μ l de glutatona reduzida (250mM) foram eletroporados com 25 μ g de plasmídeo sob 1,8 kV, 100 Ω , 25 μ F. A suspensão resultante foi incubada em cultura de células vero mantidas em placa de 6 poços por 18 hrs. Cada poço recebeu 400 μ l de tampão de lise para CPRG (Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico 100 mM pH 8,0; CaCl₂ 1mM; Triton X-100 1%) e 5mM de DTT (Ditiotreitol), incubado por 1h a 50 °C. A solução resultante foi distribuída sob três concentrações (4.76; 12 e 31%) em tampão de lise e adicionado 6,25 mM de CPRG (clorofenolred- β -D-galactopiranoside, Roche), sendo a absorbância medida a 570nm em leitor de ELISA. A atividade da enzima β -galactosidase (expressão de Lac-Z) foi avaliada após 18h de reação com CPRG à 37°C. A porcentagem de expressão de Lac-Z foi calculada pela diferença entre a absorbância dos taquizoítas transfectados e não

transfectados, dividido pela absorbância dos não transfectados multiplicado por 100.

3.4.1.1 – Comparação entre os promotores RPS13 e Tubulina de *N. caninum* e RPS13 de *T. gondii*

Para a comparação entre os promotores de *T. gondii* (RPS13) e *N. caninum* (RPS13 e Tubulina) em *N. caninum*, taquizoítas deste (5×10^7) foram transfectados com 25 µg de NcRPS13-tetO/Lac-Z, NcTub-tetO/Lac-Z ou TgRPS13-tetO/Lac-Z e mantidos em garrafas de 25 cm² com células vero. Após o ciclo lítico, os taquizoítas foram purificados e 1×10^6 /poço (triplicata) foram incubados por 18 hrs em uma placa de 24 poços (TTP) com monocamada de células vero. As células foram lisadas com 200 µl de tampão de lise para CPRG e duas concentrações (4 e 6%) foram incubadas com CPRG e os resultados tratados do mesmo modo que descrito no item 3.4.1.

3.4.2 -Transfecção estável em *N. caninum*

Este procedimento foi utilizado para transfecção e seleção de vetores de resistência a cloranfenicol ou pirimetamina. Taquizoítas purificados (1×10^8) em 750 µl de tampão de eletroporação foram eletroporados com 25 µg de plasmídeo de resistência (contra cloranfenicol ou pirimetamina) sob 1,8 kV, 100Ω, 25µF, BioRad. A suspensão resultante foi incubada em cultura de células vero mantidas em garrafas de 25 cm² em RPMI. Após 24 h de incubação foram adicionados 30 mM de cloranfenicol ou 1 mM de pirimetamina. Após um ciclo lítico os taquizoítas foram purificados e cultivados ou com 20 mM de cloranfenicol ou com 1 mM de pirimetamina até o surgimento de parasitas resistentes. Após a estabilização da cultura, os taquizoítas foram purificados e no caso dos resistentes ao cloranfenicol a enzima cloranfenicol acetil-transferase foi avaliada por CAT-ELISA (Roche).

3.4.3 - Expressão de cloranfenicol acetil-transferase (CAT-ELISA)

Taquizoítas transfectados (1×10^7) resistentes ou não (controle) foram submetidos ao ensaio para determinação da produção de cloranfenicol acetil-transferase (CAT- ELISA, Roche). As células vero com taquizoítas de cada garrafa

foram lisadas por passagens em agulha 26G_{1/2}, centrifugadas a 1000 g, lavadas com PBS. Estes passaram em filtro de 5 µm, que separa as células vero restantes dos taquizoítas, e centrifugados a 1000g. O pellet resultante foi submetido à lise com 1ml do tampão contido no kit, incubado por 30 min a temperatura ambiente, centrifugado por 10 min, 10000 g à 4 °C e 200µl do sobrenadante foi adicionado aos poços cobertos por anti-CAT (triplicata). Após incubação de 1h a 37 °C, o conjunto foi lavado 5 vezes com tampão próprio e foram adicionados 200µl de anti-CAT-DIG (2µg/ml, DIG ou digoxigenina está ligado a anti-CAT), incubados por 1h, 37°C e submetidos à lavagem. O conjunto recebeu 200µl de anti-DIG-POD, (150mU/ml, com a POD ou peroxidase, ligada a anti-DIG), incubados por 1h, 37°C, que após lavagem, recebeu 200µl de substrato POD, incubado por 10 min à temperatura ambiente e a absorbância mensurada a 405 nm em leitor de ELISA.

3.5 - Técnicas para detecção de proteínas

3.5.1 - SDS-PAGE primeira dimensão (1D)

Taquizoítas purificados (1×10^7) em 100 µl de tampão de amostra (ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%) foram lisados por sonicação e centrifugados por 10 min, 10.000 g. O mesmo procedimento foi realizado com *N. caninum* selvagem como controle. Uma amostra de 7µl dos taquizoítas estáveis e 10 µl do controle (a maior quantidade de proteínas totais do controle evidencia melhor a presença de proteínas heterólogas na amostra, diminuindo a chance de falso positivo) foi separada por eletroforese em 1D-SDS-PAGE (gel de 10%) e corada por coomassie G.

3.5.2 - SDS-PAGE segunda dimensão (2D)

O extrato proteico de *N. caninum* (50µg/strip) foi dissolvido no tampão de reidratação composto de ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, mistura de anfólitos carregadores (pH 3 a 5,6 NL em Immobiline Drystrip gels, GE), ditiotretol (DTT) 20 mM e suplementado com inibidores de protease (Protease Inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich). As amostras foram aplicadas em strips com pH imobilizado (IPG) de 7 cm (pH 3 - 5,6 NL), reidratadas por 18 horas e focalizadas no aparelho Ettan IPGPhor 3

(GE) (20 min 100 V, 30 min 300 V, 1,2 h 1000 V, 15 min 5000 V, seguido de 5000 V até o acúmulo de 5000 kV). Após a focalização, as strips foram incubadas com 30 mM de DTT no tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, ureia 6 M, SDS 2%, glicerol 30%, pH 8.8) por 15 min seguida de 15 min com 135 mM de iodoacetamida no tampão de equilíbrio. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em géis de 10% e corados com coomassie G. As imagens foram capturadas em scanner (Image Scanner, GE) e geradas pelo software LabScan v5.0.

3.5.3 - Western blot

O gel 2D com o extrato protéico de *N. caninum* foi transferido para uma membrana PVDF (ImmobilonTM-P, Millipore) pelo sistema semi-seco (TE 77 PWR, Amersham Biosciences) em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375%, methanol 20%) com 0,81 mA/cm² por 1 hora e 15 minutos. A membrana foi bloqueada com gelatina suína 0,8% (Sigma-Aldrich) diluída em PBS com Tween 20 0,05% (PBST) por 1 h à 37°C. O soro anti-NcMIC2-like1 foi diluído em PBST com gelatina suína 0,2% e incubado com membrana por 18 hrs à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST, a membrana foi incubada com anticorpo anti-coelho-conjugado a peroxidase (ZyMed-Invitrogen) por 1 h à 37°C e então lavada três vezes com PBST. O sinal da reação pela peroxidase foi obtido pela incubação com substrato quimio-luminescente para detecção de peroxidase (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). As membranas foram expostas a filmes em diferentes períodos (10, 30, 45 seg, 1 e 5 min), revelados e capturados pelo escaner Image Scanner (GE).

3.5.4 - Espectrometria de massas

Os spots ou bandas localizadas por coomassie em comparação com o western blot foram excisados e lavados uma vez com água Mili-Q, duas vezes com bicarbonato de amônio 50 mM pH 8.0 seguido de encolhimento com acetonitrila 100%. Para a digestão proteica os spots foram incubados por 18 hrs com tripsina (Promega) à 37°C. Os peptídeos foram extraídos do gel com 100% acetonitrila, secos em concentrador à vácuo (SpeedVac) e analisados por RP-nanoLC-MS/MS. Após resuspensão em ácido fórmico a 10% os peptídeos foram aplicados no

espectrômetro de massas LTQ OrbitrapXL ETD (Thermo Electron, Bremen, Alemanha) acoplado ao sistema de HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies) na coluna de 20 mm x 100 µm (Aquat C18, 5 mm - Phenomenex, Torrance, CA) e na coluna analítica de 40 cm x 50 µm (ReproSil-Pur C18-AQ, 3 mm - Dr Maisch GmbH, Ammerbuch, Alemanha). A corrida foi realizada em 60 minutos aplicando-se gradientes de eluição com o solvente A (ácido acético 0,6%) e com o solvente B (ácido acético 0,6% em acetonitrila 80%) em uma vazão de 100 nL/min. Os 5 peptídeos ionizados mais intensos foram selecionados por fragmentação em dissociação induzida por colisão (CID). A análise MS/MS foi realizada na Holanda em colaboração com o grupo do Prof Albert J.R. Heck, do Netherlands Proteomics Center e do Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, da Universidade de Utrecht.

Os dados foram comparados com o banco de *N. caninum* Toxodb 6.4 com o auxílio do programa Mascot (versão 2.3.02, Matrix Science). Carbamidometilação de cisteínas e oxidação de metioninas foram determinados como modificações fixas e variadas, respectivamente. A busca no banco de dados foi realizada com a tolerância de 50 ppm e a tolerância do produto ionizado de 0,6 Da, permitindo duas clivagens perdidas.

3.6 – Dihidrofolato Redutase – Timidilato Sintase (DHFR-TS) de *N. caninum*

A resistência a pirimetamina é baseada na mutação do gene que codifica a enzima Dihidrofolato Redutase - Timidilato Sintase (DHFR-TS). O primeiro passo antes de realizar as mutações foi obter a sequência completa de DHFR-TS de *N. caninum* após extração de RNA, transcrição reversa e amplificação por PCR. A sequência completa foi subclonada em pGEM e sequenciada.

3.6.1 - Análise da sequência NcDHFR-TS

A sequência de Nc-1 (GeneBank: KC542883) foi processada com o programa SeqMan (DNASTar) e alinhada com os homólogos de *N. caninum* Liverpool (GeneBank: CBZ56113.1), a sequência NcDHFR-TS de Nc-1 já depositada (GeneBank: BAJ17638.1) e de *T. gondii* (GeneBank: AAB00163.1), pelo programa

Megalign (DNASTar) por clustal W e a figura gerada pelo programa GeneDoc, assim como as percentagens de identidade e similaridade das sequências.

3.6.2 - Obtenção de *N. caninum* resistente a pirimetamina

Após a caracterização de mutações na sequência de DHFR de *Plasmodium* resistente a pirimetamina em pacientes, as mutações foram testadas na sequência de *T. gondii* (DONALD & ROOS, 1993). Duas mutações, chamadas M2M3 possibilitaram a obtenção de taquizoítas resistentes e quando inserido em um vetor, este pode se integrar no genoma. A sequência TgDHFR quando mutada em dois pontos que convertem a serina 36 em arginina e a tirosina 83 em ácido aspártico, confere em *T. gondii* resistência a pirimetamina quando transfectado com um vetor cuja sequência TgDHFR-DHFRM2M3 é flanqueada pelo promotor e região 3' UTR de TgDHFR. Este vetor foi testado em *N. caninum* e foi fornecido gentilmente fornecido por Vern B. Carruthers da Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, EUA

3.6.2.1 - Mutação por PCR, QuikChange® XL site directed mutagenesis kit da Stratagene

A sequência DHFR de *N. caninum* ligada a pGEM foi submetido à mutação pontual com o QuikChange® XL site directed mutagenesis kit da Stratagene seguindo as instruções do kit (fig 5). O plasmídeo com a sequência a ser mutada é amplificada por PCR (12 - 18 ciclos, enzima Pfu turbo DNA polimerase) com primers complementares contendo as mutações. Após o PCR, o plasmídeo molde ou “template” (sem as modificações) foi tratado com 1µl da enzima DpnI (10 U), que cliva as regiões metiladas presentes apenas nos plasmídeos de origem bacteriana, enquanto os plasmídeos amplificados permanecem intactos. Os plasmídeos amplificados foram então analisados em gel de agarose (8 µl) e transformados em bactérias supercompetentes (XL-1 blue). A suspensão de bactérias foi acondicionada em gelo até a liquefação e foi incubada com 1µl da solução digerida por 30 min em gelo em um tubo de 15 ml. Esta suspensão foi aquecida em banho maria por 45 segundos a 42°C e incubada em gelo por 2 min,

resuspendida com o 500 μ l de caldo NZY⁺ (NaCl, extrato de levedura, hidrolisado de caseína e MgSO₄) a 45°C e incubada por 1 hora a 37°C 250 rpm. Esta suspensão foi dividida em duas partes e cada 250 μ l semeada em um placa de LB com ampicilina e incubadas por 18 hs a 37°C.

Figura 5 – **Mutação por PCR** QuikChange® XL *site directed* mutagenesis kit da Stratagene. A mutação é obtida por PCR com primers complementares às mutações desejadas sobre a sequência alvo clonada em um plasmídeo bacteriano. Após amplificação da sequência mutada o plasmídeo de origem bacteriana é digerido com DpnI (digere apenas DNA metilado, típico da maioria das cepas bacterianas) restando o plasmídeo amplificado. Este é clonado em bactérias supercompetentes e a mutação analisada por sequenciamento.

3.7 - Expressão, detecção e ensaios funcionais baseados na expressão da β -galactosidase

3.7.1 - Ensaio de β -galactosidase de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z (construção dos plasmídeos será detalhada em resultados)

Para avaliar a especificidade e sensibilidade da atividade de β -galactosidase em um ensaio de adesão/invasão de *N. caninum*, taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z recém purificados foram diluídos nas concentrações de 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 e 1×10^3 (para NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z foram 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 e 1×10^4) em 200 μ l de RPMI. Cada concentração foi adicionada em um poço de uma placa de 24 poços com cultura confluenta de células vero em triplicata e incubada por 2 horas 37°C 5% CO₂, para a adesão e invasão dos taquizoítas. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com 500 μ l de PBS e seus conteúdos lisados com 300 μ l de tampão de lise para CPRG (Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico 100 mM pH 8,0; CaCl₂ 1mM; Triton X-100 1%) por 1 hora a 50°C. Os lisados foram centrifugados por 10 min, 10.000g e 50 μ l do sobrenadante, em duplicata, foram incubados com CPRG por 18 horas em uma placa de 96 poços. A atividade de β -galactosidase foi proporcional a formação da cor vermelha, avaliada em um leitor de ELISA (Sunrise Tecan) a 570 nm.

3.7.2 - Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z através de SDS-PAGE 1D e 2D

Os extratos protéicos (50 μ g/amostra) de *N. caninum* NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-DHFR/NcTubYFP-TetR foram separados por SDS-PAGE 1D e 2D (com strip de 3 - 11 NL) do mesmo modo que anteriormente descritos no itens (3.5.1 e 3.5.2). Os taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z foram analisados apenas por SDS-PAGE 1D.

3.7.3 - Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z por precipitação de X-GAL

Em uma lâmina com 8 poços (Lab-Tek chamber Slide, Nunc) com cultura confluyente de células vero, foram adicionadas diluições de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z recém purificados (1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 e 1×10^4) em 200 μ l de RPMI, por poço. A lâmina foi incubada por 2 horas 37°C 5% CO₂ para a adesão e invasão dos taquizoítas (feito apenas para NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z). Após a incubação as culturas foram lavadas 3 vezes com 500 μ l de PBS e fixadas com formaldeído 2% em PBS por 15 minutos. Cada poço recebeu 200 μ l de solução de detecção de β -galactosidase, presente no kit β -Gal staining set (Roche) e incubados por 3 horas a 37°C. A solução de detecção, composta de x-Gal, ferrocianido e ferricianido de potássio, precipita na forma de sal azul pela ação da β -galactosidase. Alternativamente para confirmar a especificidade do método, taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z ou NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z recém purificados foram fixados com formaldeído 2% em PBS, lavados três vezes com PBS e centrifugados por 3 min 2.000 g. O pellet foi resuspenso na solução de detecção e incubado por 3 horas 37°C. Os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z foram lavados três vezes com PBS e resuspenso em glicerol 60%, transferidos para uma lâmina e fechado com lamínula, assim, a precipitação foi observada em taquizoítas isolados.

3.7.4 - Ensaio de crescimento de *N. caninum* NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z

Uma placa de 6 poços com células vero confluentes receberam duas concentrações de *N. caninum*, 1×10^4 e 5×10^4 por poço em 1ml de RPMI em duplicata. Como controle um par de poços com *N. caninum* selvagem foi usado como branco. Cada placa foi avaliada após 24 e 72 hrs de incubação a 37°C, 5% CO₂. Para a avaliação da atividade de β -galactosidase, os poços foram lavados três vezes com 1000 μ l de PBS e as células e parasitas lisados com 500 μ l de tampão

para β -galactosidase por 1 hora a 50°C. Os lisados foram centrifugados por 10 min, 10.000 g e 10 μ l (4%), 20 μ l (12%) e 50 μ l (25%) do sobrenadante, em triplicata, foram incubados com CPRG por 18 horas em uma placa de 96 poços. A atividade de β -galactosidase é proporcional à formação da cor vermelha, avaliada num leitor de ELISA (Sunrise Tecan) a 570 nm. As três concentrações foram comparadas e o aumento de atividade foi analisada entre 24 e 72 hrs por regressão linear e não linear.

3.7.5 - Otimização do ensaio de invasão

Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z recém purificados foram preparados na concentração de 5×10^4 em 200 μ l de RPMI. Cada dose de 200 μ l foi adicionada em um poço de uma placa de 24 poços com cultura confluenta de células vero em triplicata e incubada por 24 horas (37°C, 5% CO₂) para a adesão e invasão dos taquizoítas. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com 500 μ l de PBS e seus conteúdos lisados com 300 μ l de tampão lise por 1 hora a 50°C. Os tampões tiveram uma formulação comum (Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico 100 mM pH 8,0; CaCl₂ 1mM; Triton X-100 1%) modificados com ou maiores concentrações de TritonX (11; 6; 3,5 %) ou com diversas doses de SDS (10; 5; 1; 0.5; 0.1; 0.05; 0.01%). O controle foi o próprio tampão com TritonX 1% . Os lisados foram centrifugados por 10 min, 10.000g e 50 μ l destes, em duplicata, foram incubados com CPRG por 18 horas em uma placa de 96 poços. A atividade de β -galactosidase foi proporcional à formação da cor vermelha, avaliada em um leitor de ELISA (Sunrise Tecan) a 570 nm.

3.8 - Resgate de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/Tub-tetO/Lac-Z do genoma de *N. caninum*

DNA genômico de taquizoítas estáveis (5×10^7) selecionados após dois (NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z) ou oito meses (NcDHFR-CAT/Tub-tetO/Lac-Z) foi extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), tratados com 5 U de *Pst*I (Fermentas) por 18 hrs, purificados com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE) e eluídos em 30 μ l de água Mili-Q. O

volume de 17 μ l foi submetido a reação de ligação com 0,4 U Weiss de T4 ligase (Fermentas) por 18 hrs à 16 °C. A ligação foi clonada em *E. coli* Top10 por eletroporação (2,5 kV; 25 μ F; 200 Ω , BioRad) e as colônias resistentes a ampicilina analisadas por tratamento com PstI, EcoRI e/ou NotI. Para localização do vetor integrado, esse foi sequenciado com um primer forward (ACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGT) e reverso (CTGCGCGTAACCACCACACC) localizados, respectivamente, no final e início da região de resistência a beta-lactamase. O primer forward foi desenhado a 161 bases acima do sítio de *HindIII*, aplicada para linearização do promotor NcDHFR-TS e o primer reverso a 262 bases abaixo do fim da região 3' UTR de NcDHFR-TS. O sequenciamento foi analisado após blast no banco de dados do Toxodb (www.toxodb.org).

3.9 - Detecção de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR

Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR purificados (2×10^7) foram fixados com 2% de formaldeído por 15 min e lavados duas vezes com PBS. Os taquizoítas foram resuspensores em 1 ml de PBS e incubados por 10 min à 37°C em lâminas pré preparadas com poli-lisina (lâminas incubadas com solução de 50 μ g/ml de poli-lisina por 1 h à 37°C e secas a temperatura ambiente). As lâminas foram montadas com glicerol 60% e cobertas com lamínulas. As imagens foram capturadas em contraste de fase e com excitação e emissão respectivamente em 515 e 530 nm no microscópico Nikon Ti e câmera Nikon DS Qi1MC.

3.10 - Purificação de NcDHFR-CAT/His de *N. caninum*

A purificação em coluna de níquel-sepharose foi realizada com 1×10^8 taquizoítas trasfectados com NcDHFR-CAT/His, selvagens ou uma garrafa pequena de células vero (que resulta em uma massa de proteínas equivalentes (~2 mg/ml). Os taquizoítas selvagens e células vero foram lisados por sonicação com 500 μ l de tampão de ligação (Tris 10 mM, pH 8,0), centrifugados 10.000 g por 5 minutos, e o sobrenadante adicionado a uma coluna com 300 μ l de resina níquel sepharose (Ni Sepharose 6 Fast flow, GE) previamente equilibrada com tampão de ligação. O lisado e a resina foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente para melhor ligação das proteínas. A resina foi lavada a seguir com 3 ml de tampão de

lavagem (Tris 10 mM e imidazol 20 mM) e o procedimento repetido até não se detectar mais proteína por ensaio de Bradford (20 µl do tampão que passou pela coluna mais 200 µl de solução de Bradford), caracterizado pela formação da cor azul. A resina contendo a fração ligada foi então eluída com tampão de eluição (Tris 10 mM e imidazol 500 mM) em doses de 300 µl por tubo coletado.

Os taquizoítas NcDHFR-CAT/His foram sonicados com tampão Tris 10 mM (pH 8,0) e a fração solúvel recebeu ureia sólida até atingir 8M. Esta fração foi purificada em uma coluna PD10 (GE) preenchida com sepharose-níquel (Ni Sepharose 6 Fast flow, GE). Após preparo da coluna, a fração foi adicionada para ligação à coluna que foi então lavada sucessivamente com tampão ureia 8M pH 8,0; ureia 8M pH 6,3; um gradiente de Tris 10 mM com imidazol (10, 20 e 50 mM) e as proteínas foram eluídas após a adição de Tris 10 mM com 250 mM de imidazol. Por este método os controles não apresentaram proteínas detectáveis.

As frações eluídas foram avaliadas por bradford e as amostras positivas macroscopicamente foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e coloração com coomassie G.

3.11 - Controle da expressão em *N. caninum* por tetraciclina

O efeito da tetraciclina foi avaliado, de modo geral, após a invasão de taquizoítas em células vero seguida da adição de várias concentrações da droga. Cada ensaio foi realizado pelo menos duas vezes de modo independente.

3.11.1 - Controle transiente da expressão de Lac-Z pelo sistema TetR/tetO em *N. caninum*

Para avaliar a expressão de TetR pelo promotor tubulina, uma transfecção transiente de NcTubYFP-TetR seguida de uma transfecção com NcRPS13 tetO/Lac-Z (ou apenas este como controle) foi realizada. Taquizoítas purificados (5×10^7) foram eletroporados com 50 µg de NcTubYFP-TetR e cultivados com RPMI em células vero. Após o ciclo lítico (~48 hrs), os taquizoítas foram purificados e transfectados com 50 µg de NcRPS13 tetO/Lac-Z e 1×10^6 taquizoítas por poço foram incubados com tetraciclina (0.1; 1 e 10 µg/ml) em monocamada de

vero em uma placa de 24 poços (triplicata). O conteúdo de cada poço foi lisado com 200 µl de tampão por 1 hora 50°C, transferido para tubos de 1,5 ml, e centrifugado. Para a avaliação da expressão de Lac-Z, 5 µl do lisado foi homogeneizado com 195 µl do tampão de lise para CPRG e 40 µl de CPRG, incubado por 18 hrs, 37°C e a leitura feita a 570 nm.

3.11.2 - Indução da expressão por tetraciclina de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR estáveis e transfectados com NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z (transiente)

Os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR estáveis purificados (5×10^7) foram eletroporados com 15 µg de NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z e cultivados em células vero. Após o ciclo lítico (~48 hrs), os taquizoítas foram purificados e 1×10^6 taquizoítas por poço foram incubados por 18 hrs em monocamada de células vero em uma placa de 24 poços (triplicata). Após a incubação as culturas receberam tetraciclina (0.5; 1, 5, 10, 20 e 50 µg/ml) e em paralelo um grupo controle foi incubado apenas com RPMI. Cada poço foi lisado com 200 µl de tampão por 1 hora 50°C, transferido para tubos de 1,5 ml, e centrifugados. Para a avaliação da expressão de Lac-Z, 5 µl do lisado foi homogeneizado com 195 µl do tampão de lise e 40 µl de CPRG, incubado por 18 hrs, 37°C e a leitura feita a 570 nm.

3.11.3 - Incubação dos controles estáveis apenas com NcTub-tetO (CAT ou NcDHFRM2M3) com tetraciclina

A incubação dos taquizoítas transfectados com NcTubTet-O/LacZ sem TetR, indica se a mudança na expressão foi provocada pela a ligação da tetraciclina ao TetR, sem interferência do sistema de expressão do taquizoíta.

Taquizoítas transfectados com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z foram purificados e incubados (1×10^6 por poço) por 18 hrs com células vero. As células foram lavadas com RPMI e incubadas por 24 hrs com 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1 e 5 µg/ml de tetraciclina.

3.11.4 - Cálculo do aumento da expressão

Para todos os tratamentos com tetraciclina porcentagem de expressão de Lac-Z foi calculada pela diferença entre a absorbância dos taquizoítas tratados com tetraciclina e não tratados, dividido pela absorbância dos não tratados multiplicado por 100.

3.12 - Análise estatística

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

4 - RESULTADOS

4.1 - Expressão transiente em *N. caninum*

4.1.1 - Substituição dos promotores de *T. gondii* por *N. caninum*

Os plasmídeos TetR e tetO utilizados neste trabalho possuem os promotores de *T. gondii* (van POPPEL et al., 2006). O plasmídeo TgRPS13/tetO-Lac-Z possui o gene Lac-Z (β -galactosidase) controlado pelo promotor RPS13 de *T. gondii* com dois sítios tetO no fim deste. O plasmídeo TgTub/YFP-TetR possui a sequência codificadora de YFP fusionada com a proteína repressora de tetraciclina, TetR; controlado pelo promotor tubulina de *T. gondii*. A expressão de Lac-Z em tetO é regulada pelo promotor do gene da proteína ribossomal S13 de *T. gondii* (TgRPS13, plasmídeo TgRPS13/tetO-Lac-Z) enquanto o repressor TetR é regulado pelo promotor do gene de tubulina de *T. gondii*, (TgTubYFP-TetR) (fig 3). Para melhorar a efetividade destes plasmídeos para o sistema de expressão em *N. caninum*, os promotores dos mesmos genes em *N. caninum*, NcRPS13 (tetO) e NcTub (TetR), foram obtidos por PCR (primers, tabela 2) e ligados a pGEM.

Tabela 2 - **Primers utilizados para amplificação dos promotores dos genes RPS13 e tubulina.** Os fragmentos obtidos por PCR foram ligados a pGEM e em seguida em tetO (NcRPS13) e YFP-TetR (NcTub). Na tabela estão indicadas a identificação dos primers com as respectivas enzimas de restrição e se forward (For) ou reverso (Rev), identificação do gene no banco de dados ToxoDB (www.toxodb.org), sequência 5'-3' (com sítio da enzima de restrição em negrito) e o gene cujo promotor foi amplificado. Os primers também foram utilizados no sequenciamento das construções.

Identificação do primer	Gene Alvo do Promotor	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
For13 HindIII	RPS13	NCLIV_024870	CCC AAGCTT CCCCAGGTTTGCGTTGT
Rev13 NruI	RPS13	NCLIV_024870	CCCT CGCGA AGCTGTCTGAATTCTCTCTC
ForTub HindIII	Tubulina	NCLIV_039100	TTT AAGCTT CGCGCGTTGTTCTCTGTATTA
RevTub BglII	Tubulina	NCLIV_039100	TTT AGATCT AAGACCGGCCGTTGGACACACT

Os promotores NcRPS13 e NcTub ligados a pGEM foram tratados com as enzimas de restrição e substituíram TgRPS13 (fig 6, A) e TgTub de *N. caninum* (fig 6, B). No caso de tetO, para conservar os sítios de reconhecimento, o plasmídeo original foi tratado com NruI para poupar a região tetO original de *T. gondii*.

Figura 6 – **Substituição dos promotores TgRPS13 e TgTub (*T. gondii*) por NcRPS13 e NcTub (*N. caninum*)**. (A) Substituição do promotor TgRPS 13 de *T.gondii* no plasmídeo tetO por NcRPS13 de *N. caninum* pelas enzimas HindIII e NruI. (B) Substituição do promotor TgTub de *T.gondii* no plasmídeo TetR por NcTub de *N. caninum* pelas enzimas HindIII e BglII.

Os fragmentos NcRPS13 (651 pb) e NcTub (1990 pb) foram amplificados por PCR (fig 7, poços 2 e 6), sub-clonados em pGEM (Promega) e a presença dos insertos com os sítios de restrição foi verificado (fig 7, poços 3 e 7). Os plasmídeos *T. gondii* TgRPS13tetO/Lac-Z e TgTubYFP-TetR foram tratados respectivamente com HindIII/Nrul e HindIII/BglII, purificados e ligados aos fragmentos de *N. caninum*. Após clonagem, NcRPS13tetO/Lac-Z ou NcTubYFP-TetR indicaram as respectivas presenças de NcRPS13 e NcTub após tratamento com enzimas de restrição (fig 7, poços 4 e 8).

Figura 7 – **Construção de NcRPS13tetO/Lac-Z e NcTubYFP-TetR.** Os promotores NcRPS13 (A) e Nc tubulina (NcTub, B) foram amplificados por PCR, sub-clonados em pGEM e após tratamentos com enzimas de restrição, ligados nos plasmídeos tetO e TetR. Agarose 0,6%. 1 e 5 = Marcador de peso molecular (em pares de bases-pb); 2 = NcRPS13 amplificado por PCR; 3 = NcRPS13 em pGEM tratado com HindIII e Nrul; 5 = NcRPS13tetO/Lac-Z tratado com HindIII e Nrul; 6 = NcTub amplificado por PCR; 7 = NcTub em pGEM tratado com HindIII e BglII; 8 = NcTub YFP-TetR tratado com HindIII e BglII.

4.1.2 - Transfecção transiente da construção com os promotores de *T. gondii* (TgRPS13 tetO/Lac-Z) sobre *N. caninum*

A atividade da enzima beta-galactosidase produzida pelos taquizoítas, 18 hrs após a transdecção, foi detectada após 18 hs de incubação com CPRG. A percentagem de expressão de Lac-Z em relação ao controle variou de 320 a 650%, dependendo da concentração de *N. caninum* (fig 8).

Figura 8 – Avaliação da expressão de Lac-Z por taquizoítas transfectados transientemente com a construção contendo os promotores de *T. gondii* (TgRPS13tetO/Lac-Z). Diferentes concentrações de extrato de *N. caninum* (4.76, 12 e 31%) transfectados com o plasmídeo TgRPS13 tetO/Lac-Z foram avaliados após reação com CPRG por 18h a 570nm. A percentagem de expressão de Lac-Z foi calculada pela diferença entre a absorbância dos taquizoítas transfectados e não transfectados, dividida pela absorbância dos não transfectados multiplicado por 100. Barra preta: Taquizoítas eletroporados sem plasmídeo; barra branca: Taquizoítas eletroporados com o plasmídeo TgRPS13 tetO/Lac-Z. * indica $p < 0.001$ em comparação com os taquizoítas não pulsados.

Quando cultivado por 10 dias, os taquizoítas apresentaram de maneira geral uma diminuição na expressão relativa de Lac-Z de cerca de 100% em comparação com um dia de cultura, indicando que os plasmídeos foram realmente incorporados de maneira transiente. A avaliação indicou que é possível o uso deste sistema por no máximo 10 dias, o que permite a realização de diversos ensaios de controle da expressão do gene NcMIC2-like1 de maneira transiente.

4.1.3 - Transfecção transiente de Tet-O/Lac-Z com promotor RPS13 de *N. caninum*

Após 18 hs de transfecção de *N. caninum* com NcRPS13 tetO/Lac-Z, foi realizado o ensaio com CPRG por 18 horas de incubação, revelando uma absorbância absoluta a 570 nm duas vezes maior que o apresentado pelo tetO Lac-Z com promotor de *T. gondii*. Quando analisado a diferença relativa, houve um aumento de até 730% na absorbância em relação ao controle sem plasmídeo não pulsado e pulsado (fig 9). Apesar dos valores com 12 e 31% de extrato de *N. caninum* indicarem menor atividade devido a um aumento do controle, o extrato com menor concentração (4,76 %) apresentou alta produção relativa (730 %), minimizando a influência da produção pelo controle, demonstrando mais claramente o reconhecimento do promotor de *N. caninum*.

Figura 9 – Avaliação da expressão de Lac-Z por taquizoítas transfectados transientemente com a construção contendo os promotores de *N. caninum* (NcRPS13 tetO/Lac-Z). Diferentes concentrações de extrato de *N. caninum* (4.76, 12 e 31%) transfectados com o plasmídeo NcRPS13 tetO/Lac-Z foram avaliados após reação com CPRG por 18h a 570nm. A porcentagem de expressão de Lac-Z foi calculada pela diferença entre a absorbância dos taquizoítas transfectados e não transfectados, dividida pela absorbância dos não transfectados multiplicado por 100. Barra preta: Taquizoítas eletroporados sem plasmídeo; barra branca: Taquizoítas eletroporados com o plasmídeo NcRPS13 tetO/Lac-Z. * indica $p < 0.001$ em comparação com os taquizoítas não pulsados.

4.1.4 - Comparação dos promotores NcRPS13tetO/Lac-Z, NcTubtetO/Lac-Z e TgRPS13 tetO/Lac-Z

Para verificar se haveria diferenças de expressão de Lac-Z entre os promotores de *N. caninum* e *T. gondii*, plasmídeos que expressam Lac-Z controlados pelos promotores NcRPS13, NcTub e TgRPS13 foram comparados. Taquizoítas purificados (5×10^7) foram transfectados com 25 µg de NcRPS13tetO/Lac-Z, NcTubtetO/Lac-Z ou TgRPS13 tetO/Lac-Z e incubados separadamente em garrafas T-25 cm² com monocamada de vero. Após o ciclo lítico (~48hrs), os taquizoítas foram purificados e 1×10^6 por poço (triplicata) incubados por 18 hrs em uma placa de 24 poços com uma monocamada de células vero e lisados com 200 µl de tampão de lise de CPRG. O lisados foram centrifugados e 8 µl (4%) e 12 µl (6%) homogeneizados respectivamente com 200 e 190 µl de tampão de lise e incubados com 40 µl de CPRG. Após 18 hrs de reação a 37°C as amostras foram analisadas a 570 nm.

Quando comparados os promotores de *N. caninum* (NcRPS13 e NcTub) com de *T. gondii* (TgRPS13) foi verificado que a atividade de β-galactosidase controlada pelos promotores de *N. caninum* foi maior. O promotor tubulina de *N. caninum* apresentou a maior expressão, com porcentagens variando de 22.82 a 28.8% seguido pelo promotor RPS13 de *N. caninum* (16.26 a 24.09%). Ambos os promotores exibiram valores acima do promotor RPS13 de *T. gondii* (16.26 a 17.48%) (fig 10). Isso demonstra que a troca do promotor RPS13 de *T. gondii* pelos promotores de *N. caninum* resultou em aumento da expressão de Lac-Z. A diferença entre NcRPS13 e NcTub poderia ser explicada pela possível diferença de tamanho destes (respectivamente 561 contra 1999 pb), fatores relacionados a eficiência da transfecção, pureza e integridade dos plasmídeos ou ainda a possibilidade de que o promotor de tubulina seja realmente mais forte. A diferença entre os valores da transfecção transiente e a comparação dos promotores se deve ao numero de taquizoítas incubados com as células vero. Na transfecção transiente foram aproximadamente 3×10^7 enquanto na comparação dos promotores 1×10^6 por poço.

Figura 10 – **Comparação da atividade de β -galactosidase entre promotores de *N. caninum* e *T. gondii*.** Diferentes concentrações de extrato de *N. caninum* (4% e 6%) transfetados com os plasmídeos NcRPS13 tetO/Lac-Z, NcTub tetO/Lac-Z e TgRPS13 tetO/Lac-Z foram avaliados após reação com CPRG por 18h a 570nm. A produção relativa de Lac-Z foi calculada tomando como referência a absorbância dos taquizoítas não eletroporados como 0%. Barra preta: Taquizoítas eletroporados sem plasmídeo; barra branca: Taquizoítas eletroporados com o plasmídeo NcRPS13 tetO/Lac-Z; barra quadriculada: Taquizoítas eletroporados com o plasmídeo NcTub tetO/Lac-Z; barra listrada: Taquizoítas eletroporados com o plasmídeo TgRPS13 tetO/Lac-Z. * indica $p < 0.01$ em comparação com os taquizoítas não pulsados # indica $p < 0.05$ entre taquizoítas transfetados com tetO.

4.2 - Transfecção estável em *N. caninum*

4.2.1- Resistência a cloranfenicol

4.2.1.1- Transfecção da construção de *T. gondii* (TgSAG-CAT/TgTub YFP-TetR) em *N. caninum*

Os plasmídeos originais TgSAG-CAT/TgTubYFP-TetR (van POPPEL et al., 2006), aplicados para expressão de TetR em *T. gondii* de maneira estável, foram transfetados e selecionados em *N. caninum*. Apesar de apresentar uma resistência inicial, os taquizoítas não se estabilizaram, desaparecendo completamente após um mês de seleção. Mesmo com a retirada do cloranfenicol não houve volta do desenvolvimento após três semanas de incubação. Portanto, para transfecções estáveis foi necessário investir em vetores de resistência exclusivos para *N.*

caninum.

4.2.1.2 - Construção de vetores com resistência a cloranfenicol

4.2.1.2.1 - Construção da sequência produtora de cloranfenicol acetil-transferase pelo promotor SAG 1 e DHFR de *N. caninum*

Os componentes para a construção de SAG-CAT e DHFR-CAT (promotor e região 3' UTR de SAG e DHFR e região codificadora de CAT) foram obtidos por PCR (tabela 3) e ligados em pGEM.

Tabela 3 - **Primers utilizados para construção de SAG-CAT e DHFR-CAT**. Os primers indicados foram utilizados para a amplificação dos promotores e região 3' UTR de SAG e DHFR e região codificadora de CAT. Na tabela estão indicadas a identificação, enzimas de restrição (em negrito), se é forward (For) ou reverso (Rev), sequência 5'-3' e o fragmento amplificado. Os primers também foram utilizados no sequenciamento das construções.

Identificação do primer	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
ForSAGpromotor HindIII	Promotor SAG1-like (SAG)	NCLIV_033230	CCCAAGCTTACCTCCGATCGAGCAGAATG
RevSAGpromotor BglII	Promotor SAG1-like (SAG)	NCLIV_033230	CCCAGATCTAGTTCCACAGTCAAAGAACGCCAC
ForCATBglII	Sequência codificadora CAT	GeneBank: AAC53603.1	CCCAGATCTATGCATGAGAAAAAATC
RevCATNdeI	Sequência codificadora CAT	GeneBank: AAC53603.1	CCCCATATGTTATGCCCCGCCCTGCCA
For3'regionSAG NdeI	3' UTR SAG1-like (SAG)	NCLIV_033230	CCCCATATGGTGACAATCGTTCTGCTCG
Rev3'regionSAG XbaI	3' UTR SAG1-like (SAG)	NCLIV_033230	CCCTCTAGACATGTACTGTAACGCAACC
ForDHFRpromotor HindIII	Promotor DHFR	NCLIV_065390	TTTAAGCTTTGGGCATCACTGAGGGACTT
ForDHFRpromotor Aval	Promotor DHFR	NCLIV_065390	TTTCCTAGGCATGTTTCGCTGCACAACTC
Rev3'regionDHFR PstI	3' UTR DHFR	NCLIV_065390	CCCCTGCAGTGGAATAATCTGAAATATATA
Rev3'regionDHFR NotI	3' UTR DHFR	NCLIV_065390	TCCGCGGCCGCTTTCTCGCAAGTCTCCTG

Os vetores foram construídos em um plasmídeo com os sítios adequados após sucessivos tratamentos com enzimas de restrição e ligação de cada fragmento. O vetor SAG-CAT foi constituído pela sequência codificadora de CAT (663 pb, sítios BglII e NdeI) controlado pelo promotor NcSRS29B ou SAG-1like (resumido para SAG nas construções, pois foi o primeiro vetor descrito com essa sequência), (1018 pb, sítios HindIII e BglII) e a sua sequência 3'UTR (506 pb, NdeI e XbaI) (fig 11. 1A). A região 3' de SAG-1like tem um sítio NdeI na altura da base 111, portanto o

fragmento NdeI/XbaI de 395 pb foi ligado primeiro, seguido do fragmento restante NdeI/NdeI de 111 pb (fig 11.1A). O vetor DHFR-CAT foi constituído pela ligação do promotor de 1428 pb (HindII e AvrII) e região 3' UTR de 886 pb (PstI e NotI) do gene DHFR-TS de *N. caninum* (fig 11.1B) flanqueando CAT (663 pb, AvrII e PstI, fig 11.1B). O promotor, a região codificadora de CAT e a região 3' UTR de SAG e NcDHFR foram amplificados por PCR (fig 11.2A, poços 2, 3 e 4; 11.2B, poços 2,3 e 4), purificados e sub-clonados em pGEM. Os fragmentos foram ligados sucessivamente, primeiro o promotor, seguida pela sequência codificadora e a região 3' UTR. Para confirmar a ligação, os vetores foram tratados com as enzimas de restrição empregadas nas construções (fig 11. 2A, poço 6 para SAG-CAT e 7 2B, poço 6 para DHFR-CAT) e sequenciados com primers utilizados nos PCRs (tabela 3) para obtenção de cada fragmento.

Figura 11 – **Construção de SAG-CAT e DHFR-CAT.** 1) Em um plasmídeo adequado (TgRPS13tetOLac-Z, que possui os sítios HindIII, BglII, NdeI e XbaI) os vetores foram construídos pela ligação sucessiva do promotor, sequência codificadora da cloranfenicol acetil-transferase e a região 3' UTR de SAG ou DHFR. (A) SAG-CAT; (B) DHFR-CAT. As setas pretas representam os primers forward e as setas cinzas os reversos utilizados para detectar o promotor e CAT ou apenas CAT após a integração. 2) Os promotores, região 3' UTR (de SAG e DHFR) e CAT foram amplificados por PCR, sub-clonados em pGEM e sucessivamente ligados em um plasmídeo adequado após tratamento com enzimas de restrição. Agarose 0,6%. A; 1 e 5 = Marcadores de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = promotor SAG amplificado por PCR; 3 = região 3' SAG amplificado por PCR; 4 = CAT amplificado por PCR; 6 = Vetor(ou construção) SAG-CAT completo tratado com HindIII, BglII, NdeI e XbaI. B; 1 e 5 = marcador de peso molecular; 2 = promotor DHFR amplificado por PCR; 3 = região 3' DHFR amplificado por PCR; 4 = CAT amplificado por PCR; 6 = DHFR-CAT completo tratado com HindIII, AvrII, PstI e NotI.

A presença dos vetores nos taquizoítas resistentes a cloranfenicol foi avaliada pela detecção de CAT pelo kit CAT-ELISA (Roche) e detecção dos vetores no DNA dos parasitas por PCR com primers específicos.

4.2.1.2.2 - Detecção de CAT em taquizoítas transfectados com SAG-CAT e DHFR-CAT selecionados com cloranfenicol

Os taquizoítas foram avaliados 2 semanas após o surgimento de taquizoítas estáveis (5 semanas de seleção com cloranfenicol, das quais 3 semanas até o surgimento de taquizoítas seguidos de 2 semanas de cultura ou 2 ciclos líticos). A expressão de CAT nos taquizoítas transfectados aumentou 3329% para DHFR (fig 12A) e 2589% para SAG-CAT (fig 12B) em comparação com os taquizoítas não transfectados.

Figura 12 - Detecção de atividade da enzima cloranfenicol acetil transferase (CAT) por CAT-ELISA (Roche). A expressão de CAT de taquizoítas (1×10^7) transfectados com DHFR-CAT ou SAG-CAT foi avaliada por comparação com os taquizoítas não transfectados (Nc). A e B = Porcentagem de expressão de DHFR-CAT e SAG-CAT respectivamente. * indica $p < 0,001$ em comparação com os taquizoítas não transfectados.

4.2.1.2.3 - Detecção de SAG-CAT e DHFR-CAT nos taquizoítas transfectados e selecionados

Os primers (tabela 2) ForDHFR (forward do promotor DHFR) e RevCAT (reverso da sequência codificadora de CAT) amplificaram uma sequência de 2091 pb (fig 13, poço 2), equivalendo à soma do promotor DHFR (1428 pb) acrescido da sequência de CAT (663 pb) sobre o DNA de taquizoítas transfectados e não amplificaram este fragmento no controle não transfectado (fig 13, poço 4). Seguindo a mesma linha, o primer ForSAG (forward do promotor SAG) e RevCAT (reverso da sequência codificadora de CAT) amplificaram um fragmento de 1681 pb (fig 13, poço 7), representando a soma do promotor SAG (1018 pb) mais a sequência CAT (663 pb), e também não amplificaram o fragmento de mesmo tamanho no controle não transfectado (fig 13, poço 8). Os primers específicos para a sequência de CAT (ForCAT e RevCAT) amplificaram a sequência de 663 pb em ambos os clones (fig 13, poços 3 e 6).

Figura 13 - Detecção por PCR das sequências SAG-CAT e DHFR-CAT nas linhagens de *N. caninum* selecionadas com cloranfenicol. DNA extraído de *N. caninum* transfectado com DHFR-CAT (A) ou SAG-CAT (B) e selecionados com cloranfenicol (20 mM) foram avaliados por PCR. A integração dos vetores foi detectada por um primer forward para o promotor 5' SAG (ForSAG) ou DHFR (ForDHFR) e reverso para CAT ou forward e reverso para CAT (ForCAT e RevCAT). Agarose 0,6%. Poços: 1 e 5 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = DNA de taquizoítas transfectados com DHFR-CAT e primers ForDHFR e RevCAT; 3 = DNA de taquizoítas transfectados com DHFR-CAT e primers ForCAT e RevCAT; 4 = Controle, parasitas não transfectados, primers ForDHFR e RevCAT; 6 = DNA de taquizoítas transfectados com SAG-CAT e primers ForCAT e RevCAT; 7 = DNA de taquizoítas transfectados com SAG-CAT e primers ForSAG e RevCAT; 8 = Controle, parasitas não transfectados, primers ForSAG e RevCAT.

4.2.2 - Diidrofolato Redutase – Timidilato Sintase de *N. caninum* (NcDHFR-TS)

4.2.2.1 - Obtenção da sequência codificadora completa de DHFR-TS de *N. caninum*

A sequência codificadora de NcDHFR foi obtida após PCR sobre o cDNA total de *N. caninum* com primers específicos (tabela 4) que compreendiam desde a o ATG até o stop códon.

Tabela 4 - **Primers utilizados na amplificação e mutação NcDHFR** . Os primers indicados foram utilizados para a amplificação da região codificadora NcDHFR que, após ligação a pGEM, foi mutada com os primers M2 e M3 pelo kit QuikChange® XL *site directed* mutagenesis (Stratagene). Na tabela estão indicadas a identificação (For, forward e Rev, reverse), enzimas de restrição (**negrito**), sequência 5´-3´ e o fragmento amplificado. Os primers utilizados para a amplificação de NcDHFR também foram utilizados no sequenciamento para verificação das mutações.

Primers para a mutação M2M3	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5´-3´
ForNcDHFRAvrII	Sequência codificadora NcDHFR	NCLIV_065390	TTTCCTAGG CCGAGCGCGCCTCTGAGTGC
RevNcDHFRPstI	Sequência codificadora NcDHFR	NCLIV_065390	TTT CTGCAG CTAAACAGCCATCTCCATCT
ForM2DHFR	NcDHFRM2 em pGEM	NCLIV_065390	CTTGCCACAGATTTCAAACACTTTCGTCGCGTGACGAAA
RevM2DHFR	NcDHFRM2 em pGEM	NCLIV_065390	TTTCGTCACGCGACGAAAGTGTGAAATCTGTGGCCAAG
ForM3DHFR	NcDHFRM3 em pGEM	NCLIV_065390	GCTGTTGTCATGGGACGAAAAAACTGGGAGAGCTT
RevM3DHFR	NcDHFRM3 em pGEM	NCLIV_065390	AAGCTCTCCAGTTTTTTCGTCCCATGACAACAGC

Um fragmento de ~ 2000 pb foi amplificado, próximo do valor predito de 1927 pb (fig 14, poço 2). Este foi purificado e ligado a pGEM que, após a digestão com a enzima EcoRI, liberou o fragmento DHFR dividido em fragmentos de 1063 e 864 pb (fig 14, poço 4). O fragmento ligado a pGEM serviu de base para as mutações.

Figura 14 - **Amplificação da sequência completa DHFR-TS de *N. caninum* e ligação em pGEM.** A sequência completa DHFR-TS de *N. caninum* foi obtida a partir de PCR com os primers que compreendem desde o ATG predito ao stop códon sobre cDNA total. O fragmento foi purificado e ligado a pGEM que após clonagem e extração do plasmídeo foi tratado com EcoRI. A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 1063 e 864 pb liberados; B = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor tratado e análise dos fragmentos liberados. 1 e 3 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre cDNA com os primers ForNcDHFR AvrII e RevNcDHFRPstI; 4 = NcDHFR-TS ligado a pGEM tratado com EcoRI.

4.2.2.2 - Análise das sequências homólogas de NcDHFR-TS

A análise das sequências de DHFR-TS de *N. caninum* e de *T. gondii* indicou que as regiões adjacentes às mutações M2 e M3 (fig, mutações indicadas por setas) são conservadas e compartilham os resíduos serina (36 para *T. gondii* e 65 para *N. caninum*) e treonina (83 para *T. gondii* e 113 para *N. caninum*). Na comparação dos homólogos de *N. caninum* foram verificadas duas regiões

diferentes entre a sequência descrita neste trabalho (KC542883) e as já depositadas (cepa Liverpool CBZ56113.1 e cepa Nc-1 BAJ17638.1). KC542883 e CBZ56113.1 possuem a região inicial (PSAPLSAAGTGEVGPSVAVPTRGVVQRNM, fig 15 , barra 1), ausente em BAJ17638.1. A região delimitada pela barra 2 (ASLQAPLLSFRLLRRLGAFLRGVTPPRLHAYIECTRLSSRPSAAFAGPR) da figura está presente apenas em CBZ56113.1.

Figura 15 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de DHFR-TS em *N. caninum* e *T. gondii*. As sequências NcDHFR-TS (KC542883-Nc-1 deste trabalho, BAJ17638.1-Nc-1, já depositado, CBZ56113.1-Liverpool) e TgDHFR-TS (AAB00163.1), foram alinhadas pelo programa MegAlign (DNASTar) pelo método de clustal. Os resíduos mutados para M2 e M3 e os primers aplicados para a amplificação da sequência codificadora NcDHFR-TS foram indicados por setas. As barras 1 e 2 representam respectivamente as regiões inicial e posterior de NcDHFR-TS de *N. caninum* Liverpool e Nc-1.

Entre os homólogos de NcDHFR-TS, BAJ17638.1 (Nc-1 depositado anteriormente) possui a maior identidade e similaridade com TgDHFR-TS (respectivamente 85 e 490%), seguido da sequência Nc-1 deste trabalho KC542883 (81 e 86%) e da sequência de Liverpool CBZ56113.1 (75 e 80%). KC542883 é mais próximo de BAJ17638.1 (95% de identidade e similaridade) que CBZ56113.1 (92%) e a proximidade entre BAJ17638.1 e CBZ56113.1 foi similar a TgDHFR-TS, com 88% de identidade e similaridade (tabela 5).

Tabela 5 - Identidade e similaridade entre as sequências DHFR-TS de *T. gondii* e *N. caninum*. As três sequências de NcDHFR-TS (KC542883- Nc-1 deste trabalho, BAJ17638.1- Nc-1 já depositada e CBZ56113.1-Liverpool) e de TgDHFR-TS (AAB00163.1) foram analisadas pelo programa GeneDoc e as porcentagens de identidade e similaridade calculadas.

	KC542883	BAJ176338.1	CBZ56113.1	TgDHFR
KC542883	-	95/95	92/92	81/86
BAJ176338.1	-	-	88/88	85/90
CBZ56113.1	-	-	-	75/80
TgDHFR	-	-	-	-

4.2.2.3 - Obtenção da sequência mutante NcDHFRM2M3

Foram desenhados primers (tabela 4) complementares para as mutações M3 e M2, mudando o códon 83 de treonina para ácido aspártico (M3) e o códon 36 de serina para arginina (M2) nas sequências amplificadas. Primeiramente foi feita a mutação M3 (fig 16, poço 2), e os clones foram digeridos com EcoRI, liberando os fragmentos de 1063 e 864 pb esperados de NcDHFR-TS (fig 16, poços 4-11). Os clones (8 colônias escolhidas) foram sequenciados, confirmando a troca da base necessária para a conversão de tirosina para ácido aspártico, e passaram a ser denominados de NcDHFRM3 (O TS será daqui pra frente substituído por M2M3 diferenciando gene mutado do selvagem).

Figura 16 - **Mutação M3 sobre NcDHFR-TS de *N. caninum***. A sequência completa DHFR-TS de *N. caninum* ligado a pGEM foi submetido a mutação sítio específica por PCR com primers complementares e portadores das bases necessárias para conversão da tirosina 83 para ácido aspártico. O plasmídeo amplificado foi tratado com a enzima DpnI que degrada o plasmídeo de origem bacteriana metilado e não mutado. O plasmídeo mutado foi clonado em *E. coli* supercompetente (XL-blue) e oito colônias foram selecionadas para o sequenciamento. Agarose 0,6%. 1 e 3 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre NcDHFR em pGEM com os primers ForM3DHFR e RevM3DHFR; 4 a 11 = Plasmídeos mutados e tratados com EcoRI, para verificação antes do sequenciamento.

Um dos clones, (fig 16, poço 4) foi submetido ao ciclo seguinte para a mutação M2, que não foi tão eficaz como a mutação M3. Foram amplificados fragmentos de dois tamanhos (fig 17, poço 2, setas), provavelmente por causa dos efeitos de enovelamento ou amplificação incompleta. Apesar disso, prosseguiu-se o procedimento, e os clones gerados sobre a mutação M2 em NcDHFRM3 mantiveram

o mesmo padrão de digestão após a transformação e extração dos plasmídeos (fig 17, poços 4-11). Todos os oito clones foram mutados, com a conversão da serina por arginina, após sequenciamento.

Figura 17 - **Mutação M2 sobre NcDHFRM3 de *N. caninum***. A sequência DHFRM3 de *N. caninum* ligado a pGEM foi submetido a mutação sitio específica por PCR com primers complementares e portadores das bases necessárias para conversão da serina 36 para arginina. O plasmídeo amplificado foi tratado com a enzima DpnI, que degrada o plasmídeo de origem bacteriana metilado e apenas com a mutação M3. O plasmídeo duplamente mutado foi clonado em *E. coli* supercompetente (XL-blue) e oito colônias foram selecionadas para o sequenciamento. Agarose 0,6%. 1 e 3 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre NcDHFRM3 em pGEM com os primers ForM2DHFR e RevM2DHFR; 4 a 11 = Plasmídeos mutados e tratados com EcoRI, para verificação antes do sequenciamento.

4.2.2.4 - Construção do vetor DHFR mutante

Para sua expressão em *N. caninum* a sequência NcDHFRM2M3 foi ligada ao promotor DHFR e sua região 3' UTR, substituindo CAT no vetor DHFR-CAT (fig 18).

Figura 18 – **Construção de DHFR-DHFRM2M3 em *N. caninum***. A sequência DHFRM2M3 foi purificada de pGEM após tratamento com as enzimas AvrII e PstI e ligada ao promotor 5' e região 3' de DHFR, formando o vetor DHFR-DHFRM2M3, para transfecção estável em *N. caninum* por seleção com pirimetamina.

Primeiramente, o promotor e região 3' de NcDHFR foram obtidos por PCR (tabela 4) e ligados a pGEM.

Tabela 6 - **Primers utilizados na construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3** . Os primers indicados foram utilizados para a amplificação dos promotores e região 3' UTR de DHFR para ligação à região codificadora de DHFRM2M3 de *N. caninum*. Na tabela estão indicadas a identificação (For, forward e Rev, reverse), enzimas de restrição (em negrito), sequência 5'-3' e o fragmento amplificado.

Primers para NcDHFR-DHFRM2M3	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
ForDHFR promotor HindIII	Promotor DHFR	NCLIV_065390	TTTA AAGCTT TGGGCATCACTGAGGGACTT
RevDHFR promotor AvrII	Promotor DHFR	NCLIV_065390	TTT CCTAGG CATGTTTCGCTGCACAACCTC
For3'region DHFR PstI	3'UTR DHFR	NCLIV_065390	CCC CTGCA GTGGAAAAATCTGAAATATATA
Rev3'region DHFR NotI	3'UTR DHFR	NCLIV_065390	TCC GCGGCCG CCTTTCTCGCAAGTCTCCTG

O vetor DHFR-CAT foi tratado com AvrII e PstI, e o plasmídeo foi separado da sequência CAT por eletroforese em agarose seguida de purificação (fig 19, poço 2). O mesmo tratamento foi utilizado para obtenção de DHFR-M2M3 sobre pGEM, e o fragmento purificado (fig 19, poço 3 que. foi ligado ao vetor formando DHFR-DHFRM2M3. Para confirmação, o vetor foi tratado com as enzimas AvrII e PstI, liberando o fragmento DHFRM2M3 de ~ 2071 pb (fig 19, poço 5). Em seguida foi sequenciado, confirmando-se a obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3.

Figura 19 - **Ligação da sequência NcDHFRM2M3 de *N. caninum* no vetor DHFR.** A sequência DHFRM2M3 de *N. caninum* foi tratada com AvrII e PstI e ligada no lugar de CAT no vetor constituído pelo promotor DHFR e 3' UTR de *N. caninum*, formando o vetor NcDHFR-DHFRM2M3. Agarose 0,6%. 1 e 4 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = Vetor contendo as regiões flangeadoras de DHFR tratado com AvrII e PstI, purificado; 3 = NcDHFRM2M3 tratado com as enzimas AvrII e PstI purificado; 5 = Vetor NcDHFR-DHFRM2M3 tratado com AvrII e PstI, liberando DHFRM2M3.

Este vetor foi posteriormente utilizado para transfecção e seleção com pirimetamina almejando sua integração no genoma de *N. caninum*.

4.2.2.5 - Detecção de TgDHFR-DHFRM2M3 em *N. caninum* e *T. gondii* após transfecção e seleção

O vetor DHFR-DHFRM2M3 de *T. gondii* foi transfectado em *T. gondii* e *N. caninum* e selecionado com pirimetamina. Após o surgimento de taquizoítas resistentes (duas semanas de seleção), estes tiveram o DNA extraído e submetidos

a PCR com primers específicos para DHFRM2M3 de *T. gondii* (ForTgDHFR e RevTgDHFR). Tanto para *T. gondii* (fig 20, poço 2) quanto para *N. caninum* (fig 20, poço 3) foi detectado o fragmento de ~ 1830 pb que corresponde ao tamanho molecular de TgDHFRM2M3 enquanto nos taquizoítas selvagens o fragmento não foi detectado (fig 20, poços 4 e 5). Na forma nativa, devido a presença de íntrons no DNA, estes primers gerariam um fragmento de 6867 pb, não detectado nos selvagens devido ao tempo de polimerização, de 2 minutos. Como a média de polimerização de uma DNA polimerase é de 1000pb/min, o tempo foi insuficiente para completar a sequência, porém neste caso os controles foram usados para descartar principalmente a amplificação inespecífica resultante de contaminação.

Figura 20 - **Amplificação da sequência TgDHFRM2M3 no DNA de *N. caninum* e *T.gondii* transfectados e selecionados com pirimetamina.** O DNA de taquizoítas de *N. caninum* e *T. gondii* transfectados com DHFR-DHFRM2M3 de *T. gondii* e selecionados com pirimetamina foram submetidos a PCR com primers específicos para TgDHFR. Agarose 0,6%. 1 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre DNA de *T. gondii* transfectado com TgDHFR-DHFRM2M3 e primers ForTgDHFR e RevTgDHFR; 3 = PCR sobre DNA de *N. caninum* transfectado com TgDHFR-DHFRM2M3 e primers ForTgDHFR e RevTgDHFR; 4 = PCR sobre DNA de *T. gondii* selvagem com primers ForTgDHFR e RevTgDHFR; 5 = PCR sobre DNA de *N. caninum* selvagem com primers ForTgDHFR e RevTgDHFR.

4.2.2.6 - Híbridos NcDHFR-DHFRM2M3 e TgDHFR-DHFRM2M3

Devido às semelhanças entre os vetores NcDHFR-DHFRM2M3 e TgDHFR-DHFRM2M3 é possível, por tratamento por enzimas de restrição e ligação, construir diversos híbridos *N. caninum*/*T. gondii*. Além de utilizar PCR e ligação para

trocar as diversas partes (promotor, região codificadora e região 3' UTR) a presença de um sítio EcoRI no centro da região codificadora DHFRM2M3 possibilita a avaliação dos efeitos das mutações de *T. gondii* em *N. caninum* (fig 21).

Figura 21 – **Sítios de restrição e mutações nos vetores TgDHFR-DHFRM2M3 e NcDHFR-DHFRM2M3.** A estrutura dos vetores e seus sítios permitem diversas trocas entre promotores, regiões codificadoras e 3' UTR entre TgDHFR-DHFRM2M3 e NcDHFR-DHFRM2M3 permitindo a formação de vários híbridos. A presença de um sítio EcoRI comum nas regiões codificadoras de TgDHFR e NcDHFR permite trocar apenas as regiões mutadas mantendo o restante do vetor.

Primeiramente os vetores foram tratados com HindIII e EcoRI e a região promotora mais a região codificadora TgDHFRM2M3, incluindo as mutações, foram ligadas ao restante da região codificadora e a região 3'UTR de NcDHFR (fig 22).

Figura 22 – **Híbrido TgDHFR-DHFRM2M3EcoRI/NcDHFR-Nc3'DHFR.** Após tratamento com HindIII e EcoRI o promotor e a região mutada do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 foi substituída pelo correspondente do TgDHFR-DHFRM2M3 resultando no TgDHFR-DHFRM2M3EcoRI/NcDHFR-Nc3'DHFR, transfectado em *N. caninum*.

O vetor TgDHFR-DHFRM2M3 foi tratado com HindIII e EcoRI e o fragmento, contendo seu promotor e região codificadora até o sítio EcoRI (incluindo as mutações M2M3), ligado ao vetor NcDHFR-DHFR. Estes foi tratado com estas enzimas, separado e purificado do seu promotor e região codificadora até o sítio EcoRI. Após a ligação o vetor híbrido foi tratado com EcoRI e PstI, liberando os fragmentos de 361 pb e 864 pb (fig 23, poço 2, setas). TgDHFRM2M3 possui um sítio PstI na base 2004, que junto com EcoRI (na base 2365) liberou o fragmento de 361 pb, enquanto NcDHFR não possui este sítio (PstI). Além disso, a digestão liberou a região entre EcoRI e PstI de 864 pb presentes apenas na sequência codificadora restante de NcDHFR que compõe o híbrido.

Figura 23 – **Ligação do promotor e região mutada de DHFR de *T. gondii* com a parte complementar de DHFR e 3' UTR de *N. caninum*.** O vetor DHFR-DHFRM2M3 de *T. gondii* foi tratado com HindIII e EcoRI e a região liberada, o promotor e a sequência codificadora DHFR até o sítio EcoRI, substituiu sua equivalente no vetor DHFR-DHFRM2M3 de *N. caninum*, resultando no vetor híbrido TgDHFR-DHFRM2M3EcoRI/NcDHFR-Nc3'DHFR. Agarose 0,6%. 1 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = TgDHFR-DHFRM2M3EcoRI/NcDHFR-Nc3'DHFR tratado com as enzimas EcoRI e PstI, com setas indicando os fragmentos liberados.

O vetor foi transfectado em *N. caninum* e este adquiriu e mantém a resistência a pirimetamina por dois anos, até o momento, e é necessário verificar a integração por PCR com primers específicos para este vetor. Esta construção (TgDHFR-DHFRM2M3EcoRI/NcDHFR-Nc3'DHFR), cuja resistência é guiada pelas

sequências de *T. gondii* possibilitará a construção de outros híbridos mais específicos para *N. caninum*.

4.2.3- *N. caninum* nocaute para *hipoxantina*-xantina-*guanina* fosforibosiltransferase (HXGPRT)

Além de recombinação homóloga após seleção com pirimetamina (vetores DHFR-M2M3) ou cloranfenicol (vetores CAT), os vetores construídos até então tem a capacidade de integração não homóloga. Para aumentar a especificidade das integrações em *T. gondii*, foram desenvolvidos parasitas nocautes para hipoxantina-xantina-guanina fosforibosiltransferase (HXGPRT) em 1996 (DONALD et al., 1996). Em um vetor flanqueado pelo promotor HXGPRT e sua região 3' UTR é ligada a sequência codificadora de DHFR-M2M3 ou CAT conferindo resistência respectivamente a pirimetamina ou cloranfenicol. Com a transfecção e seleção ocorrerá recombinação homóloga com a substituição da região codificadora HXGPRT pela sequência de resistência. Após a seleção e isolamento de um clone nocaute (Δ HXGPRT), por PCR com primers específicos para a sequência HXGPRT, este será sensível ao ácido micofenólico. Um vetor formado pelo promotor e região 3' UTR do gene a ser nocauteado flanqueando a sequência codificadora HXGPRT, quando transfectado e selecionado com ácido micofenólico mais xantina, provavelmente terá uma frequência de integrações homólogas maior que os outros vetores baseados em DHFRM2M3 ou CAT, como observado em *T. gondii* (DONALD et al., 1996).

4.2.3.1 - Construção do vetor HXGPRT-CAT e HXGPRT-DHFRM2M3

O promotor e região 3' UTR de NcHXGPRT foram obtidos por PCR (tabela 7) e ligados a pGEM antes da construção dos vetores HXGPRT-CAT e HXGPRT-DHFRM2M3.

Tabela 7 - **Primers utilizados na construção dos vetores NcHXGPRT-CAT e NcHXGPRT-DHFRM2M3**. Os primers indicados foram utilizados na amplificação do promotor e região 3' UTR de NcHXGPRT para ligação a região codificadora de CAT e NcDHFRM2M3. Na tabela estão indicadas a identificação (For, forward e Rev, reverse), enzimas de restrição em negrito, sequência 5'-3' e o fragmento amplificado.

Primers para construção HXGPRT	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
For5'HXGPRT HindIII	Promotor HXGPRT	NCLIV_038170	TTTAAGCTTCACACGTGCCTCTTCTATGGA
Rev5'HXGPRT AvrII	Promotor HXGPRT	NCLIV_038170	TTTCCTAGGGGGTTTGGACGCCATATTG
For3'HXGPRT PstI	3'UTR HXGPRT	NCLIV_038170	TTTCTGCAGGAATTCCTGAAGCCGAACCTT
Rev3'HXGPRT NotI	3'UTR HXGPRT	NCLIV_038170	TTTGCGGCCGCGCATTATTCACGTTGTTTATGTG

O vetor para a deleção da região codificadora de HXGPRT foi construído pela ligação sucessiva do promotor 5' HXGPRT (1564 pb, sítios HindIII e AvrII) que controla a expressão de CAT (663 pb) ou DHFRM2M3 (2073 pb, para ambos sítios AvrII e PstI) e a região 3' HXGPRT UTR (701 pb, sítios PstI e NotI). A representação desta construção encontra-se na figura abaixo (fig 24).

Figura 24 – **Construção de HXGPRT-DHFRM2M3 e HXGPRT-CAT em *N. caninum***. Da mesma forma que realizado para as outras construções, os vetores HXGPRT-DHFRM2M3 e HXGPRT-CAT foram construídos pela ligação sucessiva do promotor NcHXGPRT, sequência codificadora da DHFRM2M3 ou CAT e a região 3' UTR de HXGPRT de *N. caninum*. As setas pretas representam os primers forward e a seta cinza o reverso que serão utilizados para detectar a integração do vetor.

O promotor de 1564 pb e a região 3' UTR de 701pb da hipoxantina-xantina fosforibosiltransferase (HXGPRT) foram amplificados por PCR, purificados (fig 25, poços 2 e 3) e ligados a pGEM. Após clonagem e purificação dos plasmídeos, estes foram tratados com as enzimas necessárias para a formação do vetor, o promotor foi tratado com HindIII e AvrII enquanto a região 3' com PstI e NotI, liberando respectivamente os fragmentos de 1515 e 701pb (fig 25, poços 5 e 7).

Figura 25 - **Amplificação da região promotora e 3' UTR da *hipoxantina*-xantina-*guanina* fosforibosiltransferase (HXGPRT) de *N. caninum*.** O promotor e região 3' UTR de HXGPRT de *N. caninum* foram amplificados por PCR, purificados e ligados a pGEM. Após clonagem os plasmídeos foram tratados com as enzimas HindIII e AvrII (promotor) ou PstI e NotI (3' UTR) adicionadas pelos primers na amplificação. Agarose 0,6%. 1, 4 e 6 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = Promotor HXGPRT amplificado por PCR e purificado; 3 = Região 3' UTR de HXGPRT amplificado por PCR e purificado ; 5 = Promotor HXGPRT ligado a pGEM tratado com HindIII e AvrII; 7 = Região 3' UTR de HXGPRT ligado a pGEM tratado com PstI e NotI.

4.2.3.2 - Vetor com a sequência de cloranfenicol acetil transferase flanqueada pelo promotor e região 3' UTR de *HXGPRT*

O promotor *HXGPRT* foi tratado com *HindIII* e *AvrII* e substituiu o promotor DHFR no vetor DHFR-CAT. Após a verificação da troca (fig 26, poço 2), este vetor foi tratado com *PstI* e *NotI* e a região 3' de *HXGPRT* ligada no lugar da região 3' de DHFR, formando o vetor *HXGPRT*-CAT. Para confirmar as ligações, o vetor foi tratado com *EcoRI*, *PstI* e *NotI*, liberando a região 3' de *HXGPRT* de 701 pb além de cortar CAT na base 217, liberando um fragmento de 446 pb, ou seja, 663 menos 217 (fig 26, poço 4). Este vetor foi então utilizado para transfecção, seleção com cloranfenicol e obtenção de nocautes para *HXGPRT*.

Figura 26 - **Construção do vetor NcHXGPRT-CAT a partir de NcDHFR-CAT.** O promotor e região 3' UTR de *HXGPRT* de *N. caninum* substituíram o promotor e região 3' UTR de DHFR em DHFR-CAT formando o vetor *HXGPRT*-CAT. Por tratamento com enzimas de restrição, o promotor *HXGPRT* substituiu o promotor DHFR (*HindIII* e *AvrII*) como também a região 3' destes (DHFR por *HXGPRT*, *PstI* e *NotI*) que flanqueiam CAT, resultando no vetor de resistência a cloranfenicol controlado por *HXGPRT*. Agarose 0,6%. 1 e 3 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = Vetor contendo o promotor *HXGPRT*, CAT e região 3' de DHFR tratado com *HindIII* e *AvrII*; 4 = *HXGPRT*-CAT completo tratado com *EcoRI*, *PstI* e *NotI*.

4.2.3.3 - Vetor com a sequência de diidrofolato redutase-timidilato sintase mutada (DHFRM2M3) de *N. caninum* flanqueada pelo promotor e região 3' UTR de *HXGPRT*

A sequência DHFRM2M3 de *N. caninum* foi tratada com AvrII e PstI (fig 27, poço 2) e ligada ao vetor HXGPRT (fig 27, poço 3) purificado, substituindo CAT liberada após tratamento com as mesmas enzimas (vetor HXGPRT-CAT). O vetor HXGPRT-DHFRM2M3 foi tratado com EcoRI e PstI, liberando a sequência de ~ 1008 pb (fig 27, poço 5), confirmando a ligação de DHFRM2M3, pois CAT liberaria uma sequência de 446 pb se tratada com EcoRI e PstI. Este vetor foi utilizado para transfecção, seleção com pirimetamina e obtenção de nocautes para HXGPRT, uma alternativa ao vetor HXGPRT-CAT.

Figura 27 - **Construção do vetor NcHXGPRT-DHFRM2M3 a partir de HXGPRT-CAT.** A sequência codificadora de DHFRM2M3 de *N. caninum* substituiu CAT no vetor HXGPRT-CAT, por tratamento com AvrII e PstI e ligação. Agarose 0,6%. 1 e 4 = marcador de peso molecular (em pares de bases pb); 2 = NcDHFRM2M3 tratado com AvrII e PstI purificado; 3 = Vetor com o promotor HXGPRT e sua região 3' UTR tratados com AvrII e PstI, purificados; 5 = Vetor HXGPRT-DHFRM2M3 tratado com EcoRI e PstI.

4.3 - Expressão estável de Lac-Z em taquizoítas resistentes a pirimetamina (DHFRM2M3) e cloranfenicol (CAT)

4.3.1 - Construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z

O vetor NcDHFR-DHFRM2M3 (7298 pb) foi tratado com *Pst*I, clivando entre o stop códon da sequência codificadora DHFRM2M3 e a região 3' UTR (fig 28, A e B, poço 2). A expressão de Lac-Z foi obtida a partir da sequência codificadora Lac-Z controlada pelo promotor NcTub-tetO do vetor NcTub-tetO/LacZ (fig 28, A). Esta construção possui um sítio *Pst*I no início do promotor tubulina (na posição 141) e após o stop codon da sequência codificadora de LacZ, de 5216 pb.

Figura 28 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z.** Construção do vetor para expressão de Lac-Z após transfecção e seleção com pirimetamina. O vetor DHFR-DHFRM2M3 foi ligado a NcTub-tetO/Lac-Z, ambos tratados com *Pst*I. A = Representação esquemática das construções, NcDHFR-DHFRM2M3 (7298 pb) foi ligado ao fragmento NcTub-tetO/Lac-Z de 5216 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%. 1 = Marcador de peso molecular (em pares de base, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 e 3 = NcTub-tetO/Lac-Z.

O plasmídeo aberto NcDHFR-DHFRM2M3 foi ligado a NcTub-tetO/Lac-Z, visando transfecção estável pela seleção com pirimetamina e consequente expressão de Lac-Z. Para verificar a nova construção, o clone NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z foi tratado com PstI e NotI liberando os fragmentos NcTub-tetO/Lac-Z de 5216 pb e a região 3' UTR de DHFR de 886 pb (fig 29, A e B, poço 2), indicando que houve a ligação para a formação do vetor para expressão de Lac-Z.

Figura 29 - **Obtenção do vetor DHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z.** O vetor para a expressão de Lac-Z resistente a pirimetamina foi obtido pela ligação do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 e NcTub-tetO/Lac-Z após tratamento com PstI. O sucesso da construção foi confirmado após tratamento com PstI e NotI e análise em gel de agarose. A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 5216 e 886 pb liberados; B = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor tratado e análise dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de base,pb); 2 = DHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z tratado com PstI e NotI.

4.3.1.1 - Seleção dos clones

Taquizoítas selvagens purificados (5×10^7) foram transfectados com 15 μ g de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e selecionados com pirimetamina. Os taquizoítas lisaram todas as células em 3 dias e foram transferidos para uma nova cultura de células Vero até a diminuição do número de taquizoítas seguido pela estabilização da cultura após 2 semanas de seleção, quando então foram avaliados

pela expressão da enzima β -galactosidase.

4.3.1.2 - Ensaio de β -galactosidase de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z

A atividade de β -galactosidase dos taquizoítas foi decrescente com o aumento da diluição, mostrando proporcionalidade entre o número de taquizoítas e a atividade da enzima expressa. As densidades óticas variaram de 0,046 a 2,002 (fig 30), e em regressão linear a curva resultante gerou um R^2 de 0,988.

Figura 30 - **Atividade da enzima β -galactosidase de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z após invasão sobre células vero.** Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z, diluídos para 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 por poço, invadiram células vero por 2 horas e a atividade da enzima β -galactosidase, proporcional a concentração de parasitas, foi avaliada por reação com CPRG e a absorbância captada a 570 nm.

4.3.1.3 - Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z através de SDS-PAGE 1D

O extrato protéico de taquizoítas transfectados com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z apresentou uma banda na região esperada para β -galactosidase, com 116 kDa (fig 31, poço 3 indicado por uma seta), cuja presença no extrato de *N. caninum* selvagem não é evidente.

Figura 31 – Possível localização de β -galactosidase expressa por *N. caninum* transfectado com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z em gel 1D. Extratos protéicos de taquizoítas selvagens (1×10^6 taquizoítas/poço) e NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z (0.7×10^6 taquizoítas/poço) foram separados por SDS-PAGE 1D (12,5%) e corados por coomassie G. 1 = Marcador de peso molecular; 2 = Extrato de taquizoítas selvagens; 3 = Extrato de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z. A banda predita para β -galactosidase está indicada por uma seta.

4.3.1.4 - Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z através de SDS-PAGE 2D

Dois spots com peso e PI próximos ao predito (116 kDa e PI de 5,29) e que não estão presentes no gel de taquizoítas selecionados com pirimetamina (NcDHFR-DHFR/NcTub YFP-TetR) podem representar a proteína β -galactosidase no gel 2D, (fig 32, A) (fig 32, B). Taquizoítas também selecionados com pirimetamina, porém sem o gene LacZ (NcDHFR-DHFR/NcTub YFP-TetR) foram utilizados como controle neste ensaio, em contraste com os taquizoítas selvagens no gel 1D (fig 31, poço 2). Isso foi feito para evitar que possíveis spots resultantes das alterações na expressão protéica causadas pela integração fossem interpretadas como β -galactosidase. A identidade final dos spots só poderá ser realmente confirmada por espectrometria de massas, o que não foi possível de concretizar dentro do período desta tese, mas em breve será executado.

Figura 32 - Possível localização de β -galactosidase expressa por *N. caninum* transfectado com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z em gel 2D. Extratos protéicos de NcDHFR-DHFR/NcTubYFP-TetR (50 μ g/strip) e NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z (50 μ g/strip) foram separados por SDS-PAGE 2D (12,5%) e corados por coomassie G. A = Extrato de taquizoítas DHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z; B = Extrato de taquizoítas NcDHFR-DHFR/NcTubYFP-TetR. O círculo indica os possíveis spots preditos para β -galactosidase.

4.3.1.5 - Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z por precipitação de X-Gal

4.3.1.5.1 - Verificação em taquizoítas isolados

Os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z observados em aumento de 1.000x apresentaram precipitação em toda a sua extensão, sem pontos de concentração (fig 33). A pouca coloração de fundo indicou que os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z corados por esse método podem ser contados em uma cultura celular, já que não foram encontrados taquizoítas sem coloração. Como controle, taquizoítas selvagens foram submetidos ao mesmo processo e não apresentaram nenhuma coloração.

Figura 33 – **Detecção de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z corados pelo kit β -Gal staining set (Roche).** Taquizoítas recém-purificados foram fixados com formaldeído 2%, corados pela precipitação de X-gal contido no β -Gal staining set e montados em uma lâmina com glicerol. As imagens foram capturadas com aumento de 1000x sob imersão e a barra indica 5 μ m.

4.3.1.5.2 - Detecção de taquizoítas aderidos e invasivos

Os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z que aderiram/invadiram as células vero foram corados, se diferenciando claramente das células vero, possibilitando a contagem. Na concentração de 1×10^7 taquizoítas por poço não foi possível a contagem dos taquizoítas devido a alta densidade no campo, enquanto nas concentrações de 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 os taquizoítas permaneceram isolados e passíveis de contagem (fig 34).

Figura 34 – **Detecção de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z em células vero corados pelo kit β -Gal staining set (Roche).** Taquizoítas purificados foram diluídos (1×10^7 , 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 e 1×10^4 /poço) e colocados para invadir células vero por 2 horas, lavados e o conjunto foi fixado com formaldeído 2% e corado com kit β -Gal staining set (Roche), em que o X-gal precipita pela ação da β -galactosidase tornando os taquizoítas azuis. A barra indica 50 μ M.

Quando concentrados, o efeito da coloração sobre os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z é suficiente para uma análise qualitativa. Os taquizoítas isolados centrifugados formaram um pellet azul enquanto os taquizoítas selvagens formaram um pellet branco (fig 35, A). Na invasão de células vero, 5×10^7 taquizoítas por poço foram visíveis após coloração, enquanto não há detecção no controle selvagem (fig 35, B).

Figura 35 – **Comparação macroscópica entre taquizoítas de *N. caninum* NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z e *Nc* selvagens concentrados.** Taquizoítas recém-purificados ou que invadiram células Vero por duas horas foram fixados com formaldeído 2%, corados pela precipitação de X-gal contido no β -Gal staining set e conservados em glicerol. A = Taquizoítas purificados e centrifugados 10000 g 10 min; B = Taquizoítas (5×10^7 por poço) que invadiram células vero por duas horas. Setas indicam os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z ou selvagens, isolados ou em células vero.

4.3.1.6 - Ensaio de crescimento de *N. caninum* NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z

Os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z incubados apresentaram aumento da atividade da β -galactosidase proporcional ao tempo de cultura (24 e 72 hs), decorrência do aumento do número de taquizoítas. O aumento foi proporcional ao volume de extrato utilizado para reação com CPRG, tanto para 1×10^4 (fig 36 A) como para 5×10^4 (fig 36 B). A absorbância do extrato de 25% de 5×10^4 taquizoítas incubado por 72 hrs atingiu o limite de detecção do espectrofotômetro (fig 36 B).

Figura 36 – Multiplicação de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z monitorada pela atividade de β -galactosidase. Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z após 24 ou 72 horas de cultura foram purificados e incubados em placas de 6 poços para avaliação da atividade de β -galactosidase por reação com CPRG (18 hrs de reação). A = 1×10^4 taquizoítas por poço; B = 5×10^4 taquizoítas por poço.

A análise do crescimento, realizada pela diferença entre as absorbâncias de 24 e 72 hrs indicou que todos os volumes de extrato de 1×10^4 taquizoítas apresentaram aumento de atividade, de 1203, 1122 e 1087% para respectivamente extratos de 4, 12 e 25%. Estes valores plotados em gráfico resultaram em uma linha de tendência linear com R^2 de 0,9867 (fig 37, A). Quando a quantia inicial de taquizoítas foi aumentada para 5×10^4 apenas o extrato de 4% apresentou aumento da expressão semelhante a 1×10^4 , de 1127%, e os volumes maiores de 12 e 25% apresentaram respectivamente aumentos de 661 e 373%. Os dados plotados em gráficos indicaram uma linha de tendência polinomial com R^2 de 0,97, indicando saturação da reação com CPRG (fig 37, B).

Figura 37 – Diferença da atividade de β -galactosidase entre taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z incubados por 24 e 72 hrs. A diferença entre as absorbâncias de taquizoítas incubados por 72 e 24 hrs foi plotada contra as diferentes percentagens de extrato de *N. caninum* utilizadas nos ensaios (4, 12 e 25%). A = 1×10^4 taquizoítas/poço; B = 5×10^4 taquizoítas/poço.

4.3.1.7 - Optimização do ensaio de invasão

A possibilidade de uso de taquizoítas que expressam Lac-Z em ensaios de adesão, invasão e crescimento levou ao delineamento de tampões de lise com detergentes de diferentes princípios de ação e adequação para diferentes placas e células.

A atividade de β -galactosidase foi avaliada com a aplicação de diferentes concentrações de SDS ou Triton X (fig 38). A atividade aumentou, cerca de duas vezes quando uma concentração moderada de SDS (0.5; 0.1; 0.05 e 0.01%) foi utilizada em adição a Triton X 1%. SDS 1% apresentou atividade similar ao Triton X 1% e 11%. Triton X 6 e 3.5% aumentaram ligeiramente a atividade e SDS 5 e 10% anularam a ação da enzima ao nível da atividade do branco (células Vero).

Figura 38 – Atividade de β -galactosidase avaliada em *N. caninum* t NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z com diferentes concentrações de SDS e TritonX. Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z (5×10^4 /poço), invadiram células vero por 24 horas e extraídos, além do tampão de lise contendo 1% de Triton, com SDS 10; 5; 1; 0.5; 0.1; 0.05; 0.01% ou TritonX 10 (10 + 1); 5 (5 + 1); 2,5 (2,5 + 1) %.

4.3.2 - Expressão estável de Lac-Z em taquizoítas resistentes a cloranfenicol (CAT)

4.3.2.1 - Construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z

Um vetor para a expressão de Lac-Z pela seleção com cloranfenicol foi construído com base em NcDHFR-CAT e NcTub-tetO/Lac-Z. O vetor NcDHFR-CAT de 5891 pb foi tratado com PstI (fig 39, A e B, poço 2) e ligado à sequência codificadora de Lac-Z controlada pelo promotor de tubulina de 5216 pb, também tratada com PstI (fig 39, A e B, poço 3). Assim como para a construção NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z, o vetor para expressão de Lac-Z possui sítios PstI no promotor tubulina (base 141) e após o stop códon da sequência codificadora de Lac-Z.

Figura 39 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z.** Construção do vetor para expressão de Lac-Z após transfecção e seleção com cloranfenicol. O vetor DHFR-CAT foi ligado a NcTub-tetO/Lac-Z, ambos tratados com PstI. A = Representação esquemática das construções, NcDHFR-CAT (5891 pb) foi ligado ao fragmento NcTub-tetO/Lac-Z de 5216 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de base, pb); 2 = NcDHFR-CAT e 3 = NcTub-tetO/Lac-Z.

Após a ligação o vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z foi tratado com HindIII e PstI, liberando o promotor NcDHFR com a sequência CAT de 2091, a sequência NcTub-tetO/Lac-Z de 5216 pb e o restante do vetor de 3797 pb (fig 40, A e B, poço 2), confirmando a ligação de NcTub-tetO/Lac-Z ao vetor DHFR-CAT, formando NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z.

Figura 40 - **Obtenção do vetor DHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z.** O vetor para a expressão de Lac-Z resistente a cloranfenicol foi obtido pela ligação do vetor NcDHFR-CAT e NcTub-tetO/Lac-Z após tratamento com PstI. A estrutura da construção foi confirmada após tratamento com HindIII e PstI e análise em gel de agarose. A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 5216 e 2091 pb liberados; B = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor tratado e localização dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de base, pb); 2 = DHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z tratado com HindIII e PstI.

4.3.2.1.1 - Seleção dos clones

Taquizoítas purificados (5×10^7) foram transfectados com 15 μ g de NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z e selecionados com cloranfenicol. Os taquizoítas lisaram todas as células em 3 dias e foram transferidos para uma nova cultura de células vero, até o surgimento de taquizoítas resistentes e estabilização da cultura

após 2 semanas de seleção.

4.3.2.1.2 - Ensaio de β -galactosidase de NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z

A atividade de β -galactosidase dos taquizoítas foi decrescente com a diluição, sendo possível detectar até 1×10^4 taquizoítas/poço. A absorbância de cada diluição foi de 1.5 (1×10^6); 1.0 (5×10^5); 0.163 (1×10^5); 0.117 (5×10^4) e 0.025 (1×10^4), e a as diluições com suas respectivas absorbâncias gerou um R^2 de 0.995 (fig 41).

Figura 41 - **Atividade da enzima β -galactosidase de taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z após invasão sobre células vero.** Taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z diluídos para 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 e 1×10^4 /poço, invadiram células vero por 2 horas e a atividade da enzima β -galactosidase foi avaliada por reação com CPRG e a absorbância captada a 570 nm.

4.3.2.1.3 - Detecção de β -galactosidase de taquizoítas estáveis por SDS-PAGE 1D

O extrato protéico de taquizoítas transfectados com NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z e selecionados com cloranfenicol foi comparado com o extrato de taquizoítas selvagens e a banda de ~ 116 kDa foi detectada (fig 42, poço 3), correspondente ao peso predito da β -galactosidase.

Figura 42 - **Possível localização de β -galactosidase expressa por *N. caninum* transfectado com NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z em gel 1D.** Extratos protéicos de taquizoítas selvagens (1×10^6 taquizoítas/poço) e NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z (0.7×10^6 taquizoítas/poço) foram separados por SDS-PAGE 1D (12,5%) e corados por coomassie G. 1 = Marcador de peso molecular; 2 = Extrato de taquizoítas selvagens; 3 = Extrato de taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z. A banda predita para β -galactosidase está indicada por uma seta.

4.3.2.1.4 - Detecção da expressão de β -galactosidase pelos taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z isolados

Os taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z observados em aumento de 1.000x apresentaram precipitação em toda a sua extensão, sem pontos de concentração (fig 43), como verificado com os clones NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z (fig 43).

Figura 43 – **Detecção de taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z corados pelo kit β -Gal staining set (Roche).** Taquizoítas recém-purificados foram fixados com formaldeído 2%, corados pela precipitação de X-gal contido no β -Gal staining set e montados em uma lâmina com glicerol. As imagens foram capturadas com aumento de 1000x sob imersão e a barra indica 2 μ m.

Os taquizoítas isolados centrifugados formaram um pellet azul enquanto os taquizoítas selvagens formaram um pellet branco (fig 44), indicando a expressão robusta de Lac-Z nos taquizoítas transfectados com CAT.

A) NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z
B) *N. caninum* selvagem

Figura 44 – **Comparação macroscópica entre taquizoítas de *N. caninum* NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z e Nc selvagens concentrados.** Taquizoítas recém-purificados foram fixados com formaldeído 2%, corados pela precipitação de X-gal contido no β -Gal staining set e centrifugados 10000 g 10 min. A = Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z; B = Taquizoítas selvagens.

O ensaio de crescimento para os taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z não foi realizado pois os taquizoítas não suportaram mais que um ano de seleção com pirimetamina, provavelmente ou pela perda do vetor NcDHFR, ou perda do gene por recombinação homóloga, o que seria letal para o parasita.

4.3.3 – Verificação das transfecções estáveis

4.3.3.1 – Verificação da integração de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z no genoma de *N. caninum*

O genoma da linhagem de *N. caninum* estável foi tratado com PstI, circularizado pela ação da T4 ligase e clonado em *E. coli*. O vetor resgatado do genoma de taquizoítas estáveis carregou um fragmento de aproximadamente 5000 pb (~ 8000 pb de vetor completo) do genoma de *N. caninum*, com a região de resistência a ampicilina e a região 3' UTR de NcDHFR-TS (fig 45 A e B). O

tratamento com PstI apenas abriu o vetor, gerando uma banda que indica a ligação do sítio PstI do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z com o sítio próximo, já no genoma de *N. caninum* (fig 45 3 C, poço 2). O tratamento com EcoRI/PstI dividiu o vetor em dois fragmentos de 3500 e 4500 pb (fig 45 C, poço 1). Este padrão é diferente quando comparado com o vetor não integrado, também encontrado no mesmo grupo de taquizoítas, que permaneceram resistentes mesmo sem a integração. Neste caso os taquizoítas não integrados liberaram fragmentos de 2019 e 864 pb quando tratados com enzimas EcoRI e PstI (fig 45 D e E, poço 1). Para verificar a presença da região 3' UTR, o vetor foi tratado com PstI e NotI, liberando o fragmento de 886 pb (fig 45 B e C, poço 3). A integração foi comprovada por sequenciamento, localizando-se no cromossomo XII na posição 1744356.

Figura 45 – **Resgate de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z do genoma de *N. caninum*.** DNA genômico de *N. caninum* estável foi tratado com PstI, circularizado pela ação da T4 ligase e clonado em *E. coli*. A = Representação esquemática da integração de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z no genoma de *N. caninum*. B = Esquema da liberação do vetor liberado após tratamento com PstI. C = Eletroforese de agarose (0,8%) do vetor integrado tratado com enzimas de restrição; poço 1: EcoRI e PstI; 2: PstI; 3: PstI e NotI. D = Esquema do vetor não integrado tratado com PstI e circularizado. E = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor não integrado tratado com EcoRI e PstI (poço 1). Em todos os géis de agarose o marcador de peso molecular se encontra no poço à esquerda, em pares de bases (pb).

4.3.3.2 - Integração letal de NcDHFR-CAT, NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z e NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR no genoma de *N. caninum*

Todo o procedimento de verificação de integração realizado na linhagem resistente à pirimetamina foi realizado da mesma forma na linhagem resistente a cloranfenicol. Foi possível concluir que o vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z sempre se apresentou na forma epissomal, ou seja, permaneceu circular nos taquizoítas transfectados mesmo com 8 meses de seleção. O resgate com PstI (feito com 8 meses de estabilidade) apenas abriu o vetor (liberando a sequência NcTub-tetO/Lac-Z) que foi novamente fechado com T4 ligase. O tratamento com EcoRI liberou o fragmento de 1170 pb para oito clones resgatados, idêntico ao vetor original (fig 46). Após um pouco mais de um ano de estabilidade, os taquizoítas que possuíam NcDHFR-CAT, seja com NcTub-tetO/Lac-Z ou duplo com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR desapareceram com a seleção com cloranfenicol. Provavelmente houve a perda de vetores pelos taquizoítas ou a integração substituindo o gene NcDHFR-TS, que levou à deleção letal da linhagem.

Figura 46 – **Resgate de NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z do genoma de *N. caninum***. O DNA genômico de *N. caninum* estável foi tratado com PstI, circularizado pela ação da T4 ligase e clonado em *E. coli*. A = Representação esquemática da digestão de NcDHFR-DHFRM2M3 resgatado de *N. caninum*. B = Eletroforese de agarose (0,8%) do vetor integrado tratado com EcoRI; poço 1: Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 a 13 NcDHFR-CAT (recircularizado) tratado com EcoRI, com o fragmento 1170 pb liberado.

4.3.4 - Expressão de YFP (proteína amarelo fluorescente) em *N. caninum*

Foram construídos vetores para a expressão de YFP em *N. caninum* após seleção com pirimetamina e cloranfenicol.

4.3.4.1 - Construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/TubYFP-TetR (expressão de YFP TetR)

Como feito para NcTub-tetO/Lac-Z, a sequência NcTubYFP-TetR foi ligada ao vetor NcDHFR-DHFRM2M3 após tratamento com PstI e ligação. O vetor NcDHFR-DHFRM2M3 de 7298 pb tratado com PstI (fig 47, A e B, poço 2) foi ligado à sequência codificadora NcTub YFP-TetR, de 3154 pb (fig 47, A e B, poço 3). Este vetor possui 3 sítios PstI: na posição 141 do promotor tubulina, após stop códon da sequência codificadora YFP-TetR e também na posição 2152 (dentro da sequência YFP). Para a obtenção do fragmento YFP-TetR íntegro para ligação, foi feito o tratamento com PstI de maneira branda, pelo tratamento com 0,3 U de enzima por 15 minutos e purificação imediata. O tratamento comum é de 1 U por 3 horas ou 0,5 U por 18 horas.

Figura 47 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTubYFP-TetR.** Construção do vetor para expressão de YFP-TetR após transfecção e seleção com pirimetamina. O vetor DHFR-DHFRM2M3 foi ligado a NcTubYFP-TetR, tratados com PstI. A = Representação esquemática das construções, NcDHFR-DHFRM2M3 (7298 pb) foi ligado ao fragmento NcTubYFP-TetR de 3154 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 e 3 = NcTubYFP-TetR.

O novo vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTubYFP-TetR foi tratado com HindIII e PstI, liberando os fragmentos NcTub e parte de YFP (os primeiros 354 pb) de 2017 pb e o restante de 1137 pb (fig 48, A e B, poço 2). A enzima HindIII liberou o promotor e a região codificadora DHFRM2M3 de 3051 pb, confirmando a ligação de NcTub YFP-TetR ao vetor NcDHFR-DHFRM2M3.

Figura 48 - **Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTubYFP-TetR.** O vetor para a expressão de YFP-TetR foi obtido pela ligação do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 e NcTubYFP-TetR após tratamento com PstI. A estrutura foi confirmada após tratamento com HindIII e análise em gel de agarose. A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 3501, 2017 e 1137 pb liberados; B = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor tratado e localização dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases,pb); 2 = DHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP tetR tratado com PstI e HindIII.

4.3.4.1.1 - Seleção dos clones

Taquizoítas purificados (5×10^7) foram transfectados com 15 μ g de NcDHFR-DHFRM2M3/NcTubYFP-TetR e selecionados com pirimetamina. Os taquizoítas lisaram todas as células em 3 dias e foram transferidos para uma nova cultura de células vero, até o surgimento de taquizoítas resistentes, seguida pela estabilização da cultura após 2 semanas de seleção.

4.3.4.1.2 - Detecção de taquizoítas fluorescentes

O taquizoítas detectados pela microscopia ótica, em contraste de fase, (fig 49 A) apresentaram a cor amarela característica ausente no taquizoíta selvagem quando analisados em fluorescência (515/530 nm) (fig 49 B).

Figura 49 – **Fluorescência emitida por taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR.** Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR foram purificados, fixados e montados em lâminas para fluorescência. As imagens foram captadas por microscópio de fluorescência (Nikon Ti) com excitação a 515 e filtro de 530 nm e captura por contraste de fase. A = Imagem por contraste de fase; B = Fluorescência amarela emitida por taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-YFP/TetR. A barra indica 10 µm.

4.3.4.2 - Ligação de YFP e TetR com o vetor NcDHFR-CAT/NcTub YFP-TetR

Seguindo a mesma estratégia utilizada para a construção do vetor para expressão de YFP-TetR por pirimetamina (NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR) o vetor com resistência a cloranfenicol NcDHFR-CAT foi ligado ao vetor NcTub YFP-TetR.

A inserção de NcTub YFP-TetR (3154 pb) foi realizada pelo tratamento deste e do vetor NcDHFR-CAT, de 5891 pb com *Pst*I (fig 50, A e B, poço 2). A sequência NcTub YFP-TetR possui sítios na posição 141 do promotor tubulina, após stop códon da sequência codificadora YFP-TetR e também na posição 2152 (dentro da sequência YFP). Como realizado para a ligação de NcTub YFP-TetR em NcDHFR-DHFRM2M3, a digestão parcial foi realizada com 0,3 U de *Pst*I por 15 minutos e o fragmento de 3148 pb (fig 50, A e B, poço 3) imediatamente purificado.

Figura 50 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTubYFP-TetR.** Construção do vetor para expressão de YFP-TetR após transfecção e seleção com cloranfenicol. O vetor DHFR-CAT foi ligado a NcTubYFP-TetR, tratados com *Pst*I. A = Representação esquemática das construções, NcDHFR-CAT (5891 pb) foi ligado ao fragmento NcTubYFP-TetR de 3154 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-CAT e 3 = NcTubYFP-TetR. Para confirmação de ligação, a construção NcDHFR-CAT/NcTub YFP-

TetR foi tratada com *Pst*I, liberando os fragmentos NcTub e início de YFP de 2017 pb, o restante de YFP-TetR de 1137 e o fragmento NcTub YFP-TetR completo de 3154 pb (fig 51, A e B, poço 2), resultante da digestão parcial de NcTub YFP-TetR.

Figura 51 - **Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/NcTubYFP-TetR.** O vetor para a expressão de YFP-TetR foi obtido pela ligação do vetor NcDHFR-CAT e NcTubYFP-TetR após tratamento com *Pst*I. A estrutura foi confirmada após tratamento com *Pst*I e análise em gel de agarose. A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 3154, 2152 e 1143 pb liberados; B = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor tratado e localização dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = DHFR-CAT/NcTub YFP-TetR tratado com *Pst*I.

4.3.4.2.1 - Seleção dos clones

Taquizoítas purificados (5×10^7) foram transfectados com 15 μ g de NcDHFR-CAT/NcTub YFP-TetR e selecionados com cloranfenicol. Os taquizoítas lisaram todas as células em 3 dias e foram transferidos para uma nova cultura de células vero, até o surgimento de taquizoítas resistentes e estabilização da cultura após 2 semanas de seleção. Porém, não foi possível captar a fluorescência dos taquizoítas transfectados, pois os taquizoítas não suportaram mais que um ano de seleção, pela deleção do gene NcDHFR por recombinação homóloga.

4.4 - Inserção de novos sítios no plasmídeo NcDHFR-DHFRM2M3 e marcação de proteínas com cauda de histidina

4.4.1 - Ligação da região de clonagem/expressão de pET28 em pGEM

Com o intuito de facilitar os processos sucessivos de clonagens, o plasmídeo pET28 foi ligado ao pGEM, vetores de expressão e de clonagem, respectivamente, para aumentar as opções de sítios de enzimas de restrição e possibilitar expressão heteróloga. O plasmídeo pGEM, do kit para ligação rápida de clones, pGEM-T-Easy Vector da Promega (fig 52, A) possui 3015 pb e uma região de ligação otimizada para fragmentos de PCR. A região de ligação e expressão de pET28 (fig 52, B, retângulo preto), utilizado para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* foi transferida, após PCR, para a região de ligação de pGEM (fig 52, A, quadrado azul), formando o vetor pGEM-pET28, adequado para novas construções pela quantidade de sítios e também para expressão de proteínas heterólogas, já que pGEM é menor e possui melhor dinâmica para a ligação.

Figura 52 – Vetores utilizados para a construção de pGEM-pET28. A região de ligação de pET28 (B) foi amplificada por PCR e ligada a pGEM-T Easy Vector (pGEM) (A), vetor adaptado para ligações. O vetor resultante pGEM-pET28 carrega as vantagens de pGEM (tamanho e facilidade de ligação) com a região de ligação de pET28, possibilitando a expressão de proteínas heterólogas. A = pGEM e a região de ligação delimitada pelo retângulo azul. B = pET28, e a região de ligação/expressão (seta preta) delimitada por um retângulo preto.

Primers foram delineados para amplificar uma região maior que a região de ligação/expressão (Tabela 8). O primer forward foi delineado 365 pb acima do início da região de interesse (promotor T7, onde se inicia a expressão heteróloga) enquanto o primer reverso delimitou uma região de 109 pb além do stop códon, no fim do terminador T7. Estes possuem o sítio PstI para ligação em NcDHFR-DHFRM2M3 e NcDHFR-CAT.

Tabela 8 – **Primers para amplificação da região de ligação/expressão de pET28.** Um primer forward (For ET28 PstI) e um reverso (Rev pET28 PstI) foram delineados para amplificar a região de ligação/expressão de pET28 para a ligação em pGEM. Além da sequência de interesse os primers (com sítios PstI, em negrito) amplificaram uma região de 365 pb (For pET28 PstI) e 109 pb (Rev pET28 PstI) que flanqueavam essa região.

Identificação do primer	Sentido do primer	Sequência 5'-3'
ForpET28 PstI	Forward	TTT CTGCAG CACCACCCTGAATTGACTCTCT
RevpET28 PstI	Reverso	TTT CTGCAG GGATATAGTTTCTCTTTCAGCA

A região de clonagem e expressão de pET28 foi amplificada (fig 53) e ligada a pGEM, formando o plasmídeo híbrido pGEM-pET28. Este novo vetor possui a região de resistência bacteriana à ampicilina e não mais à kanamicina presente em pET28. pGEM-pET28 possui a região de expressão do sistema T7-lac, constituído pelo promotor e terminador T7, o operador lac e duas caudas de histidina (fig 53) o que oferece a possibilidade de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*.

Figura 53 – **Região de expressão/ligação de pET28 amplificada.** A região delimitada pelos primers forward e reverso (azul) possui 765 pb e compreende a região de expressão de proteínas pelo sistema T7/Lac. O sistema T7/Lac é composto pelo promotor T7, operador Lac e terminador T7 (sublinhados), além de duas caudas de histidinas (His-Tag) e 13 sítios de enzimas de restrição (amarelo).

A região pET28 de 765 pb foi obtida por PCR (fig 54, poço 2) com os primers indicados na figura (em azul), adicionando-se um sítio PstI em cada extremo do fragmento. O fragmento foi purificado (fig 54, poço 4) e após ligação em pGEM um dos clones selecionados teve o vetor pGEM-pET28 tratado com EcoRI liberando os fragmentos de 590 (entre o sítio EcoRI do pET28 e de um dos extremos de pGEM, de 12 pb) e 205 pb (entre o sítio de restrição do pET28 e o do outro extremo de pGEM de 12 pb), demonstrando a formação de pGEM-pET28 (fig 54 A, B poço 6).

Figura 54 – **Estratégia para construção do vetor pGEM-pET28.** Construção do vetor pGEM-pET28. A região de ligação/expressão de pET28 foi amplificada e ligada a pGEM. A formação do vetor foi avaliada após tratamento com EcoRI. A = Representação esquemática de pGEM-pET28 completo e localização dos sítios EcoRI. B = Processo de amplificação de pET28 e ligação a pGEM, agarose 0,6%: 1, 3 e 5 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre pET28 e amplificação do fragmento de 765 pb; 4 = Fragmento pET28 purificado pronto para a ligação a pGEM; 6 = pGEM-pET28 tratado com EcoRI. Os novos sítios adicionados pelo vetor pET28 estão marcados com um retângulo.

4.4.1.1 Inserção dos sítios de restrição do vetor pET28 para o vetor NcDHFR-DHFRM2M3

Para aumentar as possibilidades de clonagens para inserção de genes em *N. caninum* pelo vetor NcDHFR-DHFRM2M3, a região de expressão/ligação do plasmídeo de expressão bacteriana pET28 de 765 pb (fig 55, A e B poço 2) foi retirada de pGEM e ligada ao vetor DHFR-DHFRM2M3 (fig 55, A e B, poço 3), após tratamento com PstI. Uma cauda de histidina presente antes do stop códon de pET28 foi adicionada e poderá ser utilizada como tag marcadora ou para purificação de proteínas expressas diretamente em *N. caninum*.

Figura 55 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/pET28.** Ligação da região de ligação/expressão pET28 em NcDHFR-DHFRM2M3 após tratamento com PstI. A = Representação esquemática das construções, do fragmento pET28 de 765 pb e do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 de 7298 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = região de 765 pb do pET28 e 3 = NcDHFR-DHFRM2M3.

A ligação de pET28 com NcDHFR-DHFRM2M3 utilizando apenas uma enzima de restrição (PstI) resultou em dois tipos de vetores, tanto com pET28 ligado no mesmo sentido de transcrição que DHFRM2M3 (sentido codificador em relação a NcDHFR-DHFRM2M3) como também no inverso (fig 56, A). Para diferenciar as construções, o tratamento com EcoRI liberou um fragmento de 2013 pb, correspondente aos sítios EcoRI no promotor e região codificadora DHFRM2M3 (fig 56, A e B, poços 2 e 3) e um fragmento de 1583 pb no caso de ligação no sentido de transcrição (fig 56, A e B, poço 2) ou um de 1193 pb no sentido inverso (fig 56, A e B poço 3). A diferença entre os dois vem da posição de EcoRI da sequência de pET28 (fig 56, A).

Figura 56 - **Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/pET28.** O vetor NcDHFR-DHFRM2M3/pET28 foi obtido pela ligação do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 e pET28 após tratamento com PstI. A estrutura foi confirmada após tratamento com EcoRI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 2013, 1583 e 1193 liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado com seus fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3/pET28 sentido codificador, tratado com EcoRI; 3 = NcDHFR-DHFRM2M3/pET28 sentido inverso, tratado com EcoRI.

4.4.2 - Marcação de NcDHFRM2M3 e CAT com cauda de histidina (His-tag)

A formação dos vetores pGEM-pET28 e NcDHFR-DHFRM2M3-pET28 aumentou a quantidade de sítios de restrição e possibilidades de formação de novos vetores para *N. caninum*. Uma dessas possibilidades é a marcação de proteínas com sequências conhecidas, etapa importante para a avaliação da expressão de proteínas inseridas em *N. caninum*. Um recurso presente nos vetores construídos até então é a cauda de histidina no pET28, o primeiro candidato a marcador de proteínas em *N. caninum*. Inicialmente a marcação foi feita em CAT e DHFRM2M3, de avaliação mais simples, pois da sua atividade depende a sobrevivência de *N. caninum* sob seleção respectivamente de cloranfenicol e pirimetamina.

4.4.2.1 - NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His marcado com His-tag

A sequência codificadora de NcDHFRM2M3 possui um sítio de restrição XhoI na posição 1228 separando o domínio DHFR (dihidrofolato redutase) do domínio TS (timidilato sintase). O tratamento do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 com HindIII e XhoI e ligação no pGEM-pET28 levou à formação de um vetor de expressão de NcDHFR-DHFRM2M3 truncado, sem a sequência TS. O plasmídeo pGEM-pET28 tratado com HindIII e XhoI de 3715 pb (fig 57, A e B, poço 2) foi purificado do gel e ligado ao fragmento NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His de 2658 pb (fig 57, A e B, poço 3), obtido pelo mesmo tratamento.

Figura 57 – Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His. Ligação da região de NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His em pGEM-pET28 após tratamento com HindIII e XhoI. A = Representação esquemática das construções, do fragmento NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His de 2658 pb e do vetor pGEM-pET28 de 3715 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = pGEM-pET28 e 3 = NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His.

Fragmento e plasmídeo foram ligados e o clone final NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His foi tratado com EcoRI que liberou o fragmento de 2013 pb correspondente à região entre os sítios na posição 475 e 2488 no DHFR-DHFRM2M3 (fig 58, A e B, poço 2) e também há um sítio EcoRI na região de pGEM (12 pb) que junto com os 582 pb de pET28 liberou o fragmento de 594 pb (fig 58, A e B, poço 2). A outra porção entre o EcoRI da posição 2488 de NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His e 2653 (XhoI) de 163 pb mais 157 pb da cauda de histidina e o restante de pET28 (até PstI) e o EcoRI de pGEM (12 pb) liberou o fragmento de 332 pb (fig 58, A e B, poço 2). O último fragmento de 500 pb é relativo aos sítios EcoRI entre pET28 e o promotor NcDHFR (fig 58, A e B poço 2).

Figura 58 - **Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His.** O vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His, obtido pela ligação do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado em pGEM-pET28, foi verificado após tratamento com EcoRI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 2013, 594, 500 e 332 liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado com os fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His, tratado com EcoRI.

Essa sequência foi o ponto de partida para montagem de NcDHFR-CAT/His e híbridos com TgDHFRM2M3 pois o sítio XhoI é compartilhado entre os homólogos DHFR de *T. gondii* e *N. caninum*.

4.4.2.1.1 - Transfecção com NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His e seleção com pirimetamina

Taquizoítas purificados (3×10^7) foram transfectados com 5 μ g de NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His e selecionados com pirimetamina. Após 3 semanas de seleção, taquizoítas resistentes surgiram, porém desapareceram após 6 meses de seleção, provavelmente pela falta da região 3' UTR.

4.4.2.2 - Marcação de CAT com His-tag

A primeira etapa para a inserção de His-tag em CAT foi a obtenção da sua sequência codificadora com XhoI (fig 59, A). Este fragmento de 663 pb foi obtido com o uso de primers contendo os sítios AvrII e XhoI, (fig 59, B poço 2). A sequência codificadora de CAT obtida por PCR foi purificada (fig 59, B poço 4) e ligada em pGEM. O clone ligado a pGEM foi tratado com EcoRI e liberou os fragmentos de 458 pb e 229 pb, pois CAT possui um sítio EcoRI na posição 217 e somam-se os 12 pb de cada lado de pGEM.

Figura 59 – **Amplificação de CAT com sítio XhoI.** Amplificação de CAT por PCR, purificação e ligação a pGEM. A = Representação esquemática de pGEM-CAT e localização dos sítios AvrII XhoI e EcoRI. B = Processo de amplificação de CAT e ligação a pGEM, agarose 0,6%: 1, 3 e 5 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre DHFR-CAT e amplificação do fragmento de 663 pb; 4 = Fragmento CAT completo purificado pronto para a ligação a pGEM; 6 = pGEM-CAT tratado com EcoRI.

O vetor NcDHFRCAT/His foi analisado após clonagem e purificação pelo tratamento com EcoRI que liberou os fragmentos de 500 pb correspondente aos sítios EcoRI presentes no promotor NcDHFR (na base 475), e a região de pET28 (fig 61, A e B, poço 2). Ainda o tratamento com EcoRI liberou a região de pET28 de 582 pb mais a região inicial de pGEM (12 pb), resultando no fragmento de 594 pb, a região de 1170 pb entre os sítios EcoRI do promotor NcDHFR e CAT (na posição 217). Entre CAT, o restante de pET28 (cauda histidina, e a região de 132 pb após esta) e o sítio de pGEM foi liberado um fragmento de 617 pb (fig 61, A e B, poço 2).

Figura 61 - **Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/His.** O vetor NcDHFR-CAT/His foi obtido pela substituição de DHFRM2M3 truncado do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His por CAT após tratamento com AvrII e XhoI. A estrutura foi confirmada após tratamento com EcoRI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 1170, 617, 594 e 500 liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e localização dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-CAT/His, tratado com EcoRI.

4.4.2.2.1 - DHFR-CAT/His completo (com DHFR 3' UTR)

O vetor DHFR-CAT/His obtido não possui a região 3' de DHFR que serviria para melhorar a estabilização do vetor no genoma de *N. caninum*, já que o vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His, sem a região 3' UTR não suportou alguns meses de seleção. Para a formação do vetor completo NcDHFR-CAT/His, este foi tratado com HindIII e PstI que incluía o promotor NcDHFR, CAT e a cauda de histidina, de 2250 pb (fig 62, A e B, poço 3). Este foi ligado ao vetor NcDHFR-DHFRM2M3 tratado com HindIII e PstI no lugar do promotor e sequência codificadora DHFRM2M3, restando apenas a região 3' UTR, um vetor de 3797 pb (fig 62, A e B, poço 2).

Figura 62 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/His com região 3'UTR.** Substituição da região de NcDHFR-DHFRM2M3 do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 (vetor com região 3' UTR) por NcDHFR-CAT/His após tratamento com HindIII e PstI. A = Representação esquemática das construções, do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 de 3797 pb (sem NcDHFR-DHFRM2M3 de 3501 pb) e da sequência NcDHFR-CAT/His de 2250 pb. B = Componentes purificados (agarose 0,6%) antes da ligação: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 (apenas região 3') e 3 = NcDHFR-CAT/His.

O vetor NcDHFR-CAT/His completo foi tratado com HindIII e PstI, liberando o fragmento NcDHFR-CAT/His inicialmente ligado, de 2250 pb e o vetor de 3797 pb (fig 63, A e B, poço 2).

Figura 63 - **Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/His completo.** O vetor NcDHFR-CAT/His foi obtido pela substituição de NcDHFR-DHFRM2M3 do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 por NcDHFR-CAT/His após tratamento com HindIII e PstI. A estrutura foi confirmada após tratamento com HindIII e PstI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com o fragmento de 2250 liberado com HindIII e PstI; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e localização do fragmento liberado: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-CAT/His, tratado com HindIII e PstI.

4.4.2.2.2 - Seleção dos clones transfectados com NcDHFR-CAT/His completo e incompleto

Os taquizoítas purificados (3×10^7) foram transfectados com 5 μ g de NcDHFR-CAT/His completo ou incompleto, e selecionados com cloranfenicol. Os taquizoítas transfectados com NcDHFR-CAT/His incompleto apresentaram crescimento mais lento em comparação com os selecionados após transfecção com NcDHFR-CAT/His completo. Com o tempo apenas o NcDHFR-CAT/His completo (8 meses) resistiu a seleção, enquanto o incompleto, como NcDHFRM2M3 truncado não suportou a seleção, perdendo a vetor por não possuir a região 3' DHFR UTR.

4.4.2.2.3 - Purificação de CAT/His e comparação com os controles *N. caninum* selvagem e células Vero em coluna de níquel

A purificação de *N. caninum* selvagem apresentou uma banda de ~ 130 kDa (fig 64, poço 2), enquanto as células vero liberaram proteínas de ~ 110 e 140 kDa (fig 64, poço 4). Aparentemente há uma sobreposição entre as bandas de 130 kDa e 140 kDa, que será discriminado por espectrometria de massas. Com o padrão dos controles verificado, o extrato NcDHFR-CAT/His liberou a proteína de ~130 kDa, esperado para o extrato de *N. caninum* selvagem, e uma proteína de ~ 30 kDa, próximo ao CAT predito, de 29,4 kDa (25,8 kDa, da sequencia original, mais a cauda de histidina de 0,8 kDa e da região do primeiro íntron de NcDHFRM2M3 de 2,8 kDa) (fig 64, poço 6).

Figura 64 - Purificação do extrato de *N. caninum* selvagem, vero e NcDHFR-CAT/His em níquel sepharose. Taquizoítas *N. caninum* selvagem, células vero e NcDHFR-CAT/His (1×10^6) foram lisados e o extrato purificado em coluna de níquel sepharose. Uma alíquota eluída de cada amostra foi separada em SDS-PAGE 1D e coradas por coomassie G. 1, 3 e 5 = Marcador de peso molecular; 2 = Alíquota eluída de *N. caninum* selvagem; 3 = Alíquota eluída de células vero; 6 = Alíquota eluída de NcDHFR-CAT/His. A banda predita para CAT/His e as proteínas liberadas pelos controles estão indicadas por setas.

4.5 - Controle da expressão de Lac-Z pelo sistema TetR/tetO em *N. caninum*

4.5.1 - Controle transiente da expressão

Os taquizoítas transfectados transientemente com NcTub YFP-TetR e NcRPS13 tetO/Lac-Z foram responsivos ao tratamento com tetraciclina, corroborando resultados prévios obtidos com *T. gondii* nesse sistema induzível (van POPPEL et al., 2006). Quando tratado com 0,1 µg/ml de tetraciclina, houve um aumento de 5 % (controle -4,5) na expressão de Lac-Z, com 1 µg/ml o aumento foi de 14,9 % (controle -10,8) e com 10 µg/ml houve uma diminuição de 13% (controle - 35,5%) (fig 64). É esperado que em baixas concentrações de tetraciclina ocorra uma expressão discreta, que demonstra a sensibilidade do sistema TetR/tetO. A concentração de 1 µg/ml é a ideal para esse sistema, pois confere uma ativação do sistema sem toxicidade para o taquizoíta. Acima desta concentração já há diminuição da expressão, não por inibição da expressão Lac-Z por TetR/tetO, mas pela depleção da capacidade de tradução endógena do parasita. Esses resultados fornecem a base para o controle da expressão de TetR integrado ao genoma do parasita, provavelmente mais sensível, pois o sistema transiente não evita que taquizoítas sem TetR recebam tetO.

Figura 64 – **Indução da expressão de Lac-Z por adição de tetraciclina.** Taquizoítas de *N. caninum*, transfectados com NcTubYFP-TetR, cultivados e purificados foram sequencialmente transfectados com NcRPS13tetO/Lac-Z, ou apenas com NcRPS13 tetO/Lac-Z (controle) e submetidos a diferentes concentrações de tetraciclina (0; 0,1; 1 e 10 µg/ml) por 18h. O extrato de *N. caninum* (10%) foi avaliado após reação com CPRG por 18h à 570nm. Barra preta: Transfectados com NcTubYFP-TetR e NcRPS13tetO/Lac-Z; barra branca: Transfectados apenas com NcRPS13 tetO/Lac-Z (controle). A porcentagem de expressão de Lac-Z foi calculada pela diferença entre a absorbância dos taquizoítas tratados e não tratados com tetraciclina, dividido pela absorbância dos não tratados multiplicado por 100. * indica $p < 0,001$ em comparação com os taquizoítas não pulsados, # e ! indicam respectivamente $p < 0,001$ e $p < 0,05$ entre os transfectados.

4.5.2 - Indução da expressão por tetraciclina de taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR estáveis e transfectados com NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z (transiente)

Os taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR estáveis transfectados com NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z tiveram a expressão de Lac-Z afetada pela incubação com tetraciclina. A concentração de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ aumentou a atividade de β -galactosidase em 31,1% (fig 65) e diminuiu para 8.9; 14.1 e 10% (fig 65) respectivamente para 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de droga em relação ao controle não tratado. Os efeitos tóxicos sobre a expressão de Lac-Z ficaram evidentes com 20 e 50 $\mu\text{g/ml}$, apresentando diminuição de 23.5 e 15.5% em relação ao controle não tratado (fig 65).

Figura 65 – Efeito da tetraciclina sobre taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR (estável) e NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z (transiente). Taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub YFP-TetR/NcDHFR-DHFRCAT/NcTub-tetO/Lac-Z purificados (1×10^6 /poço) foram incubados com tetraciclina (0.5; 1, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g/ml}$) por 18 hrs e a atividade Lac-Z avaliada por reação com CPRG. O resultado é apresentado como % da atividade de β -galactosidase em relação ao controle não tratado com tetraciclina. * $p < 0.05$.

4.5.3 - Incubação dos controles estáveis apenas com NcTub-tetO (CAT ou NcDHFRM2M3) com tetraciclina

A incubação dos taquizoítas transfectados com NcTubTet-O/LacZ sem TetR indica se a mudança na expressão foi provocada pela a ligação da tetraciclina ao TetR, sem interferência do sistema de expressão do taquizoíta.

Os taquizoítas transfectados com CAT, do mesmo modo que aplicado com os duplos transfectados apresentaram aumento na expressão em relação ao controle não tratado com pico de expressão no grupo incubado com 0,75 µg/ml. A expressão aumentou em 424.9; 518.3; 503.1; 619; 456.1; 263.4 % incubados respectivamente com 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 5 µg/ml de tetraciclina (fig 66).

Figura 66 – **Efeito da tetraciclina sobre taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z (estável)**. Taquizoítas NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/Lac-Z purificados (1×10^6 / poço) foram incubados com tetraciclina (0.1; 0.5; 1, 5, 10, 20 e 50 µg/ml) por 18 hrs e a atividade Lac-Z avaliada por reação com CPRG. O resultado é apresentado como % da atividade de β -galactosidase em relação ao controle não tratado com tetraciclina. * $p < 0.05$ em relação ao controle não tratado.

Os taquizoítas estáveis, transfectados com DHFR apresentaram um aumento de expressão mais discreto em relação aos transfectados com CAT. O aumento da expressão de Lac-Z foi dependente da concentração de tetraciclina com aumento, em relação ao controle não tratado, de 23.3; 18.4; 61.22; 60; 79,6 e 116,3 % incubados respectivamente com 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina (fig 67).

Figura 67 – **Efeito da tetraciclina sobre taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z (estável).** Taquizoítas NcNcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z purificados (1×10^6 /well) foram incubados com tetraciclina (0,1; 0,5; 1, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g/ml}$) por 18 hrs e a atividade Lac-Z avaliada por reação com CPRG. O resultado é apresentado como % da atividade de β -galactosidase em relação ao controle não tratado com tetraciclina. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

4.6 - Detecção e manipulação de NcMic-like1

4.6.1 - Obtenção da sequência completa de NcMic2-like1 para expressão

Para a substituição de NcDHFRM2M3 truncado/His, a sequência NcMic2-like1 foi amplificada com primers com sítios AvrII e XhoI (tabela 9).

Tabela 9 - **Primers utilizados para a obtenção de NcMic2-like1 completo.** Os primers indicados foram utilizados para a amplificação da sequência codificadora de NcMic2-like1 a partir do cDNA de *N. caninum* com sítios AvrII e XhoI. Na tabela estão indicadas a identificação (For, forward e Rev, reverse), os sítios de restrição em negrito e a sequência 5' -3'. Os primers também foram utilizados no sequenciamento das construções.

Primers para NcMic2-like1 completa	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
For NcMIC2 AvrII	NcMic2-like1	NCLIV_033690	TTT CCTAGG ATGGCGTCGCATTCCAGTG
Rev NcMIC2 XhoI	NcMic2-like1	NCLIV_033690	TTT CTCGAG CGCCGACCACATTTTCGGAGT

A sequência codificadora completa de NcMic2-like1 foi obtida por PCR sobre cDNA total de *N. caninum*, com primers desde o ATG (ForNcMic2AvrII) até o stop códon (RevNcMic2XhoI). Foi amplificado um fragmento de 2271 pb (fig 68, poço 2), com dois fragmentos inespecíficos de 700 e 300 pb que foram eliminados pela purificação do fragmento principal. O fragmento purificado (fig 68, poço 4) foi ligado a pGEM que, após digestão com EcoRI, exibiu os fragmentos preditos para NcMic2-like1 (fig 68, poço 6), resultantes do sítio presente na base 1480 que liberou os fragmentos de 1480 e o restante de 791 pb. Vale lembrar que pGEM possui sítios EcoRI flanqueando a sequência ligada. O mesmo PCR sobre DNA genômico de *N. caninum* amplificou um fragmento de 3531 pb (fig 68, poço 8), correspondente a sequência NcMic2-like1 com os íntrons. Além disso, a confirmação final da fidelidade da sequência foi verificada por sequenciamento.

Figura 68 – **Amplificação, purificação e ligação em pGEM de NcMic2-like1 completo.** A sequência completa (apenas éxons) NcMic2-like1 foi obtida por PCR sobre cDNA total, purificada e ligada a pGEM, além de comparada à sequência completa obtida por PCR sobre DNA (sequência com íntrons). Eletroforese em agarose 0,6% . 1, 3, 5 e 7 = marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre cDNA de *N. caninum* com os primers ForNcMic2-like1 e RevNcMic2like-1; 4 = NcMic2-like1 purificado; 6 = NcMic2-like1 ligado a pGEM, tratado com EcoRI; 8 = PCR sobre DNA genômico de *N. caninum* com os primers ForNcMic2-like1 e RevNcMic2like-1.

4.6.1.1 - Construção do vetor de expressão com promotor de Tubulina

Para a expressão de NcMic2-like1 em *N. caninum*, primeiramente foi necessário ligar a sequência completa a um promotor, como construído para Lac-Z e YFP-TetR. NcMic2-like1 foi expresso sob controle do promotor de Tubulina de *N. caninum* (NcTub), cuja funcionalidade já fora comprovada na expressão de Lac-Z e YFP. O promotor NcTub foi amplificado por PCR com os sítios HindIII e AvrII, respectivamente pelos primers ForTub HindIII e RevTub AvrII (tabela 10).

Tabela 10 - **Primers utilizados na obtenção do promotor Tubulina.** Os primers indicados foram utilizados para a amplificação do promotor Tubulina a partir do DNA genômico de *N. caninum*. Na tabela estão indicadas a identificação (For, forward e Rev, reverse), o fragmento amplificado, os sítios de restrição em negrito e a sequência 5'-3'. Os primers também foram

Primers para o promotor NcTubulina	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
ForTub HindIII	Promotor Tubulina	NCLIV_039100	TTTA AAGCTT CGCGCGTTGTTCTCTGTATTA
RevTub AvrII	Promotor Tubulina	NCLIV_039100	CCCC CTAGG CCTAGAGGTGACGGAGAAAAAT

Os primers delineados foram aplicados para a amplificação de NcTub a partir do vetor NcTub-tetO/LacZ, produzindo um fragmento de 2271 pb (fig 69 B, poço 2) que foi subclonado em pGEM. O tratamento com EcoRI (fig 69 B, poço 4) liberou os fragmentos de 2163 (entre a Tubulina e pGEM) e 126 pb, entre pGEM e a Tubulina (fig 69 A).

Figura 69 – **Amplificação do promotor Tubulina com sítios HindIII e AvrII.** Amplificação do promotor tubulina por PCR, purificação e ligação a pGEM. A = Representação esquemática de NcTubulina/pGEM e localização dos sítios HindIII, AvrII e EcoRI. B = Processo de amplificação da Tubulina por PCR e ligação a pGEM, agarose 0,6%: 1 e 3 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre DNA de *N. caninum* e amplificação do fragmento de 2271 pb; 4 = NcTubulina/pGEM tratada com EcoRI.

O promotor Tubulina substituiu o promotor NcDHFR do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His (fig 70 A). Após tratamento com HindIII e AvrII o promotor de 2271 pb (fig 70 B, poço 3) foi ligado ao vetor (fig 70 B, poço 2).

Figura 70 – **Estratégia para construção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His.** Ligação do promotor NcTubulina (NcTub) em NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His após tratamento com HindIII e AvrII. A = Representação esquemática das construções, do fragmento NcTub de 2271 pb e do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His de 7298 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His e 3 = promotor NcTub de 2271 pb.

O vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His foi tratado com *EcoRI* (fig 71 A), liberando os fragmentos de 3015 (pGEM), 2017 (entre NcTub e DHFR), 1336 (pET28 e NcTub), 594 (pGEM e pET28) e 332 pb (DHFR e pGEM) (fig 71 B, poço 2).

Figura 71 - **Obtenção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His.** O vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His foi obtido pela ligação do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 truncado/His e NcTub após tratamento com *HindIII* e *AvrII*. A estrutura foi confirmada após tratamento com *EcoRI* e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 2017, 1336, 594 e 332 pb liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e identificação dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His, tratado com *EcoRI*.

4.6.1.2 – Ligação da sequência NcTub-tetO/NcDHFRM2M3 truncado/His em Topo Zero Blunt

Os plasmídeos pGEM e NcMic2-like1 possuem pesos moleculares próximos (3015 e 2271 pb respectivamente), característica que propiciou a contaminação cruzada entre NcTub-tetO/NcDHFRM2M3 truncado/His e NcMic2-like1/pGEM (ambos com resistência contra ampicilina). Isso impossibilitou a ligação de NcMic2-like1 em substituição ao DHFRM2M3 truncado/His. Para contornar esse problema a sequência NcTub-tetO/NcDHFRM2M3 truncado/His de 3675 pb (fig 72 B, poço 3) foi retirada pelo tratamento com HindIII e NotI e ligada ao vetor Topo Zero Blunt (Invitrogen) de 3419 pb (fig 72 B, poço 2) que confere resistência a kanamicina, o que evita a contaminação cruzada. Ambos foram tratados com HindIII e NotI e ligados (fig 72).

Figura 72 – **Estratégia para construção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His em Topo Zero Blunt.** Ligação da sequência NcTub-tetO/DHFR-DHFRM2M3 truncado/His em Topo Zero Blunt após tratamento com HindIII e NotI. A = Representação esquemática das construções, do fragmento NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His de 3675 pb e do vetor Topo Zero Blunt de 3419 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = fragmento NcTub-DHFRM2M3 truncado/His de 3675 pb e 3 = Topo Zero Blunt.

O vetor NcTub-DHFRM2M3 truncado/His ligado ao Topo Zero Blunt, selecionado com kanamicina, foi tratado com a enzima EcoRI (fig 73 A), liberando os fragmentos de 2017 pb, entre a NcTub e NcDHFRM2M3 e 322 pb entre NcDHFRM2M3 e o sítio EcoRI (adjacente ao NotI, oriundo do pGEM) (fig 73 B poço 2).

Figura 73 - **Obtenção do vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His (Topo Zero Blunt).** O vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His (Topo Zero Blunt) foi obtido pela ligação do fragmento NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His e Topo Zero Blunt após tratamento com HindIII e NotI. A estrutura foi confirmada após tratamento com EcoRI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 2017 e 332 pb liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e identificação dos fragmentos liberados de 2017 e 332 pb: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His (Topo Zero Blunt), tratado com EcoRI.

O vetor NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His em Topo Zero Blunt, foi empregado então para a expressão de NcMic2-like1 pela troca de DHFRM2M3 truncado/His por NcMic2-like1.

4.6.2 - Inserção e expressão de NcMIC2-like1 em *N. caninum*

A sequência codificadora de NcMic2-like1, de 2271 pb (fig A e B, poço 3) foi tratada com AvrII e XhoI e ligada em NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His (em Topo Zero Blunt) previamente tratado com as mesmas enzimas (fig 74 A e B, poço 2) e ligados.

Figura 74 – **Estratégia para construção do vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1.** Ligação da sequência NcMic2-like1 em NcTub-tetO/NcDHFRM2M3 truncado/His (Topo Zero Blunt) após tratamento com AvrII e XhoI. A = Representação esquemática das construções, do fragmento NcMic2-like1 de 2271 pb e do vetor NcTub-tetO/NcDHFRM2M3 truncado/His de 5684 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcTub-tetO/DHFRM2M3 truncado/His e 3 = fragmento NcMic2-like1 de 2271 pb.

O vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi tratado com EcoRI liberando o fragmento 2695 pb, entre o promotor NcTub e a região codificadora de NcMic2-like1, confirmando sua obtenção (fig 75 A e B, poço 2). Foi necessário ligar o vetor para expressão de NcMic2-like1 para a expressão estável, com seleção para cloranfenicol (NcDHFR-CAT) ou pirimetamina (NcDHFR-DHFRM2M3).

Figura 75 - **Obtenção do vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1**. O vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi obtido pela ligação do fragmento NcMic2-like1 e NcTub-DHFRM2M3 truncado/His após tratamento com AvrII e XhoI. A estrutura foi confirmada após tratamento com EcoRI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com o fragmento de 2695 pb liberado; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e identificação dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcTub-tetO/NcMic2-like1, tratado com EcoRI.

4.6.2.1 - Ligação de NcTub-tetO/NcMic2-like1 ao vetor NcDHFR-CAT

Apesar da letalidade provocada pela transfecção com NcDHFR-CAT e seleção com cloranfenicol após um ano, o vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi ligado ao vetor NcDHFR-CAT após tratamento com PstI. É necessário ter em mãos um vetor desse tipo para comparar os efeitos de da expressão de um vetor integrativo (baseado em NcDHFRM2M3) e um episomal. O tratamento com PstI retira a cauda

citoplasmática de NcMic2-like1 (2110 pb, perdendo 161 pb da parte final da sequência), uma forma que serve como parâmetro para os efeitos da expressão da forma completa, pois a cauda citoplasmática liga a proteína ao motor de actina/miosina, fundamental para o processo invasivo. Essa construção teoricamente não tem capacidade de funcionar plenamente em um Δ NcMic2-like1 confirmando a função de NcMic2-like1. Os vetores foram tratados com PstI (fig 76 A) e o fragmento NcTub-tetO/NcMic2, de 4248 pb ligado a NcDHFR-CAT (fig 76 B, poços 2 e 3).

Figura 76 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1.** Ligação da sequência NcTub-tetO/NcMic2-like1 em NcDHFR-CAT após tratamento com PstI. A = Representação esquemática das construções, do fragmento NcTub-tetO/NcMic2-like1 de 4248 pb e do vetor NcDHFR-CAT de 5891 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-CAT e 3 = fragmento NcTub-tetO/NcMic2-like1 de 4248 pb.

O vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi tratado com *EcoRI* (fig 77 A) liberando os fragmentos de 2695 pb (do sítio *EcoRI* de NcMic2-like1 até NcTub) e 1170 pb (do sítio *EcoRI* do promotor de NcDHFR até CAT) e 978 pb (do sítio *EcoRI* de CAT até NcMic2-like1) (fig 77 B, poço 2). Optou-se pela transfecção da construção com a sequência NcTub-tetO/NcMic2-like1 ligada ao contrário, pois segue o mesmo esquema da expressão de Lac-Z estável, controlada pelo mesmo promotor. A ausência do stop códon possibilitou a expressão de 15 aminoácidos a mais pertencentes a sequência inversa de CAT, cujos efeitos seriam avaliados em ensaios funcionais, em comparação com as formas completas de NcMIC2-like1.

Figura 77 - **Obtenção do vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1.** O vetor NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi obtido pela ligação do fragmento NcTub-tetO/NcMic2-like1 em NcDHFR-CAT após tratamento com *PstI*. A estrutura foi confirmada após tratamento com *EcoRI* e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 2695, 1170 e 978 pb liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e identificação dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/NcMic2-like1, tratado com *EcoRI*.

Apesar de permanecer epissomal por vários meses, o vetor NcDHFR-CAT não foi integrado. Optou-se, então, pela construção do vetor baseado em NcDHFRM2M3, resistente a pirimetamina. O vetor seria utilizado após a estabilização e integração do vetor baseado em pirimetamina, para efeito comparativo.

4.6.2.2 - Ligação de NcTub-tetO/NcMic2-like1 ao vetor NcDHFR-DHFRM2M3

O vetor NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi tratado com PstI (fig 78 A), liberando o fragmento de 4248 pb (fig 78 B, poço 3) e ligado ao vetor NcDHFR-DHFRM2M3 (fig 78 B, poço 2), do mesmo modo que empregado para NcDHFR-CAT (fig 76).

Figura 78 – **Estratégia para construção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/NcMic2-like1.** Ligação da sequência NcTub-tetO/NcMic2-like1 em NcDHFR-DHFRM2M3 após tratamento com PstI. A = Representação esquemática das construções, do fragmento NcTub-tetO/NcMic2-like1 de 4248 pb e do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 de 7298 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 e 3 = fragmento NcTub-tetO/NcMic2-like1 de 4248 pb.

O vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi tratado com *EcoRI* (fig 79 A), liberando os fragmentos de 2695 (do sítio de NcMic2-like1 até a tubulina), 2016 (do sítio do promotor NcDHFR até DHFRM2M3) e 1394 pb (do sítio de NcMic2-like1 até a NcTub) (fig 79 B, poço 2).

Figura 79 - **Obtenção do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/NcMic2-like1.** O vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/NcMic2-like1 foi obtido pela ligação do fragmento NcTub-tetO/NcMic2-like1 em NcDHFR-DHFRM2M3 após tratamento com *PstI*. A estrutura foi confirmada após tratamento com *EcoRI* e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com os fragmentos de 2695, 2016 e 1394 pb liberados; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado e identificação dos fragmentos liberados: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFR/NcTub-tetO/NcMic2-like1, tratado com *EcoRI*.

A cauda citoplasmática de NcMIC2-like1 será substituída por um peptídeo da sequência de NcDHFRM2M3. Essa possui peso semelhante (7.5 contra 6.1 kDa da cauda citoplasmática) porém possui PI inverso, de 12.4 enquanto a cauda de NcMIC2-like1 é de 3.4. Essa diferença será investigada na função da proteína em ensaios funcionais em relação à expressão da forma completa ou deleção de NcMic2-like1.

4.6.3 - Construção de vetores para a deleção de NcMic2-like1

Para deletar um gene em taquizoítas, haplóides, um vetor de resistência a cloranfenicol (CAT) ou pirimetamina (DHFRM2M3) é construído com o promotor e a região 3' UTR do gene a ser deletado. Sob pressão seletiva, há recombinação homóloga e o gene de resistência substituirá o gene de interesse (fig 80).

Figura 80 – **Estratégia para deleção de NcMic2-like1**. A sequência codificadora do gene de resistência (DHFRM2M3 ou CAT) foi flanqueada por um promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1. No processo de transfecção e seleção com a droga, o promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1 do vetor sofrem recombinação homóloga com as regiões idênticas no genoma de *N. caninum*. Neste processo há a troca de regiões, o taquizoíta adquire o gene de resistência e a sequência codificadora de NcMic2-like1 será deletada. Este procedimento é utilizado para a deleção de genes em *T. gondii*.

O promotor e a região 3' de NcMic2-like1 foram ligados às regiões codificadoras de CAT (NcMic2-CAT) ou DHFRM2M3 (NcMic2-DHFRM2M3) e após seleção, os clones sem a região codificadora de NcMic2-like1 foram separados e os efeitos dessa deleção estão sob análise.

4.6.3.1 - Delineamento dos primers

O promotor NcMic2-like1 e a região 3'UTR foram amplificados com primers contendo sítios HindIII e AvrII (promotor) e PstI e NotI (região 3'UTR) (tabela 11).

Tabela 11 - **Primers utilizados na obtenção do promotor ou região 3' UTR para deleção de NcMic2-like1.** Os primers indicados foram utilizados para a amplificação do promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1 a partir do DNA genômico de *N. caninum*. Na tabela estão indicadas a identificação (For, forward e Rev, reverse), o fragmento amplificado, os sítios de restrição em negrito e a sequência 5'-3'. Os primers também foram utilizados no sequenciamento das construções.

Primers para deleção NcMic2-like1	Fragmento amplificado	Identificação do gene em Toxo DB	Sequência 5'-3'
for 5' NcMic2 Hind	Promotor NcMic2-like1	NCLIV_033690	CCCA AAGCTT CACCCGTGAACATGGAAAGAT
rev 5' NcMic2 AvrII	Promotor NcMic2-like1	NCLIV_033690	CCCC CTAGGA AAGACGCCGGAACAAGC
for 3'NcMic2 PstI	3'UTR NcMic2-like1	NCLIV_033690	CCC CTGCAG TTTCGACCTTGACTACTGTAACGC
rev 3'NcMic2 NotI	3'UTR NcMic2-like1	NCLIV_033690	CCCG CGGCCG CAGTCTTGACAAAACTTCACGAG

4.6.3.2 - Obtenção do promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1

O promotor e primeiro íntron e região 3' UTR de NcMic2-like1 respectivamente de 1510 e 837 pb (fig 81 A) foram obtidos por PCR (fig 81 B, poços 2 e 3) e purificados para ligação a pGEM e sub-clonagem (fig 81 B, poços 5 e 6). Os primers adicionaram os sítios de restrição HindIII e AvrII no promotor e primeiro íntron NcMic2-like1 e PstI e NotI na região 3' UTR (fig 81, A) que foram utilizados para flanquear DHFRM2M3 e CAT no lugar do promotor NcDHFR e sua região 3' UTR.

Figura 81 – **Amplificação do promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1.** O promotor e região 3'UTR de NcMic2-like1 foram amplificados com primers que adicionaram os sítios HindIII, AvrII (promotor), PstI e NotI (região 3' UTR). As bandas foram separadas após eletroforese em gel de agarose (0,6%) e purificados para ligação em pGEM. A = Representação esquemática de NcMic2-like1. B = Processo de amplificação do promotor e região 3' UTR de NcMic2-like1 e purificação: 1 e 4 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = PCR sobre DNA genômico de *N. caninum* e amplificação do fragmento de 1510 pb; 3 = PCR sobre DNA genômico de *N. caninum* e amplificação do fragmento de 837 pb; 5 = Fragmento de 1510 pb (promotor) purificado; 6 = Fragmento de 837 pb (região 3' UTR) purificado.

O promotor e região 3' de NcMic-like1 foram ligados em pGEM e tratados com *EcoRI*. O promotor possui um sítio na base 117 liberando um fragmento de 1405 correspondente aos 1393 bases do promotor mais os 12 pb do vetor pGEM (fig 82, A e B poço 2). A região 3', que não possui sítios *EcoRI*, liberou um fragmento de 861 pb correspondente ao fragmento predito de 837 pb mais os 24 pb do vetor pGEM (fig 82, A e B poço 4).

Figura 82 – **Ligação do promotor e região 3' UTR NcMic2-like1 em pGEM.** O promotor e região 3'UTR de NcMic2-like1 foram ligados em pGEM e após clonagem os vetores foram tratados com *EcoRI*. A = Representação esquemática de pGEM Promotor NcMic2-like1, pGEM 3'UTR e localização dos sítios HindIII, AvrII, PstI, NotI e *EcoRI*. B = Tratamento dos vetores com *EcoRI* (agarose 0,6%): 1 e 3 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = pGEM Promotor NcMic2-like1 tratado com *EcoRI*; 4 = pGEM 3' UTR NcMic2-like1 tratado com *EcoRI*.

4.6.3.3 - Ligação de 3' UTR NcMic2-like1 em NcDHFRM2M3

A região 3' UTR de NcMic2-like1 de 837 pb (fig 83, A e B poço 3) foi tratada com PstI e NotI e foi ligada a NcDHFR-DHFRM2M3 no lugar da região DHFR 3' UTR (fig 83, A e B, poço 2).

Figura 83 – **Estratégia para construção do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3.** Substituição da região 3' UTR de NcDHFR do cassete NcDHFR-DHFRM2M3 pela região 3' UTR de NcMic2-like1 após tratamento com PstI e NotI. A = Representação esquemática das construções, do cassete NcDHFR-DHFRM2M3 de 6412 pb e da região 3' UTR de NcMic2-like1 de 837 pb. B = Componentes purificados antes da ligação (agarose 0,6%): 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 e 3 = 3' UTR NcMic2-like1.

4.6.3.4 - Ligação do promotor NcMic2-like1 em NcDHFRM2M3

O promotor NcMic2-like1 e o vetor NcDHFR-DHFRM2M3 (com a região 3' UTR de NcMic2-like1) foram tratados com HindIII e AvrII (fig 84 A) e o promotor de 1510 pb foi ligado a este vetor (fig 84 B, poços 2 e 3).

Figura 84 – **Estratégia para construção do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3.** Ligação do promotor NcMic2-like1 em NcDHFR-DHFRM2M3 após tratamento com HindIII e AvrII. A = Representação esquemática das construções, do promotor NcMic2-like1 de 1510 pb e do vetor NcDHFR-DHFRM2M3 de 5845 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcDHFR-DHFRM2M3 e 3 = promotor NcMic2-like1 de 1510 pb.

O vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3 foi tratado com a enzima EcoRI (fig 85 A) liberando o fragmento de 2456 pb, entre o promotor NcMic2-like1 e NcDHFRM2M3 (fig 85 B, poço 2), e preparada para a transfecção.

Figura 85 - **Obtenção do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3.** O vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3 foi obtido pela ligação do promotor NcMic2-like1 em NcDHFR-DHFRM2M3 após tratamento com HindIII e AvrII. A estrutura foi confirmada após tratamento com EcoRI e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com o fragmento de 2456 pb liberado; B = Eletroforese de agarose do vetor tratado com o fragmento liberado: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcMic2-like1-DHFRM2M3, tratado com EcoRI, com liberação do fragmento de 2456 pb.

Para a substituição da sequência codificadora de NcDHFRM2M3 por CAT o vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3 e a sequência completa CAT em pGEM foram tratadas com *AvrII* e *PstI* e ligadas (fig 86 A). A sequência CAT de 663 pb foi ligada ao vetor (fig 86 B, poços 3 e 2 respectivamente).

Figura 86 – **Estratégia para construção do vetor NcMic2-like1-CAT.** Substituição da região codificadora NcDHFRM2M3 por CAT após tratamento com *AvrII* e *PstI*. A = Representação esquemática das construções, de CAT de 663 pb e do vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3 de 5315 pb. B = Componentes purificados antes da ligação, agarose 0,6%: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de base, pb); 2 = NcMic2-like1-DHFRM2M3 e 3 = sequência codificadora de CAT de 663 pb.

O vetor NcMic2-like1-CAT foi tratado com *EcoRI* (fig 87 A), liberando o fragmento de 1610 pb, entre o promotor NcMic2-like1 e a sequência codificadora de CAT (fig 87 B, poço 2).

Figura 87 - **Obtenção do vetor NcMic2-like1-CAT.** O vetor NcMic2-like1-CAT foi obtido pela substituição de região codificadora de NcDHFRM2M3 por CAT em NcMic2-like1-DHFRM2M3 após tratamento com *AvrII* e *PstI*. A estrutura foi confirmada após tratamento com *EcoRI* e análise em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com o fragmento de 1610 pb liberado; B = Eletroforese de agarose (0,6%) do vetor tratado e identificação do fragmento liberado: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); 2 = NcMic2-like1-CAT, tratado com *EcoRI*, liberando o fragmento de 1610 pb.

A ligação da região 3' UTR de NcMic2-like1 foi confirmada por PCR com primers que anelaram na região codificadora de CAT (Forward, ForCATAvr) e 3' UTR NcMic2-like1 (Reverso, rev 3'NcMic2 NotI) (fig 88 A). O fragmento de 1500 pb foi amplificado (fig 88 B, poço 2), como predito (somatória da região codificadora de CAT de 663 pb e da região 3 UTR de NcMic2-like1 de 837 pb) , confirmando a formação de NcMic2-like1-CAT e consequentemente de NcMic2-like1-DHFRM2M3.

Figura 88 - **PCR sobre o vetor NcMic2-like1-CAT.** Para confirmação da construção de NcMic2-like1-CAT a região CAT–3' NcMic2-like1 UTR foi amplificada com os primers ForCATAvr e rev 3'NcMic2 NotI por PCR. A estrutura foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (0,6%). A = Representação esquemática do vetor com o fragmento de 1500 pb amplificado com os primers indicados por setas; B = Eletroforese de agarose do fragmento amplificado: 1 = Marcador de peso molecular (em pares de base, pb); 2 = CAT – 3' NcMic2-like1 UTR amplificado.

O vetor NcMic2-like1-DHFRM2M3 foi transfectado em *N. caninum* e levou à resistência (3 meses de resistência até o momento), enquanto NcMic2-like1-CAT foi transfectado nos taquizoítas NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z, para avaliação da capacidade adesiva/invasiva dos taquizoítas duplo selecionados (2 meses de resistência até o momento).

Concomitantemente os taquizoítas NcSAG-CAT e NcHXGPRT -CAT

foram transfectados com NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z (3 e 2 meses de resistência até o momento) para avaliação paralela de adesão/invasão, com deleção de uma proteína de superfície e de uma enzima do metabolismo, respectivamente.

4.6.4 - Localização de NcMIC2-like1 e NcMIC2 por western blot 2D

A caracterização e localização de NcMIC2-like1 foi realizada (PEREIRA et al., 2011) parcialmente, sem a confirmação da proteína e das suas formas clivadas por espectrometria de massas. O primeiro passo foi a amplificação da região predita para a proteína, de PI ácido (4,5) e peso de 81 kDa. Para isso um western blot 2D abrangendo apenas a faixa ácida (strip de 3 a 5,6) possibilitou a localização de dois spots contínuos na forma de uma mancha entre 100 e 120 kDa, pelo soro anti-NcMIC2-like1 (fig 89 A, spots 1 e 2). A correlação com o gel de coomassie revelou uma região composta por dois spots (Fig 89 B, spots 1 e 2), acompanhada de dois spots com um padrão parecido, aproximadamente 10 kDa acima (Fig 89 B, spots 3 e 4). Esses quatro spots foram excisados, tratados e analisados por espectrometria de massas.

Figura 89 – Detecção de NcMIC2-like1 por western blot 2D pelo soro anti-NcMIC2-like1 e localização em SDS-PAGE 2D corado por coomassie G. As proteínas foram focalizadas em strips de 7 cm de gradiente de pH de faixa 3 – 5.6 NL e separadas por SDS-PAGE. (A) Western blot 2D, soro anti-MIC2-like1 incubado com o extrato proteico de *N. caninum*. (B) SDS-PAGE (10%) do extrato proteico de *N. caninum*, corado por coomassie G. Os spots detectados pelo soro (1 e 2) e o par próximo (3 e 4) com padrão parecido foram analisados por espectrometria de massas.

A espectrometria indicou que os spots 1 e 2 eram de NcMIC2-like1 com pesos calculados de respectivamente 123.2 e 116.4 e PI de 3.9 e 4.0. Os spots 3 (peso 132.6 e PI 4.2) e 4 (peso 123.4 e PI 4.3) apresentavam tanto fragmentos trípticos de NcMIC2 (No. de acesso AAF01565.1) como de NcMIC2-like1, com uma clara predominância de peptídeos NcMIC2 (tabela 12).

Tabela 12 – **Dados de espectrometria de massas dos spots 1, 2, 3 e 4.** A tabela indica o numero de peptídeos únicos e peptídeos encontrados em relação ao banco de dados Toxodb, após análise por MS/MS.

<i>Spot</i>	<i>Identificação</i>	<i>Número de</i>				<i>Observado</i>	
		<i>peptídeos únicos</i>		<i>espectros de</i>		<i>peptídeos</i>	
		<i>encontrados</i>		<i>encontrados</i>		<i>encontrados</i>	
		NcMI2-like1	NcMIC2	NcMI2-like1	NcMIC2	pI	Peso
1	NcMIC2-like1	13	0	37	0	3.9	123.2
2	NcMIC2-like1	11	0	23	0	4.0	116.4
3	NcMIC2 and NcMIC2-like1	1	6	1	38	4.2	132.6
4	NcMIC2 and NcMIC2-like1	4	7	5	27	4.3	123.4

4.6.5 - Expressão de NcMIC2-like1 solúvel em pET28 com cauda solúvel Nc 1081

4.6.5.1 - Obtenção da sequência Nc1081

A região solúvel do contig 1081 possui 7,1 KDa e um PI de 3.44, constituída por 55% de ácido glutâmico e 13% de ácido aspártico, totalizando 42 resíduos negativamente carregados (68.8% da molécula) e 4 resíduos positivamente carregados totalizando 75.4 % do peptídeo (tabela 13).

Tabela 13 – **Composição de aminoácidos de Nc1081**. A sequência Nc1080 foi analisada pelo programa ExPASyProtParam (<http://web.expasy.org/>) e o peso molecular, ponto isoelétrico e a composição de aminoácidos predita. A quantia de todos os aminoácidos carregados foi destacada.

Numero de aminoácidos: 61	
Peso Molecular: 7109.7	
pi teórico: 3.44	
Composição (aminoácidos):	
Ala (A) 9	14,80%
Arg (R) 1	1,60%
Asn (N) 1	1,60%
Asp (D) 8	13,10%
Cys (C) 0	0,00%
Gln (Q) 1	1,60%
Glu (E) 34	55,70%
Gly (G) 1	1,60%
His (H) 0	0,00%
Ile (I) 0	0,00%
Leu (L) 1	1,60%
Lys (K) 3	4,90%
Met (M) 0	0,00%
Phe (F) 0	0,00%
Pro (P) 0	0,00%
Ser (S) 1	1,60%
Thr (T) 1	1,60%
Trp (W) 0	0,00%
Tyr (Y) 0	0,00%
Val (V) 0	0,00%
Pyl (O) 0	0,00%
Sec (U) 0	0,00%
Resíduos negativamente carregados (Asp + Glu): 42	
Resíduos positivamente carregados (Arg + Lys): 4	

Este fragmento tem probabilidade de mais de 97% de solubilidade quando expresso em *E. coli* e elevou a predição de 78.3% de insolubilidade para 85.4% de solubilidade quando fusionada ao fragmento NcMIC2-like1 (predições pelo site <http://www.biotech.ou.edu/>, Universidade de Oklahoma). O fragmento Nc1080 foi obtido por PCR com as enzimas de restrição HindIII e XhoI, sub-clonado em pGEM para facilitar o tratamento com as enzimas de restrição e ligado em “frame” com NcMic2-like1 previamente ligado em pET28. Após a clonagem em *E. coli* TOP10, o vetor purificado foi tratado com BamHI, HindIII e XhoI liberando NcMic2-like1 (1125 bp) e o Nc 1080 (185 pb, fig 90, poço 2). A confirmação da sequência e ligação foi confirmada pelo sequenciamento com um primer forward sobre NcMic2-like1 (ForBam, CCCGGATCCCAGGCAGCGTCAAATGAA, PEREIRA et al., 2010) e o primer reverso Revsol *Xho* (tabela 90).

Figura 90 - Tratamento de pET28/NcMic2-like1/Nc1081 com BamHI, HindIII e XhoI. O vetor pET28/NcMic2-like1/Nc1081 foi tratado com as enzimas aplicadas na ligação de NcMic2-like1 (BamHI e HindIII) e Nc1081 (HindIII e XhoI) em pET28. Os fragmentos liberados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,6%. Poço 1: Marcador de peso molecular (em pares de bases, pb); poço 2: pET28, NcMic2-like1 e Nc1080 após tratamento com as enzimas de restrição.

4.6.5.2 - Solubilidade de NcMIC2-like1/Nc1081 em ureia, expressão e purificação de NcMIC2-like1/Nc1081

NcMIC2-like1 foi previamente descrito como uma proteína recombinante solúvel apenas em ureia 8M (PEREIRA et al., 2011). O fragmento de NcMIC2-like1/Nc1080 de 52 kDa manteve a insolubilidade quando sonificado em ureia 0,5; 1 e 2 (fig 91 A, poços 2, 3 e 4) e uma discreta solubilidade em ureia 4M (fig 91 A, poço 5) e foi solúvel em ureia 8M (fig 91 A, poço 6). Após indução de expressão o extrato proteico de pET28/NcMic2-like1/Nc1081 foi extraído com tampão sem agentes desnaturantes e submetido à purificação em coluna de níquel. O fragmento NcMIC2-like1/Nc1081 foi expresso em 3 bandas comparadas com a fração não induzida (fig 91 B, poços 2 e 3). A purificação em coluna de níquel indicou três bandas com aproximadamente 60, 54 e 48 KDa eluídas (sem ureia, tampão nativo) em três frações positivas à reação de Bradford (fig 91 B, poços 4, 5 e 6).

Figure 91 - **Avaliação de solubilidade de NcMIC2-like1/Nc1081.** (A) Fração proteica induzida de NcMIC2-like1/Nc1081 extraída por gradiente de ureia (0,5; 1; 2; 4 e 8M correspondente aos poços 2, 3, 4, 5 e 6, acrilamida 12,5%). (B) Extração de NcMIC2-like1/Nc1081 induzida (poço 2) e não induzido (poço 3), e frações eluídas positivas no ensaio de Bradford após purificação em coluna Ni-Sepharose (poços 4, 5 e 6, acrilamida 10%). Marcador de peso molecular kDa: 220, 160, 100, 75, 50, 37, 20, 25, 15 e 10 (A) ou 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 (B).

4.6.5.3 - Espectrometria de massas

As três bandas analisadas por espectrometria de massas (fig 91 B, poços 4, 5 e 6) indicaram a presença majoritária de peptídeos pertencentes a NcMIC2-like1. As três formas compartilharam os mesmos peptídeos localizados nos extremos das proteínas recombinantes. A variação de peptídeos identificados foi verificada apenas na região central das proteínas, comuns às três bandas, não sendo encontradas aparentemente diferenças nas extremidades. O peptídeo 1081 não foi encontrado por essa abordagem.

5 - DISCUSSÃO

A importância da compreensão de mecanismos moleculares de *N. caninum* faz parte das estratégias para controle da neosporose e adiciona mais uma referência para o filo Apicomplexa, cujos membros afetam diversos hospedeiros incluindo o homem (POLONAI, SOLDATI-FAVRE, 2010). No complexo sistema de secreção que permite a invasão ativa do parasita residem diversos alvos para controle e interrupção do ciclo. Proteínas contidas em micronemas, roptrias e grânulos já demonstraram relação direta com a invasão e replicação do parasita, dados obtidos principalmente de *T. gondii* e *Plasmodium* (RAVINDRAN, BOOTHROYD, 2008). Muito desses resultados foram obtidos pela manipulação genética desses parasitas, iniciada em 1993 (SOLDATI, BOOTHROYD, 1993) e em plena evolução para *T. gondii*. Além das abordagens imunológicas e bioquímicas, a pesquisa de *N. caninum* não possuía ferramentas adequadas para a manipulação molecular, apesar do conhecimento já obtido com *T. gondii*. Nesse trabalho as principais formas de inserção e deleção de genes foram desenvolvidas, para futura verificação dos efeitos da deleção e controle da expressão do gene NcMic2-like1, cuja proteína expressa possui relação com o processo invasivo. O soro contra a sua forma recombinante inibiu a 69% da invasão *in vitro* (PEREIRA et al., 2011) e nos despertou para investimento nesse alvo pela abordagem molecular.

O desenvolvimento de métodos de integração de genes em Apicomplexa baseia-se na recombinação homóloga no genoma haplóide dos taquizoítas (LIMENITAKIS, SOLDATI-FAVRE, 2011), seja pela resistência ao cloranfenicol ou a pirimetamina. O cloranfenicol pertence a uma classe de antibióticos que inibe a tradução pela ligação a enzima peptiltransferase na unidade 50S do ribossomo em bactérias gram-positivas e negativas (NEU, GOOTZ, 1996) e provavelmente atua pelo mesmo mecanismo no apicoplasto dos Apicomplexas (RAMYA et al., 2007). Nas bactérias a resistência contra esta molécula é devido à ação da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT). CAT transfere um grupo acetil-S-CoA para o cloranfenicol resultando inicialmente no acetoxicloranfenicol que não possui atividade inibitória sobre os ribossomos (SHAW et al., 1979). *T. gondii* é sensível ao cloranfenicol, entretanto os taquizoítas adquirem resistência após a transfecção com o gene de resistência, CAT, flanqueado pelo promotor e região 3' UTR de um gene ativo e não letal (KIM et al., 1993). Os genes utilizados neste trabalho para o

controle de CAT foram SAG-1 e DHFR-TS. SAG-1 (NcSRS29B ou p29) é uma das proteínas superficiais mais abundantes em *T. gondii*, é ancorada por GPI, com 29 kDa (HOWE et al., 1998; HOWE et al., 2002) e está envolvida no contato inicial entre a célula hospedeira e o parasita (CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007). A Diidrofolato redutase - Timidilato sintase (DHFR-TS) é um gene bifuncional, cujo TS catalisa a conversão de dUMP (desoxiuridina monofosfato) e 5,10-metilenetetraidrofolato ($\text{CH}_2\text{CH}_4\text{folato}$) em dTMP (desoxitimidina monofosfato) e diidrofolato (H_2folato). DHFR catalisa a subsequente redução de H_2folato pelo NADPH para regenerar o tetraidrofolato (H_4folato) necessário para a transferência de unidades de carbono, uma etapa crucial para a síntese de DNA em protozoários (fig 92) (IVANETICH, SANTI, 1990).

Ivanetich & Santi, 1990.

Figura 92 – A fonte de unidades de carbono para a síntese de dTMP depende de DHFR-TS (IVANETICH, SANTI, 1990). O ciclo que culmina na síntese de dTMP se inicia com a conversão do diidrofolato ($\text{H}_2\text{ folate}$) em tetraidrofolato ($\text{H}_4\text{ folate}$) pela enzima DHFR que transfere elétrons (reduz) convertendo NADPH em NADP^+ . O tetraidrofolato recebe um hidróxi-metil se convertendo em 5,10-metilenetetraidrofolato transferido da serina (Ser), que se converte em glicina (Gly) pela serina hidroximetil-transferase (STH). O 5,10-metilenetetraidrofolato ($\text{CH}_2\text{-H}_4\text{ folate}$) é convertido em diidrofolato pela enzima timidilato sintase (TS), que transfere o hidróxi-metil para a dUMP, resultando em dTMP. O ciclo é quebrado por inibidores de DHFR, como a pirimetamina, impedindo a síntese de DNA pela única via de síntese de dTMP em protozoários.

Em *N. caninum*, duas formas de NcDHFR-TS foram depositadas no GeneBank, uma da cepa Nc-1 (BAJ17638.1) e outra da cepa Liverpool (CBZ56113.1). Essas sequências possuem duas principais regiões diferentes, enquanto BAJ17638.1 não possui as regiões inicial e posterior (fig 15), CBZ56113.1 possui ambas. A sequência NcDHFR-TS obtida nesse trabalho apresentou a região inicial e não foi detectada a região posterior após sequenciamento (fig 15),

contrastando com a sequência da mesma linhagem Nc-1 (BAJ17638.1). Pode ter havido falha na transcrição no caso da sequência Nc-1 ou um erro de predição de íntron/éxon na sequência Liverpool que decorre da predição do banco de dados Toxodb.

A ação de DHFR é bloqueada por antifolatos como a pirimetamina e cicloguanil, utilizados com alternativas no tratamento e prevenção da malária (SAHU et al., 2008). Após o aparecimento de cepas de *P. falciparum* resistentes em pacientes tratados (COWMAN et al., 1988; PETERSON et al., 1988), formas mutantes de DHFR foram detectadas e um vetor de resistência foi adaptado para integração de genes em *T. gondii* (DONALD, ROOS, 1993). Três mutações conferiram resistência, a conversão da serina 36 por arginina (M2), tirosina 83 por ácido aspártico (M3) e fenilalanina 245 por serina (M4). As duplas mutações (M2M3 e M3M4) resultaram em maior resistência a pirimetamina. Neste trabalho as mutações M2M3 foram incluídas no gene DHFR de *N. caninum*, como também a construção do vetor de resistência. Outro ponto explorado foi a possibilidade de formação de híbridos entre *T. gondii* e *N. caninum*, pois as sequências DHFR possuem um sítio EcoRI em uma posição que permite a ligação da região mutada M2M3 de *T. gondii* no lugar da região não mutada de *N. caninum*. O sítio EcoRI em DHFR é comum em vários Apicomplexas, o que permitiria a construção de híbridos entre estes e as regiões mutadas de *T. gondii* e *N. caninum*, antes da aplicação do kit de mutação. O vetor para a resistência em *T. gondii* (TgDHFR-DHFRM2M3) conferiu resistência a pirimetamina após transfecção em *N. caninum*, como também um híbrido formado pelo domínios DHFRM2M3 de *T. gondii* e TS de *N. caninum*.

Vetores baseados nestes genes de resistência são usualmente aplicados para integração de genes em *T. gondii* (DONALD, ROOS, 1993; KIM, WEISS, 2004) incluindo TetR (van POPPEL et al., 2006). A inserção de genes em *T. gondii* se iniciou em 1993 com vetores contra cloranfenicol (KIM et al., 1993), seguidos por DHFR mutante (DONALD, ROOS, 1993), obtenção de nocautes completos (DONALD et al., 1996), inserção de genes repórteres como Lac-Z (SEEBER, BOOTHROYD, 1996) ou GFP (STRIEPEN et al., 1998) e inserção sítio específica de genes (HUYNH, CARRUTHERS, 2009). Porém em *N. caninum* a manipulação genética era, até este trabalho, baseada exclusivamente em vetores de *T. gondii* (HOWE et al., 1997; HOWE, SIBLEY, 1997b).

O desenvolvimento de dois métodos de resistência em *N. caninum*, possibilitou a expressão de TetR e tetO-LacZ de modo estável e testar esse sistema além do modo transiente. Desde a descrição da proteína TetR relacionada a resistência bacteriana a tetraciclina (LEVY, MCMURRY, 1974; YAMAGUCHI et al., 1990), este sistema tem sido adaptado em eucariotos como um modelo para controle de expressão (GOSSEN, BUJARD, 1992). Este antibiótico regula a afinidade do dímero TetR pelo sítio genômico tetO, permitindo a expressão do operon TET. Devido às características citadas, este sistema foi adaptado para elucidar funções gênicas em protozoários como *Trypanosoma brucei* (WIRTZ, CLAYTON, 1995), *Entamoeba histolytica* (HAMANN et al., 1997) e *Giardia lamblia* (SUN, TAI, 2000). Em Apicomplexa este sistema foi desenvolvido para *T. gondii* (MEISSNER et al., 2001) e *Plasmodium* (DAS et al., 2011; MEISSNER et al., 2005) como uma alternativa para o controle da expressão como os métodos de RNA antisense e ribozimas (MEISSNER et al., 2001). Os efeitos inibitórios em bactérias pela tetraciclina se baseiam na ligação à subunidade 30 e em menor intensidade à 50S dos ribossomos. Alostericamente tetraciclina inibe a ligação do amino acil-tRNA ao sítio receptor (sítio-A) levando ao colapso da síntese protéica (GRIFFIN et al., 2010). O efeito tóxico da tetraciclina nos Apicomplexas vem de sua ação sobre os apicoplastos, uma organela não fotossintetizante plastidial, inibindo a tradução de proteínas nos seus ribossomos (DAHL, ROSENTHAL, 2008; DAHL et al., 2006). Para o controle da expressão por tetraciclina com diminuição dos efeitos tóxicos é necessário desenvolver um sistema responsivo com a adição do mínimo possível de droga. A eficácia da expressão pelo sistema TetR/tetO depende da quantidade e posição dos sítios tetO, que determinam a afinidade do dímero TetR. O trabalho desenvolvido por van Poppel em 2006 (van POPPEL et al., 2006) descreve diferentes combinações da posição e número de sítios tetO no promotor RPS13 que controla a expressão de Lac-Z em *T. gondii*. A expressão de Lac-Z foi diferente dependendo da posição e quantidade de sítios tetO. A construção empregada neste trabalho se baseou no vetor RPS13-sub23, com o sítio tetO na 23^a base acima do início da ORF. Esta posição possibilitou um aumento de 88 vezes a expressão induzida por tetraciclina. A aplicação do sistema de expressão TetR/tetO em *N. caninum* foi responsiva, principalmente nos taquizoítas transfectados de modo transiente. Como verificado para *T. gondii* o sistema TetR/tetO adaptado para *N. caninum* transiente foi ativado com 1 µg/ml e os efeitos tóxicos foram evidentes com

10 µg/ml quando os efeitos deletérios sobre a expressão superaram a sua ativação. O desenvolvimento de dois métodos para a estabilização da expressão possibilitou aumentar a expressão de Lac-Z e TetR, o que levaria a uma resposta mais acentuada. No sistema misto, com TetR estável com pirimetamina e tetO/Lac-Z transiente a resposta a tetraciclina foi maior, revelando que a maior oferta de TetR melhorou o sistema em *N. caninum*. O mesmo sistema misto foi aplicado com sucesso em *T. gondii* (van POPPEL et al., 2006). Neste trabalho o vetor tetO/Lac-Z passou a responder a tetraciclina independente a TetR. Aparentemente houve resposta do sistema duplo estável a tetraciclina, provavelmente a droga se ligou a TetR e possibilitou o aumento da expressão. A toxicidade, ou seja, a diminuição da expressão foi verificada, como observado em *T. gondii* (van POPPEL et al., 2006).

Os controles estáveis apenas com NcTub-tetO/Lac-Z (CAT ou NcDHFRM2M3) responderam de modo mais acentuado a tetraciclina, e de modo dose dependente, tanto selecionados com cloranfenicol quanto com pirimetamina. A expressão nos taquizoítas cloranfenicol resistentes aumentou até 619%, diminuindo com o aumento da concentração (acima de 1 µg/ml), provavelmente pela atuação tóxica da droga. O aumento foi menos acentuado nos taquizoítas resistentes a pirimetamina, com aumento até a maior concentração de tetraciclina, 5 µg/ml (116.3 %).

A maior expressão dos taquizoítas resistentes a cloranfenicol é devido provavelmente ao caráter epissomal do vetor, em que cada taquizoíta pode albergar mais de um vetor, já que esses podem se replicar independentemente. O taquizoíta estável pela pirimetamina apresenta um padrão de integração no genoma, provavelmente não respondendo com a mesma intensidade como os epissomais, por possuir apenas uma cópia por genoma.

Ainda é necessário, porém, aplicar novos ensaios para elucidar o aumento na expressão sem o auxílio de TetR. A aplicação de vetores sem o sítio tetO indicariam se há a interação de algum fator de transcrição com o sítio genômico de tetO. Também deve-se avaliar os efeitos gerais da tetraciclina sobre *N. caninum*. O parasita pode vir a acelerar a expressão de proteínas e enzimas relacionadas a um possível mecanismo de defesa. A incubação do parasita selvagem com tetraciclina e a avaliação da expressão de alguns fatores de transcrição (algumas provavelmente responsivas a Tetraciclina, como TetR) e proteínas relacionadas ao estresse causado pela droga poderia elucidar tal dúvida.

Uma aplicação prática deste efeito seria aumentar a expressão de proteínas inseridas em *N. caninum* em um curto espaço de tempo, otimizando a produção de proteínas recombinantes e do próprio parasita neste modelo que seria útil para produção de enzimas de parasitas relacionados, como *T. gondii*, *Babesia* e *Plasmodium*.

O uso de repórteres como YFP (GUBBELS et al., 2003) e Lac-Z (BRECHT et al., 1999; MCFADDEN et al., 1997; SEEGER, BOOTHROYD, 1996) em *T. gondii* possibilitou a detecção do parasita e a marcação de genes em ensaios de expressão (GUBBELS et al., 2004; HUYNH, CARRUTHERS, 2009), amplificando os resultados sobre genes relacionados à invasão e replicação. Esses testes complementaram testes clássicos não subjetivos como incorporação de [5,6-³H] (ZUTHER et al., 1999), PCR (GOTO et al., 2004; LAMORIL et al., 1996) e PCR em tempo real (JAUREGUI et al., 2001; KASPER et al., 2009; LIN et al., 2000), já padronizados para *T. gondii*. A expressão de Lac-Z em *T. gondii* possibilitou o delineamento de ensaios para avaliação de drogas (JONES-BRANDO et al., 2003; KRIVOGORSKY et al., 2008; SALEH et al., 2007), lise (SEEGER, 2000), e detecção em tecidos (SEEGER, BOOTHROYD, 1996).

Neste trabalho as linhagens de *N. caninum* obtidas expressando Lac-Z aderiram/invadiram as células vero com uma alta correlação entre número de taquizoítas e atividade de β -galactosidase, tanto na resistência a pirimetamina quanto a cloranfenicol (R^2 de 0.994 e 0.995, respectivamente). Este parâmetro é alcançado somente por métodos analíticos como PCR em tempo real. O desenvolvimento e padronização de um ensaio de adesão/invasão rápido e simples, realizado nesta tese representa uma ferramenta extraordinária e complementar para a avaliação de inibidores do processo invasivo, otimizando o processo de screening de drogas.

A alta correlação encontrada entre número de parasitas e aumento da atividade de β -galactosidase indicou a possibilidade de avaliar o efeito de drogas no processo de replicação de *N. caninum*. O intervalo entre 24 e 72 horas indicou um aumento médio de 1234% de aumento na atividade de β -galactosidase. Este período corresponde à fase exponencial de replicação, como obtido com *T. gondii* (MCFADDEN et al., 1997). Há três períodos para a avaliação de drogas sobre *N. caninum* pela reação de CPRG. O ensaio de invasão (duas horas) indica a relação de parasitas que aderiram/invadiram, já o ensaio de crescimento (24 e 72 horas)

detectam respectivamente o início da replicação e o seu processo exponencial. A compartimentação dos ensaios provavelmente facilitará a descrição do momento de ação de cada droga, indicando possíveis alvos atingidos, obviamente em complementação com dados prévios sobre o ciclo de *N. caninum*.

O uso de X-Gal para precipitação de β -galactosidase foi uma estratégia ainda não relatada na literatura de Apicomplexas. A precipitação foi homogênea, impregnando todo o taquizoíta de azul, provavelmente devido ao controle do gene pelo promotor de tubulina, cuja proteína é expressa logo abaixo da membrana e centríolos em *T. gondii* (SWEDLOW et al., 2002). *N. caninum* foi detectado sob diferentes formas, macroscópica e microscopicamente, isolado ou após incubação com células vero. Os taquizoítas azuis, resultantes de uma reação enzimática, representa uma alternativa valiosa para a detecção e quantificação pela contagem microscópica, os quais, em *N. caninum* são normalmente baseados em imunofluorescência (NAGULESWARAN et al., 2003) e coloração direta (BOTTONNE, 1991; DUBEY et al., 1998; PEREIRA et al., 2011). O ensaio ainda pode ser mais refinado pela substituição dos promotores que poderiam aumentar ou diminuir a precipitação de X-Gal, ou ainda obter uma expressão específica para cada fase do parasita, como os promotores de proteínas expressas majoritariamente no estágio de bradizoíta. Em síntese, a aplicação do gene Lac-Z como gene repórter amplifica as ferramentas para a detecção de *N. caninum*, permitindo ensaios relacionados à seleção de potenciais inibidores da invasão/replicação, localização de taquizoítas em culturas e avaliação da função de promotores.

Apesar da expressão de YFP ou GFP em *T. gondii* ser extensivamente aplicada, em *N. caninum* inexistia até este trabalho. O marcador fluorescente é utilizado para a detecção do parasita (GUBBELS et al., 2003) e marcação de genes expressos (HUYNH, CARRUTHERS, 2009), auxiliando na localização de cada proteína marcada. Para *N. caninum* a metodologia pode vir a ser empregada para os mesmos fins, além da expressão de formas mutadas de YFP e GFP, adequando o gene para o sistema de expressão do parasita para aumentar a fluorescência emitida.

As marcações de genes em *N. caninum* desenvolvidas neste trabalho foram bem sucedidas, pois além da expressão de YFP, foi possível marcar CAT e DHFRM2M3 (na forma truncada) com a cauda de histidina, inédito para Apicomplexa. Há marcações semelhantes na literatura, entretanto como a marcação

com o peptídeo myc (oriundo de uma proteína expressa pelo gene myc, um fator de transcrição) (POMEL et al., 2008) e GST (Glutathione S transferase) (TYLER, BOOTHROYD, 2011). Ambos são aplicados para marcação da expressão de genes em *T. gondii* utilizando anticorpos contra epítomos desses marcadores. O mesmo poderá ser aplicado para *N. caninum*, porém os resultados com a cauda de histidina indicam um passo além, pois indicou a possibilidade de purificação de proteínas expressas em Apicomplexas. Tal sistema de purificação é bem aplicado em outros sistemas eucarióticos, como células de mamíferos, leveduras e células de insetos (BRONDYK, 2009). A expressão de proteínas processadas pelo sistema de expressão de *N. caninum* com as suas modificações pós-traducionais levaria a obtenção de formas mais ativas de enzimas e antígenos vacinais, inclusive para a expressão de proteínas de outros Apicomplexas.

N. caninum foi responsivo à maioria das ferramentas genéticas desenvolvidas neste trabalho, iniciando novas formas de detecção e avaliação da expressão de genes. Isso enriquecerá trabalhos posteriores e coloca *N. caninum* como uma alternativa para a pesquisa de Apicomplexas, ao lado de *T. gondii*, que possui muitos destes sistemas bem padronizados.

No processo de seleção por pirimetamina em *T. gondii*, o vetor de resistência adquire duas formas, uma integrada no genoma por recombinação (homóloga ou não) ou na forma circular, episomal (DONALD, ROOS, 1993). A integração do vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z foi demonstrada pelo tratamento do genoma de *N. caninum* com PstI seguida da ligação, carregando parte do DNA de *N. caninum*. Estes ensaios foram baseados nos resgates de vetores TgDHFR-DHFRM2M3 (ROOS et al., 1997) que foi aplicado na determinação de mutagênese insercional e marcação de resgate em *T. gondii* (DONALD, ROOS, 1995; SULLIVAN et al., 1999).

A inserção de genes possibilita, além da resistência, a integração do vetor no genoma de *N. caninum*. O vetor NcDHFR-DHFRM2M3/NcTub-tetO/Lac-Z se integrou no cromossomo XII, na posição 1744356, 2343121 bases acima da posição original do gene DHFR-TS (4087477, início do promotor NcDHFR-TS), indicando uma recombinação não homóloga, como foi verificado para *T. gondii* (DONALD, ROOS, 1993). O resgate do vetor integrado foi possível após dois meses de seleção e os taquizoítas se mantêm resistentes há mais de um ano.

Os vetores com resistência a cloranfenicol apresentam em *T. gondii* uma

recombinação mais precisa, como mostrado desde o primeiro trabalho sobre o assunto (KIM et al., 1993). Tal efeito foi verificado com os vetores NcDHFR-CAT que provavelmente ao substituir o gene NcDHFR-TS original levou à morte do taquizoíta, pois as enzimas codificadas por esse gene fazem parte da via de produção de novo de purinas, ácido timidílico e certos aminoácidos (IVANETICH, SANTI, 1990).

Além da integração de genes, a recombinação homóloga permite a deleção destes, pois a pressão seletiva faz com que o gene de resistência se integre no genoma pela troca de promotor e região 3' UTR que substituem suas regiões correspondentes no genoma de *N. caninum*, junto com o gene controlado por estes, deletando-o. Porém vetores baseados em CAT ou DHFR mutado possuem grande probabilidade de recombinação não específica, o que pode ocasionar outras deleções indesejadas. Em *T. gondii*, porém, quando se deleta a enzima hipoxantina xantina guanina fosforibosiltransferase (HXGPRT), o parasita se torna sensível ao ácido micofenólico (*T. gondii* Δ HXGPRT). Vetores compostos pela região codificadora de HXGPRT flanqueados com o promotor e região 3' do gene que se deseja deletar possibilitam a recombinação homóloga em taquizoítas Δ HXGPRT quando tratados com ácido micofenólico. Tal recombinação indicou uma maior frequência de integração específica quando comparados com vetores baseados em CAT e DHFR. A partir desta observação a deleção de genes passou a ser aplicada em parasitas Δ HXGPRT com seleção por ácido micofenólico em *T. gondii* (DONALD et al., 1996). Até o momento para *N. caninum* o sistema foi adaptado e quatro genes foram selecionados: NcHXGPRT, NcSAG-1, NcDHFR-TS e NcMic2-like1. NcDHFR-TS, cuja deleção é letal não sustentou a resistência por mais de um ano, assim como observado para NcDHFR-CAT. Os outros três genes não são letais em *T. gondii* e NcHXGPRT foi deletado e os parasitas nocauteados selecionados para a obtenção de um sistema por seleção com ácido micofenólico (DONALD et al., 1996). Aparentemente esses taquizoítas não perdem a capacidade invasiva e servirão de controle para outros genes deletados. Os genes NcSAG-1 e NcMic2-like1 possuem relação direta com o processo invasivo (CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007; PEREIRA et al., 2011) e juntamente com NcHXGPRT representam os primeiros genes testados para *N. caninum*. A deleção de NcSAG-1 demonstra a funcionalidade da seleção por cloranfenicol e a obtenção de taquizoítas modificados para diferentes fins, como a elucidação dos processos invasivos e metabólicos e na obtenção de

taquizoítas atenuados para modelos vacinais. A deleção de NcMic2-like1 representa um passo mais importante, já que o soro contra essa proteína diminui a invasão em cerca de 69% (PEREIRA et al., 2011) e há pouco tempo fora considerado um gene cuja deleção era letal para *T. gondii* (STARNES et al., 2006). A padronização dos sistemas de deleção exclusivos para *N. caninum* é uma nova frente de pesquisa para o filo Apicomplexa, complementando os modelos desenvolvidos para *T. gondii*.

Outro ponto explorado nesse trabalho foi a caracterização e obtenção de NcMIC2-like1 na forma solúvel. NcMic2-like1 de *N. caninum* pertence a família das proteínas anônimas relacionadas a trombospondinas (TRAPs), presentes em diversos Apicomplexas. TRAPs são compostas basicamente de um peptídeo sinal, um domínio de von Willebrand tipo A (ou integrina I), um ou mais domínios de trombospondinas, uma região transmembrana com um sítio de clivagem para rombóides e uma cauda citoplasmática ácida com um resíduo de triptofano conservado (MORAHAN et al., 2009). Nesse trabalho as duas formas homólogas de TRAP de *N. caninum* foram identificadas, NcMIC2-like1, alvo da presente pesquisa e adicionalmente NcMIC2. A forma nativa de NcMIC2-like1 foi detectada por western blot 2D em uma região entre 116 e 132 kDa, em contraste com o peso predito de 77 kDa para NcMic2-like1 e 80 kDa para NcMIC2. Lovett e colaboradores em 2000, descreveram NcMic2 entre 100 e 120 kDa (por western blot 1D), muito similar aos dois spots identificados neste trabalho (116 - 123 kDa). O homólogo de *T. gondii* (TgMIC2) também foi localizado com um peso (113 kDa) maior que o predito (79,9 kDa), (WAN et al., 1997). Esse efeito se deve provavelmente ao PI ácido e as prolinas presentes nessas proteínas (ROBSON et al., 1997). TgMIC2 foi detectado de múltiplos spots (ZHOU et al., 2004) ou spots únicos (KAWASE et al., 2007; XIA et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

NcMIC2-like1 foi primeiramente detectada a 78 kDa (PEREIRA et al., 2011) em uma strip de 3 - 11 NL, sem identificação por espectrometria de massas. Devido ao PI ácido de NcMIC2-like1, a separação em uma strip com faixa de 3 - 5.6 foi mais adequada para a detecção da proteína. Além disso, foi priorizada a separação de proteínas de peso acima de 100 kDa, pelo uso de gel de acrilamida de 10 % (ao invés de 12,5 %) e corrida até a saída de proteínas de até 25 KDa do gel. Deste modo foi possível separar melhor a região de 100 a 150 kDa e transferi-la para membrana, melhorando substancialmente a detecção das formas pesadas de NcMIC2-like1.

Uma análise da sequência NcMIC2-like1 para predição de epítomos de células B e T indicou a região WXXCXVTCG, uma sequência conservada entre os

homólogos de TRAP, como a proteína anônima relacionada à trombospondina de *Plasmodium falciparum* (PfTRAP, ROBSON et al., 1988), proteína CS relacionada à TRAP (PfCTRP, TROTTEIN et al., 1995), TgMIC2 (WAN et al., 1997) e NcMIC2 (LOVETT et al., 2000). Há um grupo de proteínas com grupos funcionais em comum com os encontrados nas TRAPs, como a proteína do circumsporozoíta de *Plasmodium* (CSP) (DAME et al., 1984). CSP possui um domínio trombospondina (TSP-1), o componente parasito-específico da vacina RTS,S/AS01E desenvolvido pela GSK (Mosquirix), a única vacina contra malária na fase 3 de avaliação (SCHWARTZ et al., 2012). A RTS,S/AS é formada por 189 aminoácidos oriundos dos 412 da proteínas CS (CSP), incluindo 19 repetições NANO e a região C-terminal com um domínio TSP-1 (que alberga a sequência WXXCXVTCG) (VEKEMANS et al., 2009). Anticorpos monoclonais contra CSP bloquearam a invasão do esporozoíta *in vitro* (POTOCNJAK et al., 1980) e *in vivo* (HOLLINGDALE et al., 1984). Apesar da baixa produção natural de anticorpos contra a forma nativa de NcMIC2-like1, o soro produzido contra essa proteína foi capaz de reduzir em 69% a invasão de taquizoítas *in vitro* (PEREIRA et al., 2011). O componente da vacina malarial, PfCSP, foi raramente detectado no soro de indivíduos vivos em áreas endêmicas na África (ZAVALA et al., 1985), demonstrando que o antígeno protetivo não é necessariamente imunogênico em infecções adquiridas de modo natural (REECE et al., 2004). CSP é o componente principal de esporozoítas irradiados que possuem capacidade protetiva e este componente vem sendo testado por mais de 20 anos, desde a sua descoberta em 1984 (DAME et al., 1984; ENEA et al., 1984). Várias formas de CSP foram testadas ao longo do tempo, como vacinas de DNA, a forma íntegra ou fragmentos de CSP, como também peptídeos (BALLOU et al., 1987; FRIES et al., 1992; HEPPNER et al., 1996; Rickman et al., 1991), porém a proteção consistente foi apenas adquirida quando uma parte da sequência CSP (com os epítomos reconhecidos por células B e T) foram fusionados com o antígeno de superfície da hepatite B em combinação com a família de adjuvantes AS (para esclarecimento completo, ver Cohen e colaboradores (COHEN et al., 2010).

É evidente que as proteínas MIC2 não são idênticas a PfCSP, no entanto é importante ter em mente esse exemplo para explorar as proteínas dessa família em detalhes, não apenas em estudos funcionais e estruturais, mas também imunológicos. Uma das diferenças entre as duas famílias é que PfCSP age sem formar complexos, enquanto TgMIC2 precisa de uma proteína chamada TgMAP (proteína associada a

TgMIC2) constituindo um complexo hetero-hexamérico (JEWETT, SIBLEY, 2004). Esta associação é necessária, pois a associação é devidamente carregada até os micronemas (HARPER et al., 2006; HUYNH et al., 2006; HUYNH et al., 2003). Além disso a proteína tem relação com a virulência, pois a supressão condicional de TgMIC2 retirou de *T. gondii* sua letalidade típica em modelos murinos (HUYNH, CARRUTHERS, 2006). Outro ponto importante é que PfTRAP está sendo testado em associação com RTS,S/AS02 como vacina e está na fase de testes 2a (SCHWARTZ et al., 2012), corroborando a ideia que NcMIC2-like1 (assim como NcMIC2) possuem potencial em futuros testes, incluindo imunização contra neosporose.

Para a avaliação funcional de NcMIC2-like1 é necessária a obtenção de formas recombinantes solúveis, porém a expressão em *E. coli*, apesar da grande expressão, conferiu apenas uma forma insolúvel, utilizada para a geração de soro policlonal (Pereira et al., 2011). Na busca pela obtenção de formas solúveis expressas por *E. coli*, alguns peptídeos estão disponíveis, como MBP (di GUAN et al., 1988), Tiorredoxina (Trx, LAVALLIE et al., 1993), "N-utilizing substance A transcription antitermination factor" (NusA, DAVIS et al., 1999), peptídeo para aumento da solubilidade (SEP, KATO et al., 2007), GB1-tag (baseado no domínio B1 de ligação ao IgG da proteína G de streptococcus, (ZHOU et al., 2001), "Small ubiquitin-like modifier" (SUMO, MARBLESTONE et al., 2006), "modified haloalkane dehalogenase" (Halo-Tag7, OHANA et al., 2009), porém nenhuma destas foram baseadas em regiões genômicas não expressas com capacidade de tradução em peptídeos de alta solubilidade. No DNA genômico de *N. caninum* foi detectada uma região de 185 pb, rico em ácido glutâmico e aspártico localizado no contig 1080, (Nc1080). Diferentemente das demais caudas, a 1080 é formada em sua maior parte de ácido glutâmico (55,7%) e aspártico (13,5%) conferindo alta polaridade e grande carga quando extraído em pH alcalino, ambiente de extração do sistema pET28 tradicional (pH 8,0).

A expressão de NcMIC2-like1 recombinante apresentou aumento aparente da massa molecular, de 42 kDa predito para 52 kDa (PEREIRA et al., 2011). Este fenômeno foi comum para as proteínas relacionadas às trombospondinas, para NcMIC2 (*N. caninum*, LOVETT et al., 2000), TgMIC2 (*T. gondii*, ACHBAROU et al., 1991)) e PfTRAP (*P. falciparum*, ROBSON et al., 1997). Este efeito ocorre provavelmente devido à grande quantidade de prolinas e o ponto isoelétrico ácido, relatado anteriormente nas proteínas colágeno e caseína

(ROBSON et al., 1997). A expressão de três formas solúveis, identificadas por espectrometria de massas, pode ser explicada pela presença de uma cauda altamente hidrofílica aliada à influência das prolinas. A região entre a menor isoforma (~ 48 kDa) e a maior de ~ 60 kDa correspondem à fusão do fragmento de NcMIC2-like1 predito (42 kDa) e seu peso real (52 kDa) com a cauda Nc 1080 (7 kDa).

Em geral os principais sistemas eucarióticos como leveduras (*Pichia pastoris*, DALY,

HEARN, 2005), células de insetos (Baculovirus, van OERS, 2011) e de mamíferos (células CHO, KIM et al., 2012) são adequados para expressão de formas solúveis e possivelmente ativas de polipeptídeos, porém a quantidade expressa e purificada é bem menor que no sistema bacteriano. NcMIC2-like1 foi purificado na concentração de 40 mg/l de meio LB inicial. Além da expressão pelo sistema bacteriano, a expressão de NcMIC2-like1 através da inserção no próprio genoma de *N. caninum* aumentaria a oferta da proteína no parasita e seria uma opção para a expressão de proteínas de Apicomplexas em *N. caninum*.

Métodos de inserção e deleção de genes em *N. caninum* ampliam as ferramentas para a compreensão do parasita e auxiliam no desenvolvimento de métodos para a prevenção e combate da neosporose. Uma estratégia especulativa da deleção é a atenuação genética, onde genes relacionados à virulência ou efeitos colaterais, como inflamação ou supressão da imunidade seriam completamente silenciados e manteriam o parasita viável, porém não virulento, melhorando a resposta protetora. A única vacina comercial contra neosporose (Bovilis® Neoguard) é feita a partir de parasitas mortos e apresenta índices de proteção muito variáveis (INNES et al., 2011). A inserção de genes aumentaria a expressão de proteínas relacionadas à resposta protetiva que não são expressas ou expostas para o sistema imune, potencializando o efeito de possíveis vacinas. NcMic2-like1 se encaixa nesse perfil, pois há pouca resposta contra essa proteína em animais imunizados com o extrato do taquizoíta (PEREIRA et al., em publicação) em contraste com os efeitos do soro contra essa proteína em ensaios de invasão *in vitro* (PEREIRA et al., 2011). Sua deleção e expressão indicariam sua importância no ciclo e como antígeno vacinal. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de expressão e purificação exclusivo para o filo Apicomplexa levaria a produção de antígenos vacinais com as modificações pós-traducionais típicas potencializando a

resposta protetiva.

Ferramentas moleculares para *N. caninum*, além de tornar a pesquisa deste mais independente de *T. gondii*, contribui de modo geral para o desenvolvimento das pesquisa em outros membros do filo Apicomplexa, auxiliando na obtenção de métodos para descrição e combate das diversas doenças causadas por este grupo. A deleção e controle da expressão de NcMic2-like1 será a primeira abordagem molecular própria de *N. caninum* sobre uma proteína relacionada a invasão, indicando novas abordagens para compreensão e combate da neosporose.

6 - CONCLUSÕES

- Promotores de *T. gondii* são reconhecidos pelo sistema de expressão de *N. caninum*;
- Os dois métodos de inserção e deleção de genes desenvolvidos para *N. caninum* possibilitam trabalhar geneticamente com duas linhagens, uma com resistência a cloranfenicol e outra a pirimetamina;
- As linhagens de *N. caninum* expressando Lac-Z podem ser utilizadas em ensaios de invasão, detecção e crescimento;
- O sistema TetR/tetO desenvolvido para *N. caninum* é responsivo à tetraciclina de modo transiente e estável;
- *N. caninum* modificado geneticamente contendo o gene de histidina permite a expressão e purificação de proteínas marcadas com His-Tag dentro do próprio parasita;
- Os vetores construídos para a transfecção em *N. caninum* permitem a expressão e deleção do gene NcMic2-like1;
- NcMIC2-like1 está presente em dois spots de pl ácido (3.9 e 4.0) e com peso molecular de 116.4 e 123.2 kDa;
- Uma cauda genômica rica em ácido glutâmico e ácido aspártico permite a obtenção de NcMIC2-like1 recombinante solúvel .

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Autheman JM, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 1991;47(2):223-33.
- Aguiar DM, Cavalcante GT, Rodrigues AA, Labruna MB, Camargo LM, Camargo EP, et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. Vet Parasitol. 2006;142(1-2):71-7.
- Anderson T, DeJardin A, Howe DK, Dubey JP, Michalski ML. *Neospora caninum* antibodies detected in Midwestern white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) by Western blot and ELISA. Vet Parasitol. 2007;145(1-2):152-5.
- Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, et al. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. Lancet. 1987;1(8545):1277-81.
- Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, et al. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. J Biol Chem. 2006;281(8):5197-208.
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd. 1984;70(2):271-4.
- Bottone EJ. Diagnosis of acute pulmonary toxoplasmosis by visualization of invasive and intracellular tachyzoites in Giemsa-stained smears of bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol. 1991;29(11):2626-7.
- Braga Mdo S, Andre MR, Jusi MM, Freschi CR, Teixeira MC, Machado RZ. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in Sao Luis, Maranhao, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2012;21(2):107-11.
- Brecht S, Erdhart H, Soete M, Soldati D. Genome engineering of *Toxoplasma gondii* using the site-specific recombinase Cre. Gene. 1999;234(2):239-47.
- Brondyk WH. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. Methods Enzymol. 2009;463:131-47.
- Brossier F, David Sibley L. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(11):2266-72.
- Bruhn FR, Figueiredo VC, Andrade Gda S, Costa-Junior LM, Rocha CM, Guimaraes AM. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in rural areas in Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2012;21(2):161-4.

Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(1):83-9.

Cerede O, Dubremetz JF, Soete M, Deslee D, Vial H, Bout D, et al. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med*. 2005;201(3):453-63.

Cereghino GP, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10(5):422-7.

Chalfie M. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol*. 1995;62(4):651-6.

Cohen J, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Vekemans J, Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Hum Vaccin*. 2010;6(1):90-6.

Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CF, Gondim LF, Wald V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet Parasitol*. 2002;103(3):195-202.

Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(23):9109-13.

Cowper B, Matthews S, Tomley F. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;186(1):1-10.

Dahl EL, Rosenthal PJ. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol*. 2008;24(6):279-84.

Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3124-31.

Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*. 2005;18(2):119-38.

Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1984;225(4662):593-9.

Das S, Shevade S, LaCount DJ, Jarori GK. *Plasmodium falciparum* enolase complements yeast enolase functions and associates with the parasite food vacuole. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;179(1):8-17.

Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1999;65(4):382-8.

de Sousa ME, Porto WJ, de Albuquerque PP, de Souza Neto OL, Pinheiro Junior JW, Mota RA. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in the state of Alagoas, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012;21(3):287-90.

Debache K, Alaeddine F, Guionaud C, Monney T, Muller J, Strohbusch M, et al. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 2009;39(12):1373-84.

Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC, et al. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *Embo j.* 1999;18(22):6221-7.

Di Cristina M, Spaccapelo R, Soldati D, Bistoni F, Crisanti A. Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol.* 2000;20(19):7332-41.

di Guan C, Li P, Riggs PD, Inouye H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* 1988;67(1):21-30.

Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 2001;31(8):747-52.

Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 1997;26(1):163-73.

Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 1996;84(6):933-9.

Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD, Ward GE. The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;111(1):15-30.

Donald RG, Carter D, Ullman B, Roos DS. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem.* 1996;271(24):14010-9.

Donald RG, Roos DS. Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5749-53.

Donald RG, Roos DS. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11703-7.

Dowse T, Soldati D. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(4):388-96.

Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol*. 2006;134(4):267-89.

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;193(10):1259-63.

Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*. 2011;181(2-4):382-7.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):267-99.

Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*. 1996;67(1-2):1-59.

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):323-67.

Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals--the last five years. *Vet Parasitol*. 2011;180(1-2):90-108.

Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*. 1998;28(7):1007-13.

Enea V, Arnot D, Schmidt EC, Cochrane A, Gwadz R, Nussenzweig RS. Circumsporozoite gene of plasmodium cynomolgi (Gombak):cDNA cloning and expression of the repetitive circumsporozoite epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(23):7520-4.

Fernandes BC, Gennari SM, Souza SL, Carvalho JM, Oliveira WG, Cury MC. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlandia, Minas Gerais--Brazil. *Vet Parasitol*. 2004;123(1-2):33-40.

Figliuolo LP, Kasai N, Ragozo AM, de Paula VS, Dias RA, Souza SL, et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2004;123(3-4):161-6.

Figueredo LA, Dantas-Torres F, de Faria EB, Gondim LF, Simoes-Mattos L, Brandao-Filho SP, et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. *Vet Parasitol*. 2008;157(1-2):9-13.

Frenal K, Tay CL, Mueller C, Bushell ES, Jia Y, Graindorge A, et al. Global analysis of apicomplexan protein S-acyl transferases reveals an enzyme essential for invasion. *Traffic*. 2013.

Fries LF, Gordon DM, Schneider I, Beier JC, Long GW, Gross M, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a *Plasmodium falciparum* vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Infect Immun*. 1992;60(5):1834-9.

Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FF, de Vries E. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;136(1):25-34.

Gennari SM, Yai LE, D'Auria SN, Cardoso SM, Kwok OC, Jenkins MC, et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol*. 2002;106(2):177-9.

Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*. 2004;34(2):159-61.

Gondim LF, Pinheiro AM, Santos PO, Jesus EE, Ribeiro MB, Fernandes HS, et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet Parasitol*. 2001;101(1):1-7.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(12):5547-51.

Goto M, Takahashi T, Kanda T, Iwamoto A. Detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-1-infected Japanese patients with focal neurological signs. *J Int Med Res*. 2004;32(6):665-70.

Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(3):C539-48.

Gubbels MJ, Li C, Striepen B. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):309-16.

Gubbels MJ, Wieffer M, Striepen B. Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;137(1):99-110.

Guedes MH, Guimaraes AM, Rocha CM, Hirsch C. [Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of southern Minas Gerais]. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2008;17(4):189-94.

Guimaraes JS, Jr., Souza SL, Bergamaschi DP, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;124(1-2):1-8.

Hamann L, Buss H, Tannich E. Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;84(1):83-91.

Harper JM, Huynh MH, Coppens I, Parussini F, Moreno S, Carruthers VB. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol Biol Cell.* 2006;17(10):4551-63.

Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during. *Parasitology.* 2006;133(Pt 3):261-78.

Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major. *Infect Immun.* 1996;64(10):4279-87.

Hemphill A. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol.* 1999;43:47-104.

Heppner DG, Gordon DM, Gross M, Welde B, Leitner W, Krzych U, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of *Plasmodium falciparum* repeatless circumsporozoite protein vaccine encapsulated in liposomes. *J Infect Dis.* 1996;174(2):361-6.

Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL, Nussenzweig RS. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol.* 1984;132(2):909-13.

Howe DK, Crawford AC, Lindsay D, Sibley LD. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1998;66(11):5322-8.

Howe DK, Mercier C, Messina M, Sibley LD. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;86(1):29-36.

Howe DK, Sibley LD. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods.* 1997;13(2):123-33.

Howe DK, Tang K, Conrad PA, Sverlow K, Dubey JP, Sibley LD. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(3):611-5.

Hutson SL, Mui E, Kinsley K, Witola WH, Behnke MS, El Bissati K, et al. *T. gondii* RP promoters & knockdown reveal molecular pathways associated with. *PLoS One.* 2010;5(11):e14057.

Huynh MH, Carruthers VB. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell.* 2009;8(4):530-9.

Huynh MH, Carruthers VB. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. PLoS Pathog. 2006;2(8):e84.

Huynh MH, Harper JM, Carruthers VB. Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes. Parasitol Res. 2006;98(5):389-95.

Huynh MH, Opitz C, Kwok LY, Tomley FM, Carruthers VB, Soldati D. Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*. Cell Microbiol. 2004;6(8):771-82.

Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. Embo j. 2003;22(9):2082-90.

Innes EA, Bartley PM, Rocchi M, Benavidas-Silvan J, Burrells A, Hotchkiss E, et al. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? Vet Parasitol. 2011;180(1-2):155-63.

Innes EA, Vermeulen AN. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*. Parasitology. 2006;133 Suppl:S145-68.

Ivanetich KM, Santi DV. Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. Faseb j. 1990;4(6):1591-7.

Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2065-71.

Jewett TJ, Sibley LD. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. Mol Cell. 2003;11(4):885-94.

Jewett TJ, Sibley LD. The toxoplasma proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. J Biol Chem. 2004;279(10):9362-9.

Jones-Brando L, Torrey EF, Yolken R. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. Schizophr Res. 2003;62(3):237-44.

Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. J Cell Biol. 1999;147(5):937-44.

Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, Reischer GH, Kratochwill K, Forster-Waldl E, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;63(1):10-5.

Kato A, Maki K, Ebina T, Kuwajima K, Soda K, Kuroda Y. Mutational analysis of protein solubility enhancement using short peptide tags. Biopolymers. 2007;85(1):12-8.

- Kawase O, Nishikawa Y, Bannai H, Zhang H, Zhang G, Jin S, et al. Proteomic analysis of calcium-dependent secretion in *Toxoplasma gondii*. *Proteomics*. 2007;7(20):3718-25.
- Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):917-30.
- Kim K, Soldati D, Boothroyd JC. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*. 1993;262(5135):911-4.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004;34(3):423-32.
- King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*. 2010;40(8):945-50.
- Kleinschmidt C, Tovar K, Hillen W, Porschke D. Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control. *Biochemistry*. 1988;27(4):1094-104.
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23(5):567-75.
- Krivogorsky B, Grundt P, Yolken R, Jones-Brando L. Inhibition of *Toxoplasma gondii* by indirubin and tryptanthrin analogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(12):4466-9.
- Lamoril J, Molina JM, de Gouvello A, Garin YJ, Deybach JC, Modai J, et al. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol*. 1996;49(1):89-92.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11(2):187-93.
- Levy SB, McMurry L. Detection of an inducible membrane protein associated with R-factor-mediated tetracycline resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974;56(4):1060-8.
- Limenitakis J, Soldati-Favre D. Functional genetics in Apicomplexa: potentials and limits. *FEBS Lett*. 2011;585(11):1579-88.
- Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(11):4121-5.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*. 1999;82(4):327-33.

Locatelli-Dittrich R, Richartz RR, Joineau ME, Pinckney RD, de Sousa RS, Leite LC, et al. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. *Vet Rec.* 2003;153(12):366-7.

Lovett JL, Howe DK, Sibley LD. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;107(1):33-43.

Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, Lim P, Zuo X, Butt TR. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci.* 2006;15(1):182-9.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 1998;28(9):1473-8.

McFadden DC, Seeber F, Boothroyd JC. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(9):1849-53.

Meissner M, Brecht S, Bujard H, Soldati D. Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(22):E115.

Meissner M, Krejany E, Gilson PR, de Koning-Ward TF, Soldati D, Crabb BS. Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2980-5.

Meissner M, Schluter D, Soldati D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* 2002;298(5594):837-40.

Melo DP, da Silva AC, Ortega-Mora LM, Bastos SA, Boaventura CM. [Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovines from Anapolis and Goiania microregions, Goias, Brazil]. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006;15(3):105-9.

Menard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect.* 2000;2(6):633-42.

Merrick CJ, Duraisingh MT. Epigenetics in *Plasmodium*: what do we really know? *Eukaryot Cell.* 2010;9(8):1150-8.

Mineo TW, Silva DA, Costa GH, von Ancken AC, Kasper LH, Souza MA, et al. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;98(4):239-45.

Minervino AH, Ragozo AM, Monteiro RM, Ortolani EL, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santarem, Para, Brazil. *Res Vet Sci.* 2008;84(2):254-6.

Moraes LM, Raimundo JM, Guimaraes A, Santos HA, Macedo Junior Gde L, Massard CL, et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhao, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(4):312-7.

Morahan BJ, Wang L, Coppel RL. No TRAP, no invasion. *Trends Parasitol.* 2009;25(2):77-84.

Munhoz AD, Flausino W, Silva RT, Almeida CR, Lopes CW. [Distribution of anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy cows at municipalities of Resende and Rio Claro in the State of Rio de Janeiro, Brazil]. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006;15(3):101-4.

Naguleswaran A, Muller N, Hemphill A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Exp Parasitol.* 2003;104(3-4):149-58.

Neu HC, Gootz TD. Antimicrobial Chemotherapy. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

Ohana RF, Encell LP, Zhao K, Simpson D, Slater MR, Urh M, et al. HaloTag7: a genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expr Purif.* 2009;68(1):110-20.

Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 1996;273(5280):1392-5.

Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol.* 2000;7(3):215-9.

Oshiro LM, Matos Mde F, de Oliveira JM, Monteiro LA, Andreotti R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2007;16(3):133-8.

Pereira LM, Candido-Silva JA, De Vries E, Yatsuda AP. A new thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum* (NcMIC2-like1). *Parasitology.* 2011;138(3):287-97.

Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(23):9114-8.

Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, et al. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol.* 1989;9(7):3151-4.

Pihlajamaa T, Kajander T, Knuuti J, Horkka K, Sharma A, Permi P. Structure of *Plasmodium falciparum* TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A

domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. *Biochem J.* 2013;450(3):469-76.

Polonais V, Soldati-Favre D. Versatility in the acquisition of energy and carbon sources by the Apicomplexa. *Biol Cell.* 2010;102(8):435-45.

Pomel S, Luk FC, Beckers CJ. Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS Pathog.* 2008;4(10):e1000188.

Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp Med.* 1980;151(6):1504-13.

Putignani L, Possenti A, Cherchi S, Pozio E, Crisanti A, Spano F. The thrombospondin-related protein CpMIC1 (CpTSP8) belongs to the repertoire of micronemal proteins of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;157(1):98-101.

Ramya TN, Mishra S, Karmodiya K, Surolia N, Surolia A. Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):307-16.

Ravindran S, Boothroyd JC. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. *Traffic.* 2008;9(5):647-56.

Reece WH, Pinder M, Gothard PK, Milligan P, Bojang K, Doherty T, et al. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nat Med.* 2004;10(4):406-10.

Rickman LS, Gordon DM, Wistar R, Jr., Krzych U, Gross M, Hollingdale MR, et al. Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoryl lipid A, and squalane in malaria circumsporozoite protein vaccine. *Lancet.* 1991;337(8748):998-1001.

Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, Harris TJ, Marsh K, Newbold CI, et al. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature.* 1988;335(6185):79-82.

Robson KJ, Naitza S, Barker G, Sinden RE, Crisanti A. Cloning and expression of the thrombospondin related adhesive protein gene of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;84(1):1-12.

Rodrigues AA, Gennari SM, Paula VS, Aguiar DM, Fujii TU, Starke-Buzeti W, et al. Serological responses to *Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet Parasitol.* 2005;129(1-2):21-4.

Romanelli PR, Freire RL, Vidotto O, Marana ER, Ogawa L, De Paula VS, et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. *Res Vet Sci*. 2007;82(2):202-7.

Roos DS, Sullivan WJ, Striepen B, Bohne W, Donald RG. Tagging genes and trapping promoters in *Toxoplasma gondii* by insertional mutagenesis. *Methods*. 1997;13(2):112-22.

Rossi GF, Cabral DD, Ribeiro DP, Pajuaba AC, Correa RR, Moreira RQ, et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlandia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. *Vet Parasitol*. 2011;175(3-4):252-9.

Sahu NK, Sahu S, Kohli DV. Novel molecular targets for antimalarial drug development. *Chem Biol Drug Des*. 2008;71(4):287-97.

Salaberry SR, Okuda LH, Nassar AF, de Castro JR, Lima-Ribeiro AM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep flocks of Uberlandia County, MG. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19(3):148-51.

Saleh A, Friesen J, Baumeister S, Gross U, Bohne W. Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1217-22.

Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J*. 2012;11:11.

Seeber F, Boothroyd JC. *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*. 1996;169(1):39-45.

Seeber F. An enzyme-release assay for the assessment of the lytic activities of complement or antimicrobial peptides on extracellular *Toxoplasma gondii*. *J Microbiol Methods*. 2000;39(3):189-96.

Shaw WV, Packman LC, Burleigh BD, Dell A, Morris HR, Hartley BS. Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature*. 1979;282(5741):870-2.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 1962;59:223-39.

Soares HS, Ahid SM, Bezerra AC, Pena HF, Dias RA, Gennari SM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoro, Rio Grande do Norte, Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;160(3-4):211-4.

Soldati D, Boothroyd JC. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1993;260(5106):349-52.

Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2001;31(12):1293-302.

Starnes GL, Coincon M, Sygusch J, Sibley LD. Aldolase is essential for energy production and bridging adhesin-actin cytoskeletal interactions during parasite invasion of host cells. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):353-64.

Starnes GL, Jewett TJ, Carruthers VB, Sibley LD. Two separate, conserved acidic amino acid domains within the *Toxoplasma gondii* MIC2 cytoplasmic tail are required for parasite survival. *J Biol Chem*. 2006;281(41):30745-54.

Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9(4):338-69.

Striepen B, He CY, Matrajt M, Soldati D, Roos DS. Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;92(2):325-38.

Sullivan WJ, Jr., Chiang CW, Wilson CM, Naguib FN, el Kouni MH, Donald RG, et al. Insertional tagging of at least two loci associated with resistance to adenine arabinoside in *Toxoplasma gondii*, and cloning of the adenosine kinase locus. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;103(1):1-14.

Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell*. 1997;90(3):511-22.

Sun CH, Tai JH. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;105(1):51-60.

Swedlow JR, Hu K, Andrews PD, Roos DS, Murray JM. Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: a comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2014-9.

Tanaka M, Gu HM, Bzik DJ, Li WB, Inselburg JW. Dihydrofolate reductase mutations and chromosomal changes associated with pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;39(1):127-34.

Tiemann JC, Souza SL, Rodrigues AA, Duarte JM, Gennari SM. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Vet Parasitol*. 2005;134(1-2):73-6.

Tomley FM, Billington KJ, Bumstead JM, Clark JD, Monaghan P. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. *Int J Parasitol*. 2001;31(12):1303-10.

Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 1999;29(8):1195-200.

Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJ. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol.* 2002;109(1-2):147-54.

Trees AJ, Williams DJ. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 2005;21(12):558-61.

Trottein F, Triglia T, Cowman AF. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;74(2):129-41.

Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2003;28(1):1-8.

Tyler JS, Boothroyd JC. The C-terminus of *Toxoplasma* RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001282.

Ueno TE, Goncalves VS, Heinemann MB, Dilli TL, Akimoto BM, de Souza SL, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41(4):547-52.

van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol.* 2011;107 Suppl:S3-15.

van Poppel NF, Welagen J, Duisters RF, Vermeulen AN, Schaap D. Tight control of transcription in *Toxoplasma gondii* using an alternative tet repressor. *Int J Parasitol.* 2006;36(4):443-52.

Vekemans J, Leach A, Cohen J. Development of the RTS,S/AS malaria candidate vaccine. *Vaccine.* 2009;27 Suppl 6:G67-71.

Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;84(2):203-14.

Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M. Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Arzneimittelforschung.* 1998;48(8):870-80.

Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, et al. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology.* 2000;121 (Pt 4):347-58.

Wirtz E, Clayton C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science.* 1995;268(5214):1179-83.

Xia D, Sanderson SJ, Jones AR, Prieto JH, Yates JR, Bromley E, et al. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. *Genome Biol.* 2008;9(7):R116.

Yai LE, Ragozo AM, Canon-Franco WA, Dubey JP, Gennari SM. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Sao Paulo State, Brazil. *J Parasitol.* 2008;94(3):766.

Yamaguchi A, Udagawa T, Sawai T. Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J Biol Chem.* 1990;265(9):4809-13.

Zavala F, Masuda A, Graves PM, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Ubiquity of the repetitive epitope of the CS protein in different isolates of human malaria parasites. *J Immunol.* 1985;135(4):2790-3.

Zhanel GG, Homenuik K, Nichol K, Noreddin A, Vercaigne L, Embil J, et al. The glycylicylines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs.* 2004;64(1):63-88.

Zhang H, Compaore MK, Lee EG, Liao M, Zhang G, Sugimoto C, et al. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;151(2):205-12.

Zhang H, Lee EG, Yu L, Kawano S, Huang P, Liao M, et al. Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. *Parasitol Res.* 2011;109(3):899-911.

Zhou P, Lugovskoy AA, Wagner G. A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins. *J Biomol NMR.* 2001;20(1):11-4.

Zhou XW, Blackman MJ, Howell SA, Carruthers VB. Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(6):565-76.

Zuther E, Johnson JJ, Haselkorn R, McLeod R, Gornicki P. Growth of *Toxoplasma gondii* is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(23):13387-92.