



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas



**Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* com  
potencial para produção de insumos em diagnóstico, profilaxia e  
proteção na neosporose**

**Arlindo Gomes de Macêdo Junior**

Uberlândia - MG  
Setembro de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas



**Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* com  
potencial para produção de insumos em diagnóstico, profilaxia e  
proteção na neosporose**

Tese apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor.

**Arlindo Gomes de Macêdo Junior**

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Uberlândia - MG  
Setembro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M141c Macêdo Junior, Arlindo Gomes de, 1984-  
2013 Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* com potencial  
para produção de insumos em diagnóstico, profilaxia e proteção na  
neosporose / Arlindo Gomes de Macêdo Junior. – 2013.  
97 p. : il.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Parasitologia - Teses. 3. Neosporose - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

***A Deus pela força fornecida para conquistar  
os meus objetivos.***

***Aos meus queridos pais Arlindo e Mirani Macêdo  
pelo amor, cuidado e atenção.***

***A meu irmão Otávio Macêdo pelo seu  
amor e companheirismo.***

***A José Eduardo pelo ombro, amor  
e cumplicidade em todos os momentos.***

***Aos amados amigos que me abraçaram e choraram  
comigo no momento em que foi preciso.***



*O passo a mais que damos a cada caminhada é o que nos coloca mais próximos de tudo que podemos ser. A tentativa além, um pouco mais além de todas as que já fizemos, é a que mais claramente revela do que somos capazes e até onde poderemos chegar.*

*Quantos de nós nos entregamos antes mesmo de tentar, pela simples dificuldade de perceber que é possível ultrapassar o limite do círculo que traçamos em torno de nós e ao longo da vida?*

*Quantas vezes estivemos na iminência de girar a maçaneta da porta que nos levaria da escuridão à claridade e não o fizemos, simplesmente por não aceitar o impulso livre, soberano e intuitivo que conduzia nossas mãos a girar?*

*Quantas vezes hoje você ouviu seu coração?  
Sem temer, sem limitar, sem pré-conceber,*

*prejulgar, sem se prender,  
deixando-se levar pelo prazer de descobrir,  
correr riscos e realizar.*

*Pobre de quem põe a nuvem do medo diante dos olhos, que prefere fugir em vez de dar-se o direito de praticar o sonho. Tem aquele que, sem saber que era possível, foi lá e fez.*

## **Agradecimentos**

A DEUS por me fazer cada dia mais paciente. Por me dar coragem para prosseguir e conquistar os meus objetivos.

A meu orientador Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo e Professores Dr. Jose Roberto Mineo e Dra. Deise A. O. Silva pelos ensinamentos e grande paciência para comigo. Obrigado por todo tempo dedicado ao meu crescimento profissional.

Aos Professores e amigos Dr. Jair Pereira Cunha Junior e Dra. Monica Sopelete, pelas dicas e cumplicidade além dos momentos sérios.

Aos demais professores e companheiros do Laboratório de Imunoparasitologia Dr. Mário Endsfeldz Camargo – UFU, pela amizade, convívio e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amados amigos: Ana Carolina Moraes, André França, Cristina Rostkowska, Eliezer Ramos, Flávia França, Kamilla Paes, Murilo Vieira, Nathany Biela, Pollyanna Vieira, pelo companheirismo, cumplicidade e presença durante momentos alegres e muitas vezes difíceis nesses quatro últimos anos.

A minhas filhas Maya, Brigitte e Sofia por me fazer feliz nos momentos tristes.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Edílge Maria de Gouveia, Zilda Mendonça da Silva Rodrigues e Marley Dantas Barbosa e Ana Claudia Pajuaba pelo apoio na rotina laboratorial.

Aos secretários, Max, Luceleide Damasio e Lucélia Assis, pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido à aquisição de material e reagentes para a execução deste trabalho, em especial a CAPES, pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para realização deste trabalho.

## Lista de Abreviações

- ABTS - 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico)
- AMA1 - *Apical Membrane Antigen 1*
- CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
- CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais
- DAB – Diaminobenzidina
- DO – Densidade Ótica
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EGTA - Ácido Etileno Glicol Tetra-Acético
- ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- GRA – Proteínas do Grânulo Denso
- HEPES - Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)1-Piperazinil]-Etanosulfônico
- HSP70 - Proteína do Choque Térmico 70
- IA – Índice Aidez
- IB – Immunoblotting
- IE – Índice ELISA
- IFAT – Imunofluorescência Indireta
- IFN- $\gamma$  – Interferon Gama
- kDa - KiloDalton
- mAb – Anticorpo Monoclonal
- MIC – Proteínas
- MVP – Membrana do Vacúolo Parasitóforo
- NCDG-1 – Proteína 1 de Granulo Denso de *N. caninum*
- NcESA – Antígeno Secretado-Excretado de *Neospora caninum*
- NLA – Antígeno Solúvel de *Neospora caninum*
- NLA-NcESA - Antígeno Solúvel de *N. caninum* depletado de Antígenos Secretados-Excretados
- PBS - solução salina tamponada com fosfatos
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PDI - Proteína Dissulfeto Isomerase



PIB – Produto Interno Bruto

RI – Limiar de Reatividade (*Reactivity Index*)

RPM – Rotação Por Minutos

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SAG – *Surface Antigen*

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio

Se – Sensibilidade

SFB – Soro Fetal Bovino

Sp – Especificidade

SRS - *SAG1-related sequence*

STAg – Antígeno Solúvel de *Toxoplasma gondii*

STAg-TgESA – Antígeno Solúvel de *T. gondii* depletado de Antígenos

Secretados-Excretados

SUB1 - *Subtilisin-Like Protease 1*

TgESA - Antígeno Secretado-Excretado de *Toxoplasma gondii*

TG-ROC - *Two-Graph Receiver Operating Characteristic*

VP – Vacúolo Parasitóforo

## Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de transmissão da neosporose .....	18
Figura I.1. Avaliação da reatividade específica e cruzada de anticorpos IgG de camundongos por Imunofluorescência Indireta (IFAT).....	34
Figura I.2. Caracterização do padrão de reatividade específica de IgG de camundongos à diferentes frações antigênicas de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> .....	36
Figura I.3. Avaliação do limiar de reatividade para diferentes antígenos por <i>Graph Receiver Operating Characteristic Curve</i> (TG-ROC).....	37
Figura I.4. Caracterização dos níveis de reatividade cruzada por IgG de camundongos infectados experimentalmente para diferentes frações antigênicas de <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> .....	41
Figura I.5. Reconhecimento de antígenos imunodominantes mediante infecções homólogas e heterólogas.....	45
Figura II.1. Cinética de sororeatividade de IgG a <i>Neospora caninum</i> em modelo de infecção experimental.....	60
Figura II.2. Cinética de sororeatividade de IgG1 a <i>Neospora caninum</i> em modelo de infecção experimental.....	62
Figura II.3. Cinética de sororeatividade de IgG2 a <i>Neospora caninum</i> em modelo de infecção experimental.....	63
Figura II.4. Perfil de reatividade sorológica entre IgG1 e IgG2 específico a <i>Neospora caninum</i> em modelo de infecção experimental.....	64
Figura II.5. Maturação da avidéz de IgG em bovinos infectados experimentalmente com <i>N. caninum</i> .....	66
Figura II.6. Cinética de sororeatividade de IgM à <i>Neospora caninum</i> em modelo de infecção experimental.....	68
Figura II.7. Cinética de sororeatividade de IgA à <i>Neospora caninum</i> em modelo de infecção experimental.....	69
Figura II.8. Cinética de proliferação de taquizoitos de <i>Neospora caninum</i> .....	70
Figura II.9. Reconhecimento de Antígenos solúvel de <i>N. caninum</i> (NLA) imunodominantes mediante infecção experimental de bovinos.....	72
Figura II.10. Reconhecimento de Antígenos Total de <i>N. caninum</i> (Nc Total) imunodominantes mediante infecção experimental de bovinos.....	74
Figura II.11. Reconhecimento de Antígenos Secretados-Excretados de <i>N. caninum</i> (NcESA) imunodominantes mediante infecção experimental de bovinos.....	75
Figura II.12. Fluxograma de interpretação dos possíveis marcadores da neosporose bovina.....	76

## Lista de tabelas

Tabela 1. Estudos de caracterização de alvos antigênicos com potencial de diagnóstico da neosporose.....	21
--	----

## Resumo

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e que pode ser encontrado ubiquamente no ambiente. Este parasito possui importância epidemiológica e econômica por causar doenças reprodutivas em rebanhos de ruminantes, principalmente em bovinos, acarretando consideráveis perdas econômicas para o país. A presente tese é composta por dois capítulos referentes ao estudo de caracterização de frações antigênicas provenientes de *N. caninum* em diferentes modelos de infecção experimental. No primeiro capítulo, o perfil da reação cruzada entre *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* foi avaliado em modelo de infecção experimental murino. Nossos resultados indicaram a presença de marcação apical de *N. caninum* como indicativo de reatividade cruzada por reação de imunofluorescência. A reatividade cruzada foi intensa por ELISA para antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg e STAg-TgESA) por soros de animais infectados com *N. caninum*. Já antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA e NLA-NcESA) apresentaram menores índices de reconhecimento heterólogo. Os antígenos excretados-secretados de *N. caninum* (NcESA) compõe a fração antigênica com maior potencialidade de distinção de infecção pelos parasitos, perfil este não observado pelo mesmo extrato antigênico de *T. gondii*. Observamos reatividade cruzada para os antígenos de *N. caninum* com alto peso no NLA (80-110 kDa) e para com bandas acima de 32 kDa e 64 kDa do NLA-NcESA e NcESA, respectivamente. Dessa forma frações antigênicas menores que 32 kDa do NLA e abaixo de 60 de NcESA seriam possíveis candidatos para o diagnósticos da neosporose com significativa diminuição da possibilidade de reatividade cruzada entre os parasitos em questão. No capítulo II, caracterizamos o perfil de reconhecimento antigênico de *N. caninum* em modelo de infecção experimental bovino. Os animais apresentaram sorologia reagente após 15 dias de infecção e predomínio de IgG2/IgG1 específico para NLA no Início da infecção ou após reinfeção. Entretanto, leve predomínio de IgG1 sobre IgG2 específico para NcESA pode ser observado em fase tardia da infecção. Por ELISA, IgM e IgA foram encontradas em diferentes momentos da infecção, não podendo ser associado a fase aguda da neosporose. Índice Avidéz (IA) <50% e IA>70% foram associados com a fase inicial e tardia da infecção, respectivamente. Bandas de 29 e 36 kDa de NLA foram imunodominantes para IgG, IgG1 e IgG2. Distintas bandas desta mesma fração foram reconhecidas por IgG1 e IgG2 (59-60,80 e 110 kDa) e IgA (32 kDa) somente após reinfeção. Já as bandas de 42 e 50 kDa do antígenos total de *N. caninum* foram imunodominantes para IgG, IgG1, IgG2 e IgM durante a infecção, sendo o reconhecimento de 15 e 24 kDa por IgG e 24 e 28 kDa por IgA indicadores de reinfeção da neosporose bovina. Quando avaliado o NcESA, pode ser observado a associação do perfil de marcação, IgG(+) e IgM(-), para as bandas 32 e 36 kDa com fase crônica da infecção e IgG1 para 32 kDa e IgA para 30 e 32 kDa com marcadores de reinfeção. Desta forma, pode ser observado que as associações de diferentes técnicas de diagnóstico com diferentes frações antigênicas podem elucidar o perfil de infecção favorecendo a distinção específica entre fases iniciais, tardias e de reinfeção da neosporose.

**Palavras-chaves:** *Neospora caninum*, Neosporose, Diagnóstico, Reatividade cruzada, *Toxoplasma gondii*

## Abstract

*Neospora caninum*, an obligate intracellular protozoan parasite, belongs to the phylum Apicomplexa and is ubiquitously distributed in the environment. This parasite has epidemiological and economical importance to cause disease in livestock, especially cattle, fostering considerable economic losses for the country. This thesis comprises two chapters involved the characterization study of antigens from *N. caninum* in different models of experimental infection. In the first chapter, the profile of cross-reactivity between *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* was evaluated in an experimental infections in a mouse model. Our results indicated the presence of apical recognition of *N. caninum* as indicative of cross-reactivity by immunofluorescence. Animals infected with *N. caninum* showed high cross-reactivity for soluble antigens of *T. gondii* (STAg and STAg-TgESA) by ELISA. On the other hand, soluble antigens of *N. caninum* (NLA and NLA-NcESA) showed less heterologous recognition. The secreted-excreted antigens (NcESA) comprise the antigenic fraction with the highest potential to distinguish infection by the parasites, profile that is not observed in the same antigenic extract of *T. gondii*. We observed cross-reactivity to *N. caninum* in fractions of NLA with high molecular weight (80-110 kDa) and bands above 32 kDa and 64 kDa for NLA-NcESA and NcESA, respectively. Thus, antigenic fractions smaller than 32 kDa of the NLA and 60 kDa to NcESA are possible candidates for the diagnosis of neosporosis with a significant decrease of the possibility of cross-reactivity between the parasite in question. In Chapter II, we characterized the profile of antigen recognition of *N. caninum* in bovine experimental infection. The animals were seropositive after 15 days of infection and occurred prevalence of specific IgG2/IgG1 to NLA in begin of infection and after reinfection. However, a slight predominance of IgG1 over IgG2 anti-NcESA was observed in the late phase. IgM and IgA were found to be produced at different times of infection, which could not be associated with the acute phase of neosporosis. Avidex Index (AI) <50% and AI>70% were associated with early and late phases of infection, respectively. Bands of 29 and 36 kDa of NLA were immunodominant to IgG antibodies and its subclasses (IgG1 and IgG2). Distinct bands of this same fraction were recognized by IgG1 and IgG2 (59-60, 80 and 110 kDa) and IgA (32 kD) after reinfection. However, bands of 42 and 50 kDa in total antigens of *N. caninum* were immunodominant for IgG (Total, IgG1, IgG2) and IgM antibodies during infection, with the recognition of 15 and 24 kDa for IgG and 24 and 28 kDa for IgA as indicators for reinfection in bovine neosporosis. When NcESA was measured, we observed IgG(+) and IgM(-) toward antigens of 32 and 36 kDa with profile association with the chronic infection and 32 kDa recognized by IgG1 and 30 and 32 kDa by IgA as reinfection markers. Thus, the associations of different diagnostic techniques with different antigenic fractions may elucidate the profile of infection with *N. caninum* favoring specific distinction between the early stages, late and of reinfection in neosporosis.

**Keywords:** *Neospora caninum*, Neosporose, Diagnostic, Cross-reactivity, *Toxoplasma gondii*

## Sumário

1. Introdução .....	14
1.1. Parasito .....	14
1.2. Hospedeiros intermediários e definitivos .....	14
1.3. Ciclo Biológico de <i>Neospora caninum</i> .....	15
1.4. Importância Epidemiológica.....	19
1.5. Diagnóstico .....	20
2. Objetivo Geral .....	23
CAPÍTULO I .....	24
I.1. Justificativa .....	25
I.2. Objetivos específicos.....	27
I.3. Material e Métodos .....	28
I.3.1. Animais e amostras .....	28
I.3.2. Parasitos e cultivo celular .....	28
I.3.3. Frações antigênicas.....	29
I.3.4. Imunofluorescência indireta (IFAT) .....	30
I.3.5. <i>Ensaio Imunoenzimático indireto</i> .....	31
I.3.6. Análise do limiar de reatividade dos ensaios imunoenzimáticos ...	32
I.3.7. <i>Immunoblot</i> .....	32
I.5. Discussão .....	46
CAPÍTULO II .....	49
II.1. Justificativa .....	50
II.2. Objetivos específicos.....	52
II.3. Material e Métodos .....	53
II.3.1. Animais .....	53
II.3.2. Manutenção e obtenção de parasitos.....	53

II.3.3. Preparação de antígenos de <i>N. caninum</i> .....	54
II.3.3.1. Antígeno total de <i>N. caninum</i> .....	54
II.3.3.2. Antígeno solúvel de <i>N. caninum</i> (NLA) .....	54
II.3.3.3 Antígenos secretado-excretado de <i>N. caninum</i> (NcESA).....	55
II.3.4. <i>Ensaio Imunoenzimático indireto</i> para IgG anti- <i>N. caninum</i> .....	55
II.3.5. ELISA avidéz para IgG anti- <i>N. caninum</i> .....	56
II.3.6. Avaliação de Parasitismo .....	56
II.3.7. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE).....	57
II.3.8. <i>Immunoblot</i> .....	57
II.4. Resultados.....	59
II.5. Discussão .....	76
3. Discussão Geral.....	81
4. Conclusão .....	84
4.1. Capítulo I:.....	84
4.2. Capítulo II: .....	85
4.3. Conclusão Geral .....	86
Referências Bibliográficas .....	87

## 1. Introdução

### 1.1. Parasito

*Neospora caninum* é um parasito protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, família Sarcocystidae, que pode ser encontrado ubiquamente no ambiente (DUBEY e LINDSAY, 2006; TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000).

*N. caninum* teve seu primeiro relato em 1984 na Noruega a partir da observação de cães com desordens neurológicas e sorologia negativa para *Toxoplasma gondii* (BJËRKAS, MOHN e PRESTHUS, 1984). Contudo, somente no final da década de 80, DUBEY et al., 1988, em estudos com cães com quadro clínico sugestivo de toxoplasmose, foi observado características básicas que o diferenciava da infecção causada por *T. gondii*, entre eles: paralisia predominante dos membros posteriores, não observado em animais diagnosticados por toxoplasmose; cistos teciduais com paredes espessas (1-4  $\mu\text{m}$ ) e restritos a tecidos neurais, além de testes sorológicos negativos para *T. gondii*.

### 1.2. Hospedeiros intermediários e definitivos

*N. caninum* foi descrito na década de 80 como responsável por doenças neuromusculares em filhotes caninos infectados de forma transplacentária, mas somente em 1998 determinou-se que o hospedeiro definitivo seria o cão a partir do isolamento de oocistos nas fezes de animal alimentado com cistos teciduais de camundongos experimentalmente infectados com *N. caninum* (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY, DUBEY e DUNCAN, 1999). Mais recentemente coiotes (*Canis latrans*) foram considerados como um hospedeiro definitivo adicional de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004; DUBEY et al., 2009). Posteriormente observou-se após infecção experimental que canídeos selvagens australianos (*Canis lupus dingo*) também podem ser considerados como hospedeiros definitivos do *N. caninum* (KING et al., 2010), sendo possível que outros canídeos silvestres possam exercer o papel de hospedeiros definitivos para este parasito.



Além de *N. caninum* ocasionar doença clínica importante em bovinos e cães, infecções naturais em carneiros, cabras, veados e cavalos já foram demonstradas por isolamento primário do parasito (DUBEY, 2003). Adicionalmente, sorologia positiva também foi verificada em distintas espécies de animais silvestres (raposas, coiotes, lobos, alpacas e camelos) (DUBEY, 2003). Outros possíveis hospedeiros intermediários de *N. caninum* são os humanos, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico. Embora não haja relatos comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos, evidências sorológicas de exposição ao parasito foram relatadas em diferentes estudos (NAM, KANG e CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006).

### **1.3. Ciclo Biológico de *Neospora caninum***

*N. caninum* apresenta um ciclo de vida heterógeno (LINDSAY, DUBEY e DUNCAN, 1999). A fase assexuada do ciclo de vida do *N. caninum* ocorre em uma ampla faixa de hospedeiros intermediários herbívoros ou onívoros (mamíferos domésticos e silvestres), enquanto a fase sexuada é limitada aos hospedeiros definitivos canídeos (GONDIM et al., 2004). Embora os estágios sexuados ainda não tenham sido completamente descritos, o ciclo parece ser muito similar ao de *T. gondii* envolvendo as mesmas formas infecciosas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos).

Nos hospedeiros infectados, taquizoítos invadem as células nucleadas e multiplicam-se rapidamente por endodiogenia dentro de vacúolos parasitóforos (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). A invasão celular ocorre inicialmente através da adesão do parasito à célula hospedeira e extrusão do conóide seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP). Proteínas de roptrias são liberadas dentro do VP e estendem a membrana do VP (MVP) para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP. Proteínas de grânulos densos modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do VP com a formação de uma

rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento do parasito (BUXTON, MCALLISTER e DUBEY, 2002).

A multiplicação sucessiva dentro do VP leva a formação de pseudocistos que se rompem liberando taquizoítos que disseminam para diferentes tecidos, como o ocular, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e cardíacos (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). Essa multiplicação parasitária ocasiona extensa lesão tecidual, favorecendo o recrutamento de células do sistema imune e formação de forte resposta inflamatória. A pressão imunológica gerada por células do hospedeiro direciona assim a transformação da forma taquizoíto à bradizoíto e o início da outra fase do desenvolvimento assexuado (INNES, 2007). Nesta, bradizoítos se multiplicam formando os cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais e musculares, persistindo por toda a vida do hospedeiro (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

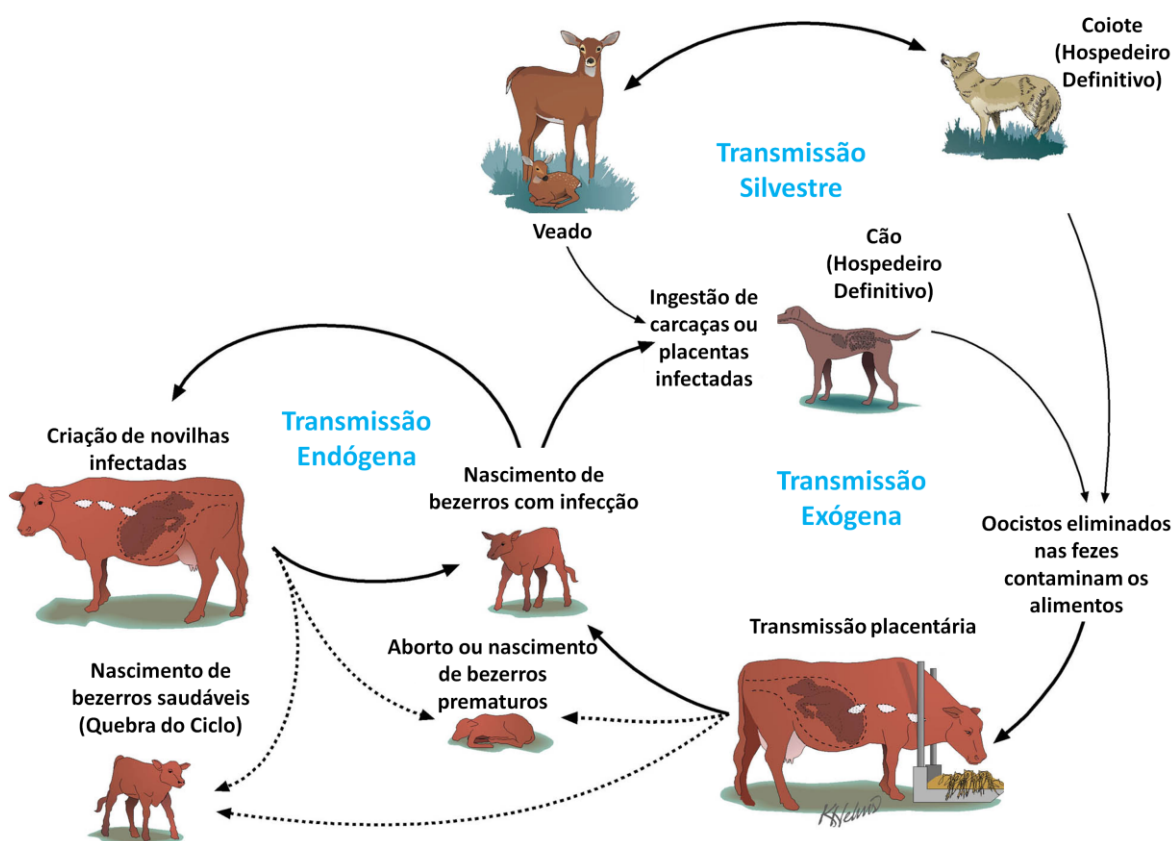
Semelhante ao contato com *T. gondii*, hospedeiros definitivos entram em contato com os cistos através da ingestão destes nos tecidos dos hospedeiros intermediários. Após a ingestão, a parede cística é digerida por enzimas proteolíticas, liberando bradizoítos que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento da fase assexuada (esquizogonia) com formação de esquizontes e liberação de merozoítos, os quais iniciam a fase sexuada (gamogonia) com a produção final de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos) que são eliminados com as fezes. Nos oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo para o ambiente, sob condições ótimas de pH, temperatura e umidade, a esporulação ocorre entre um e cinco dias, tornando-o potencialmente infecciosos. Estes podem permanecer viáveis no solo por longos períodos até serem ingeridos por outros hospedeiros (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

*N. caninum* pode ser transmitido da mãe para o feto via placenta, podendo ser caracterizada por infecção transplacentária endógena, onde o feto pode ser infectado como resultado de reativação de infecção materna pré-natal ou infecção transplacentária exógena, na qual a transmissão fetal ocorre como resultado de infecção materna durante a gestação (WILLIAMS et al., 2009) (Figura 1). A transmissão vertical da neosporose tem sido demonstrada em vários hospedeiros

(bovinos, carneiros, cabras, cães, gatos, camundongos, macacos e porcos), sendo considerado o principal modo de transmissão em bovinos (DUBEY, 2003).

Nos bovinos, *N. caninum* causa aborto tanto em gado de corte como de leite, a partir do terceiro mês até o final da gestação, sendo mais comum entre o quinto e sexto mês de gestação (DUBEY e LINDSAY, 2006). Entre os eventos comumente presentes na neosporose bovina, estão presente morte, reabsorção, mumificação ou autólise fetal dentro do útero e recém-nascidos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados. Sinais clínicos são mais frequentes em animais jovens e predominantemente neurológicos, como ataxia, paralisia de membros posteriores (hiperextensão rígida), reflexos patelares diminuídos e perda de consciência. Em animais adultos, o aborto é o único sinal clínico observado, podendo ser esporádico, endêmico ou epidêmico (DUBEY, 2003).

A neosporose canina ocorre geralmente como uma infecção subclínica persistente que pode sofrer reativação durante a gestação, resultando em parasitemia materna e transmissão transplacentária do parasito para o feto (BUXTON, MCALLISTER e DUBEY, 2002). Entretanto, podem ser encontrados alguns sinais clínicos como hiperextensão rígidas dos membros posteriores, dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, atrofia muscular, paralisia dos nervos faciais, falência cardíaca (DUBEY, 2003), e o envolvimento da pele causando a neosporose cutânea com intenso número de taquizoítos nas lesões cutâneas, sugerindo uma falta de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002).



**Figura 1. Ciclo de transmissão da neosporose** (adaptado de Milton M. McAllister: <http://vetmed.illinois.edu/faculty/path/images/Neosporalifecycle2007.jpg>).

#### 1.4. Importância Epidemiológica

*N. caninum* vêm sendo extensivamente estudados nos últimos anos, por causar doença numa gama de rebanhos e estar associado com desordens reprodutivas, principalmente em bovinos, com consideráveis perdas para o balanço positivo das finanças nacionais (INNES et al., 2002; DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

Estudos realizados com objetivo de determinar a sororeatividade para *N. caninum* e *T. gondii* em amostras de soros de ovinos e caprinos em diferentes regiões do Brasil demonstraram elevados índices de sororeatividade, entretanto esses valores são dependentes do tipo de teste imunoenzimático adotado para análise e do local epidemiológico analisado (MORAES et al., 2011; ROSSI et al., 2011).

Apesar de não haverem estudos que indicam as perdas globais ou nacionais, trabalhos isolados estimam que o custo da neosporose deva ser enorme. Em trabalho recente, as perdas econômicas globais induzidas pela infecção foram estimadas em vários bilhões de dólares por ano (REICHEL et al., 2013). Adicionalmente, estima-se que o parasito é capaz de infectar os fetos em 95% das gestações em que as vacas eram previamente positivas para *N. caninum* (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). Além disso, um dos grandes desafios para o controle da infecção por *N. caninum* é que se trata de uma infecção perene, ou seja, onde não ocorre cura após resolução da fase aguda, com possibilidade de haver reagudização da infecção durante a vida dos animais por motivos diversos.

Apesar de estudos revelarem aspectos importantes no ciclo de vida, patologia, soropidemiologia e vacinação relacionados com *N. caninum*, ainda existe escassez de informação sobre a interação deste parasito com o hospedeiro envolvendo proteínas de superfície, citoplasmáticas, de micronemas, grânulos densos e roptrias. Estudos adicionais na pesquisa de alvos para diagnóstico, prevenção e controle da neosporose tornam-se necessários na criação de insumos para intervenção em danos econômicos e proteção de rebanhos.

### 1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado laboratorialmente por detecção direta do protozoário em amostras biológica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), isolamento parasitário e imuno-histoquímica ou por detecção indireta através da utilização da sorologia, onde anticorpos específicos contra proteínas dos protozoários são encontrados em técnicas de imunoensaios como ELISA, *Immunoblot* e Imunofluorescência indireta (IFAT).

Entretanto apesar dos testes indiretos serem amplamente utilizados, a detecção de diferentes subtipos de anticorpos somente indica o contato prévio com o parasito. Dessa forma, estudos que visem a obtenção de marcadores sorológicos que determinem com fidelidade a presença do parasito e/ou fase da doença se tornam imprescindíveis. Estudos com utilização de proteínas, frações antigênicas ou taquizoítos de *N. caninum* no qual foram avaliadas o perfil de reatividade cruzada com outros parasitos podem ser encontrados na Tabela 1.

**Tabela 1. Estudos de caracterização de alvos antigênicos com potencial de diagnóstico da neosporose.**

Proteína	PW (kDa)	Estrutura	Reação cruzada	Técnica	Espécie	Referência
<b>AMA1</b>	57 e 69	Nativa	<i>T. gondii</i> (+)	IB e Cultura <i>in vitro</i>	Camundongos	ZHANG et al., 2007
<b>Antígeno Total</b>	-	Antígenos Solúvel	<i>T. gondii</i> (-)	IB	Bovinos	STAUBLI et al., 2006
<b>MIC10</b>	24	Nativa	<i>T. gondii</i> (-)	ELISA de Captura	Caprinos	YIN et al., 2012
<b>Nc-p17</b>	17	Nativa	NA	IB e ELISA	Bovinos	GARCÍA et al., 2006
<b>Nc-p29</b>	29	Recombinante	<i>T. gondii</i> (-) <i>S. cruzi</i> (-)	ELISA	Bovinos	HOWE et al., 2002
<b>Nc-p29 (NcSAG1)</b>	29	Nativa	<i>T. gondii</i> (-) <i>S. neurona</i> (-)	IB	Camundongos	HOWE et al., 1998
<b>Nc-P35 (NcSRS2)</b>	35	Nativa	<i>T. gondii</i> (-) <i>S. neurona</i> (-)	IB	Camundongos	HOWE et al., 1998
<b>Ncp38</b>	38	Nativa	<i>T. gondii</i> (-) <i>L. infantum</i> (-)	ELISA Indireto	Caninos	HOSSEININEJAD et al., 2010
<b>Nc-p40</b>	40	Recombinante	<i>T. gondii</i> (-)	IB	Camundongo	HE et al., 2013
<b>Nc-p43</b>	43	Extrato	<i>T. gondii</i> (+)	IB	Humanos	NAN, KANG E CHOI, 1998
<b>Nc-p43</b>	43	Recombinante	<i>T. gondii</i> (-)	IB e IFAT	Camundongos	HEMPHILL et al., 1997
<b>NcSUB1</b>	68	Recombinante	<i>T. gondii</i> (-)	ELISA	Camundongos	YBAÑEZ et al., 2013
<b>Parasito</b>	-	Taquizoítos formalizado	<i>T. gondii</i> (-) <i>S. cruzi</i> (-) <i>Eimeria</i> spp. (-) <i>C. parvum</i> (-) <i>B. divergens</i> (-)	ELISA	Bovinos	WILLIAMS et al., 1997

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay IB: *Immunoblotting*; IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Test;

NA: não avaliado

(-) Ausência de reatividade Cruzada

(+) Presença de reatividade Cruzada

A presente tese foi dividida em dois capítulos envolvendo a caracterização proteica de antígenos provenientes de *Neospora caninum* em diferentes modelos de infecção experimental:

I – Avaliação do perfil de reação cruzada entre *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em modelo de infecção experimental murino.

II – Caracterização do perfil de reconhecimento antigênico de *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental bovino.



## 2. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de antígenos provenientes de diferentes frações de *Neospora caninum* e cinética de produção de anticorpos através da utilização de modelos murino e bovino de infecção experimental com potencial para produção de insumos em diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose.

## CAPÍTULO I

**Avaliação do perfil de reação cruzada entre *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em modelo de infecção experimental murino.**

## I.1. Justificativa

Estudos epidemiológicos têm sido amplamente realizados para caracterização de soroprevalência da toxoplasmose e/ou neosporose em diferentes espécies de animais (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; COSTA et al., 2001; INNES et al., 2001; ALBUQUERQUE et al., 2005; KLUN et al., 2006; NEMATOLLAHI e MOGHDDAN, 2008; PINHEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2010; MORENO et al., 2012; FAJARDO et al., 2013). No entanto, alguns estudos não consideram a reatividade cruzada presente entre os protozoários ou raramente comentam sobre o possível coinfeção na população estudada, o que pode ocasionar em erros de escolha do tratamento ou na execução errônea de medidas profiláticas.

O diagnóstico laboratorial da neosporose e toxoplasmose são classicamente realizados por meio do teste de imunofluorescência indireto que, apesar de ser utilizado como um teste de referência apresenta muitas limitações, como, por exemplo, o fato de ser um ensaio artesanal não passível de ser realizado com um número elevado de amostras e dependente da interpretação muitas vezes subjetiva do observador (CONRAD et al,1993; PARÉ et al,1995; SASAI et al,1998).

Para a análise de um número elevado de amostras, o teste imunoenzimático usualmente empregado é o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que se apresenta como uma alternativa economicamente viável, sendo passível de ser automatizado e de execução relativamente rápida. No entanto, os critérios utilizados na interpretação dos resultados constituem sua maior limitação e os limiares de reatividade são extremamente variáveis em diferentes estudos soropidemiológicos e clínicos (LASRI et al., 2004). Além disso, há a possibilidade de obtenção de valores de absorbância muito elevados, devido a presença de anticorpos de reatividade cruzada que são sintetizados contra parasitos filogeneticamente relacionados (BJORKMAN et al., 1997).

Os estudos revelam a existência de reatividade cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* com a utilização de técnicas como *immunoblotting*, ELISA, testes de imunohistoquímica e imunofluorescência (GANLEY e COMSTOCK, 1989; NAN, KANG e CHOI, 1998; SASAI et al., 1998; ZHANG et al., 2007; LIAO et al., 2005).

Diante desse problema, estudos envolvendo a proteômica dos parasitos têm sido elaborados para a caracterização proteica e consequente entendimento da interação parasito-hospedeiro, com a intenção de se produzir insumos para protocolos vacinais e de diagnóstico (LI et al., 2004; BELLI et al., 2005; LEE et al., 2005; WASTLING et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Por *immunoblot*, pesquisadores revelaram que de 42 spots de proteínas reativo a soro de *N. caninum*, 18 apresentaram reatividade cruzada com *T. gondii* e que dos 31 spots proteicos reconhecidos com soros de *T. gondii*, 19 apresentaram reatividade cruzada com *N. caninum* (ZHANG et al., 2011). Proteínas como a Proteína do Choque Térmico 70 (HSP70), tubulina, actina e enolase foram consideradas proteínas conservadas entre esses dois parasitos (ZHANG et al., 2011). Por outro lado as proteínas *NcSUB1*, *NcGRA2* e *NcGRA7* foram considerados como espécie-específicas para *N. caninum* (LEE et al., 2005). Apesar de tais relatos esparsos, ainda não foram caracterizadas as frações antigênicas de ambos os parasitos que conferem maior grau de especificidade.

Neste contexto, faz-se necessária a caracterização comparativa das frações antigênicas de *N. caninum* e *T. gondii* com potencial de produzir subsídios necessários para o estabelecimento de insumos a serem utilizados em métodos laboratoriais que sejam capazes de diagnosticar tanto a neosporose como a toxoplasmose com altos índices de valores preditivos positivo e negativo, bem como sua utilização em medidas de profilaxia e controle da infecção vertical por estes parasitos.

## I.2. Objetivos específicos

O capítulo I desse trabalho teve como objetivos específicos:

- Observar o perfil de reatividade cruzada entre soro de camundongos infectados com *N. caninum* ou *T. gondii* por Imunofluorescência Indireta (IFAT);
- Avaliar o limiar de reatividade em ensaio imunoenzimático para diferentes frações antigênicas compostas por antígenos solúveis, secretados/excretados e de superfície de ambos os parasitos;
- Caracterizar o perfil de reatividade cruzada durante a infecção murina com *N. caninum* ou *T. gondii* frente às diferentes frações antigênicas obtidas de ambos os parasitos;
- Determinar frações proteicas por *immunoblot* que representem os principais determinantes de reatividade cruzada em diferentes imunoenaios realizados nas rotinas de diagnóstico laboratoriais da neosporose e toxoplasmose em diferentes hospedeiros.

### **I.3. Material e Métodos**

#### **I.3.1. Animais e amostras**

Para obtenção de soro murino, camundongos BALB/c de seis a oito semanas de idade, com peso aproximado de 18 a 22 gramas, foram obtidos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia e mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 24°C) e com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos seguindo as normas recomendadas e após aprovação pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo No. 52/2012). Grupos compostos por 10 camundongos cada foram infectados com  $1.10^6$  taquizoítos de *N. caninum* ou 10 cistos de *T. gondii* (Me-49) por via intraperitoneal. Para avaliação da presença de anticorpos específicos durante a infecção, amostras de sangue foram coletadas por via orbital com 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a infecção. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas (2000 rpm, 10 minutos) e o soro coletado e armazenado a -20 °C até a sua utilização nos ensaios sorológicos.

#### **I.3.2. Parasitos e cultivo celular**

Parasitos do isolado Nc-1 (DUBEY et al., 1988) de *N. caninum* foram mantidos em cultura celular utilizando linhagem HeLa (ATCC No. CCL-2). As células foram cultivadas em frascos com área de 25 cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C até atingirem a confluência. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítos de Nc-1 ( $5 \times 10^5$  taquizoítos/frasco de 25 cm<sup>2</sup>) e mantidas por passagens seriadas em meio RPMI sem adição de SFB, em intervalos de 48 a 72 horas. Parasitos extracelulares presentes no meio de cultura foram coletado e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 25x7 mm e centrifugação rápida (45 x g, 1

minuto, 4 °C) para remoção de restos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado (720 x g, 10 minutos, 4 °C) para a obtenção dos parasitos com o objetivo de utilização de infecção parasitária ou preparação de antígenos.

Taquizoítos de *T. gondii* (RH) foram mantidos em camundongos BALB/c por passagem intraperitoneal seriada com intervalos regulares de 48 horas (MINEO et al., 1980). Após esse período o exsudato peritoneal dos camundongos foram colhidos em solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2) e lavados duas vezes em PBS (720 x g, 10 minutos, 4 °C). Após o processo de lavagem os taquizoítos foram utilizados para a produção de antígenos.

Taquizoítos de *T. gondii* (ME49) foram mantidos em camundongos BALB/c através de infecção intraperitoneal com 10 cistos de *T. gondii* (ME49) em intervalos regulares de 30 dias. Após esse período de infecção, os cérebros dos animais foram coletados e macerados com PBS estéril para formação de solução homogênea. A contagem dos cistos foi realizada em microscópio com 20 µl de homogenato em lâmina/lamínula. Os cistos obtidos foram utilizados para a realização de infecção experimental.

### **I.3.3. Frações antigênicas**

Antígenos solúveis de *N. caninum* e *T. gondii* foram preparados como descrito por Silva et al., 2005. Taquizoítos em suspensão foram tratados com coquetel de inibidores de protease (Roche) e submetidos a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, seguido por ciclos (30 segundos *on*; 20 segundos *off*, 12 W, 30 kHz e amplitude de 90%) de ultra-som durante 5 minutos em banho de gelo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), os sobrenadantes coletados e concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA) e *T. gondii* (STAg) foram armazenados a -20°C até sua utilização em imunoenaios.

Os antígenos secretados/excretados dos protozoários em estudo foram obtidos *in vitro*. Células Hela foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (Nc-1) ou *T. gondii* (RH) e mantidas em meio RPMI sem adição de SFB. Após 72 horas de

infecção o sobrenadante de cultura contendo as proteínas secretadas/excretadas do parasito foi coletado, filtrado em membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  (filtros Millex, Millipore) e concentrado com sacarose. As concentrações proteicas dos antígenos foram determinadas pelo método de Bradford e alíquotas de antígenos secretados/excretados de *N. caninum* (NcESA) ou *T. gondii* (TgESA) foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas nos imunoenaios.

Para preparação dos antígenos solúveis, NLA ou STAg, depletados de proteínas secretadas-excretadas (NLA-NcESA ou STAg-TgESA), taquizoítos provenientes de cultura celular foram lavados duas vezes em PBS (720 x g, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e novamente suspensos em solução salina de Hanks.  $1.10^8$  taquizoítos para cada mL de solução foram incubados durante 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em agitação suave. Em seguida, os parasitos foram então coletados e lavada duas vezes em PBS (720 x g, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, o pellet formado foi processado conforme descrito para obtenção do NLA e STAg, citado anteriormente. Todas as frações proteicas obtidas tiveram sua concentração determinadas e foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem utilizados nos imunoenaios.

#### **I.3.4. Imunofluorescência indireta (IFAT)**

IFATs foram realizados para detecção de anticorpos IgG para *T. gondii* e *N. caninum*, conforme descrito por Mineo et al., 2001. Brevemente, lâminas contendo taquizoítos formalizados foram incubadas com soro de camundongo diluído em PBS (1:25). Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (IgG de coelho anti IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC), diluído em PBS (1:50), suplementado com 0,01% de Azul de Evans para contra-coloração. Soros controle positivo e negativo para ambos os parasitas foram incluídos em cada lâmina. As imagens foram analisadas por microscópio confocal (Zeiss LSM 510 Meta).



### **1.3.5. Ensaio Imunoenzimático indireto**

Os protocolos de ELISA indireto utilizados para detecção de anticorpos IgG específicos a frações antigênicas provenientes de *T. gondii* e *N. caninum* foram realizados de acordo com Silva et al., 2007, com algumas modificações. A reação foi efetuada em placas de microtitulação de alta afinidade (Costar 3590, Corning) sensibilizadas com diferentes antígenos de *T. gondii* e *N. caninum* (10 µg/mL) em tampão carbonato/bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4 °C. A sensibilização para detecção de anticorpos específicos para antígenos de superfície foi efetuada conforme Marcolino et al., 2000, com algumas modificações. Taquizoítos de *T. gondii* (RH) ou *N. caninum* (Nc-1) foram suspensos em PBS suplementado com 1% de gelatina (Benkton Dikson) (2.10<sup>6</sup> taquizoítos/ml) e utilizados para sensibilização em Placas de microtitulo de alta afinidade (Costar 3590, Corning) por 18 h a 37 °C. Após o processo de sensibilização para os antígenos solúveis e de superfície, os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 5 % de leite desnatado (PBS-TM) por uma hora a temperatura ambiente. Cada placa foi incubada com soros em diluições distintas, mediante padronização prévia, onde soros murinos (1:25) foram diluídos em PBS-TM a 5% e incubados a 37 °C por uma hora. Subsequentemente, à placa foi adicionado anticorpos secundário IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:1000, Sigma) em PBS-TM a 1%. A reação foi desenvolvida através da adição do substrato da enzima (0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,01M 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS; KPL) e a leitura da densidade óptica foi obtida a 405 nm, em leitor de placas (*SpectraMax M2e, Molecular Devices*).

Dois soros positivos e três soros negativos obtidos a partir animais sabidamente infectados ou não com *T. gondii* ou *N. caninum* foram incluídos em cada placa de ELISA como controle da reação. O *cut off* das reações foram calculados a partir da média da Densidade Óptica (DO) para os soros controle negativo acrescido de três desvios-padrão. Os títulos de anticorpo foram expressos em Índice ELISA (IE), como descrito por Silva et al., 2002 (IE = DO amostra / DO *cut off* ).

### **I.3.6. Análise do limiar de reatividade dos ensaios imunoenzimáticos**

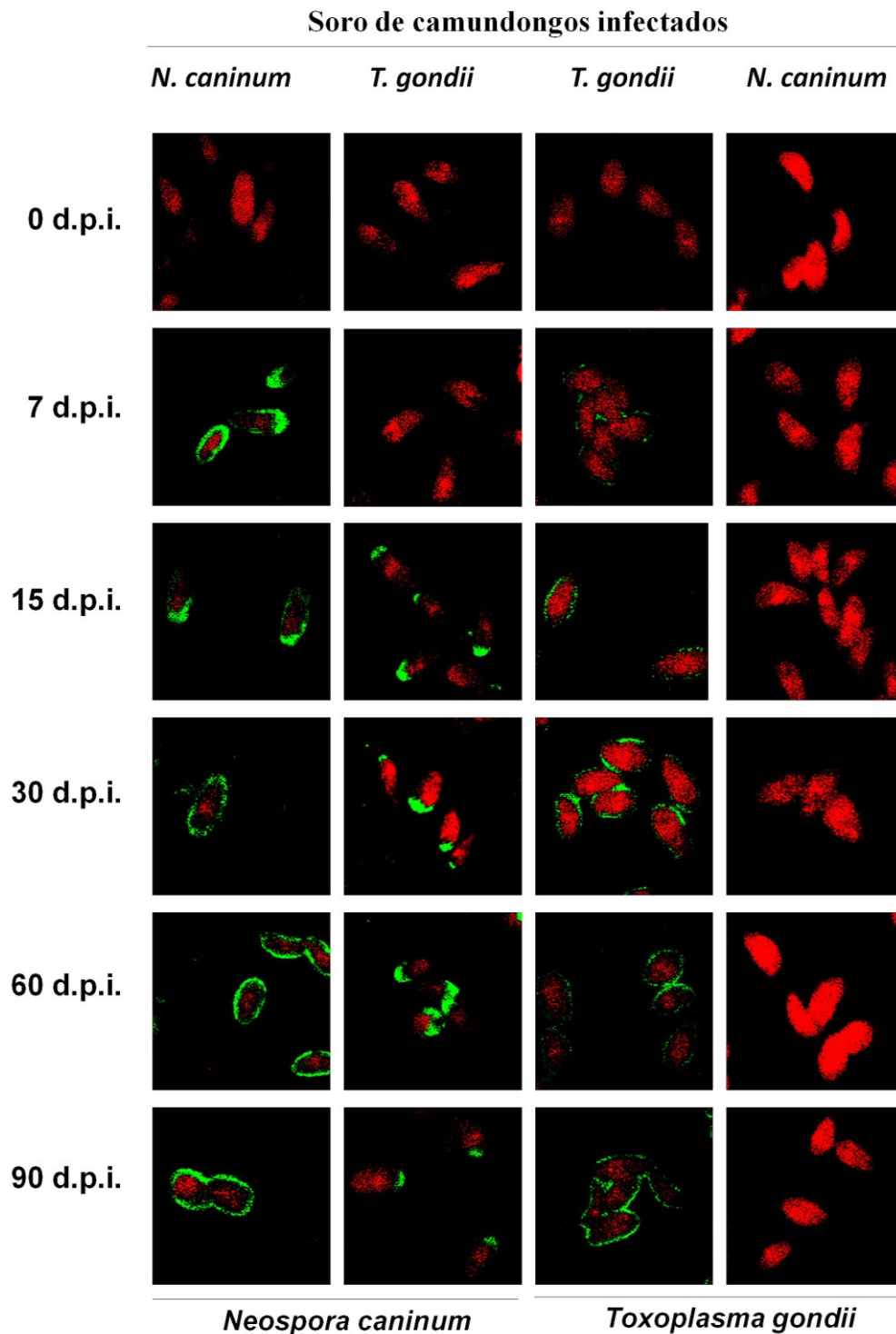
O limiar de reatividade (*Reactivity Index* - RI) para real distinção entre amostras de soro positivas e negativas por ELISA foi obtido através do cálculo da sensibilidade (Se) e especificidade (SP) relativa. Para isso utilizou-se análise pelo método *Two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC), onde o ponto de intersecção entre a curva de Se e Sp equivale o valor no qual RI apresenta o máximo de sensibilidade e especificidade que podem ser alcançados. Assim, as curvas TG-ROC foram construídas objetivando discriminar entre os soros de animais sorologicamente positivos e negativos. A análise TG-ROC foi realizada utilizando o software 5.0 GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Todos os resultados são representativos de três experimentos independentes.

### **I.3.7. Immunoblot**

Ensaio de *immunoblot* (IB) foram realizados para verificar a reatividade cruzada entre *T. gondii* e *N. caninum* em amostras de soro de camundongos infectados experimentalmente, como descrito anteriormente por Silva et al., 2007. Resumidamente, frações antigênicas de *N. caninum* e *T. gondii* (150 µg) foram adicionadas em tampão de amostra com dodecilsulfato de sódio 4% (SDS) em e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) sob condições não redutoras (LAEMMLI, 1970). As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979) e, em seguida, bloqueadas com PBS-TM 5% durante 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com soros de camundongos (1:100) em PBS-TM 1% e posteriormente com anticorpos secundários (IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase; 1:1000; Sigma) em PBS-TM a 1% por uma hora a 37 °C. Após novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada por meio da adição de substrato enzimático e cromógeno (DAB (3,3'-diaminobenzidina; Invitrogen).

#### I.4. Resultados

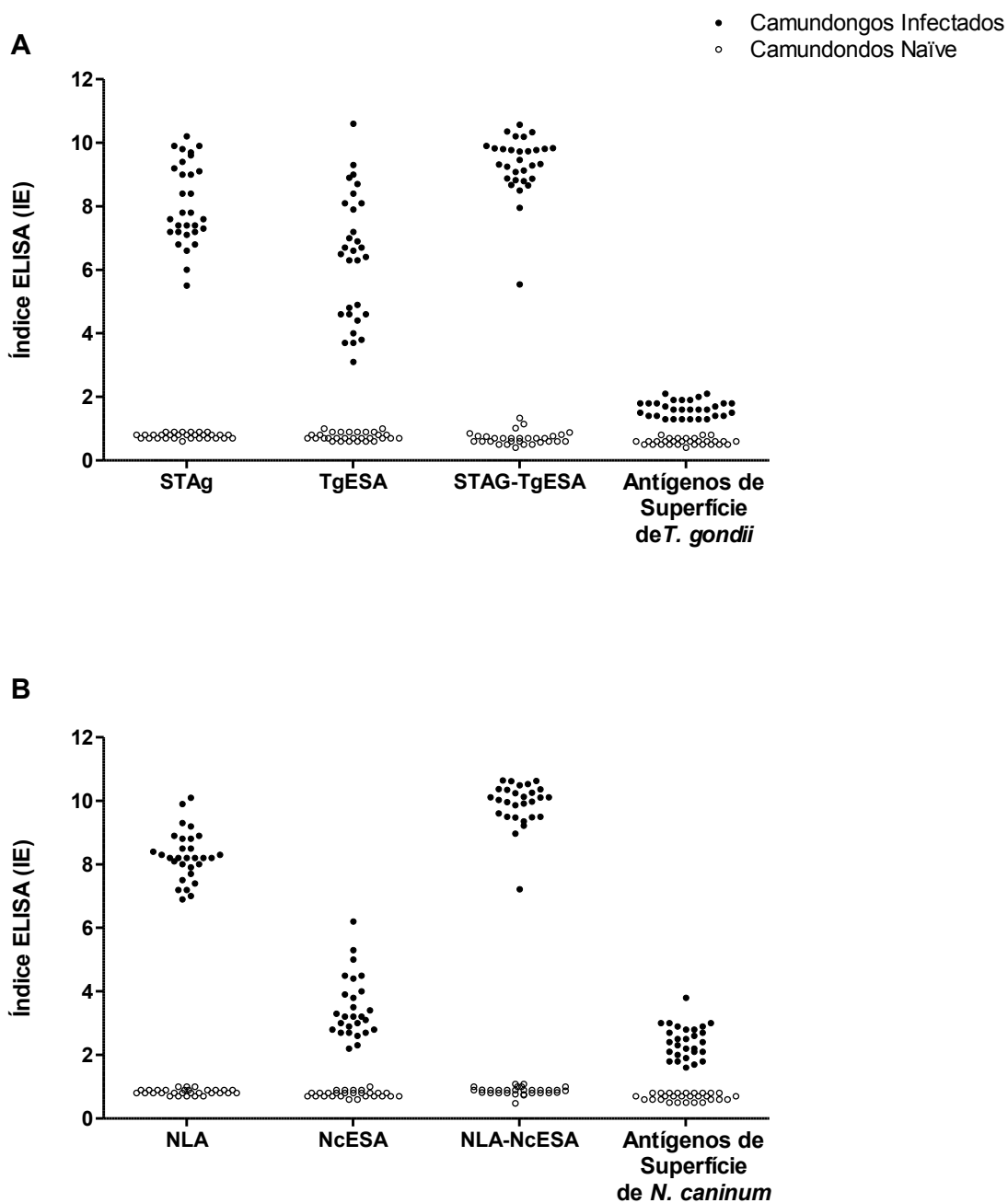
Considerando o IFAT como um dos métodos de escolha mais frequente para o diagnóstico laboratorial da neosporose e toxoplasmose, realizamos o ensaio de imunofluorescência com soros de camundongos infectados experimentalmente por *T. gondii* ou *N. caninum* com o objetivo de visualizar o padrão de reatividade de anticorpos IgG nos diferentes compartimentos dos protozoários em questão. Nós observamos o reconhecimento específico de antígenos de superfície desde sete dias pós-infecção. Adicionalmente, avaliamos a possibilidade da presença de reatividade cruzada entre os antígenos de superfície dos dois protozoários correlatos, e observamos que os soros de camundongos infectados com *T. gondii* reconheceram antígenos de superfície de *N. caninum*, sendo encontrada uma marcação da porção apical de taquizoítos de *N. caninum* em soros de animais infectados com *T. gondii* a partir de 15 dias após a infecção. Em contrapartida, não foram encontradas marcações em taquizoítos de *T. gondii* na presença soros de camundongos infectados com *N. caninum* (Figura I.1).



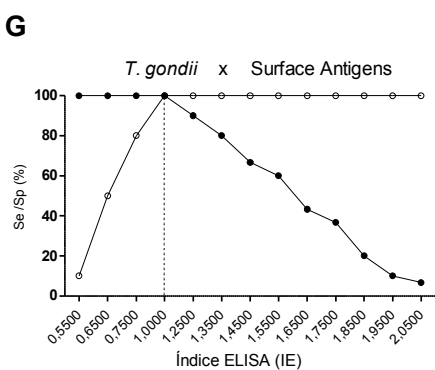
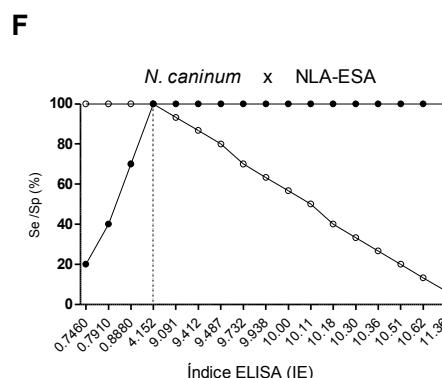
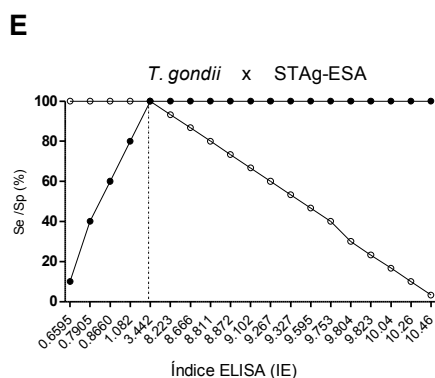
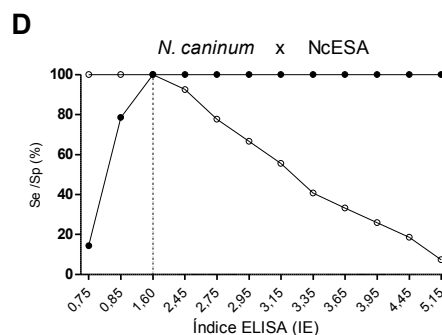
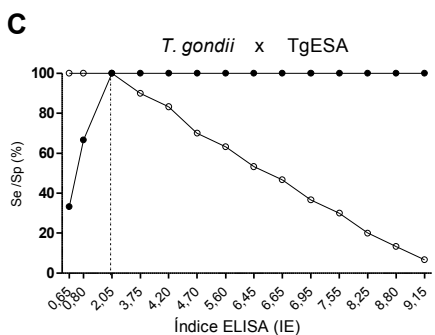
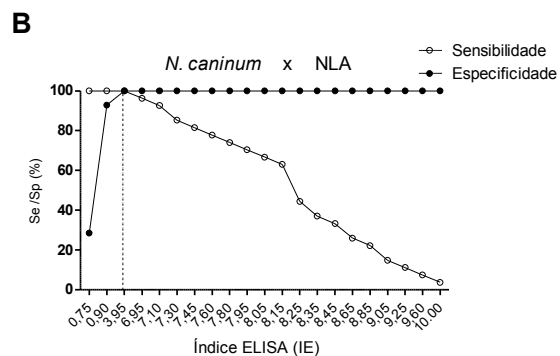
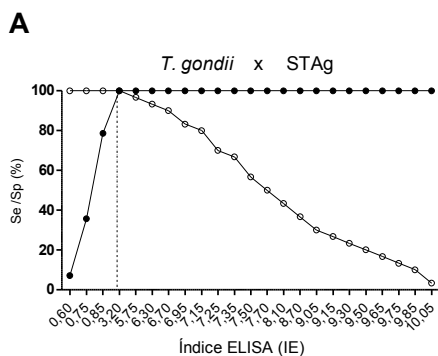
**Figura I.1. Avaliação da reatividade específica e cruzada de anticorpos IgG de camundongos por Imunofluorescência Indireta (IFAT).** A presença de reatividade a tachizoítos de *Neospora caninum* (duas primeiras colunas) e *Toxoplasma gondii* (duas últimas colunas) podem ser evidenciadas por isotiocianato de fluoresceína (coloração verde). A presença dos tachizoítos é observado pela contra-coloração do Azul de Evans (vermelha).

Para melhor caracterização dos perfis de reconhecimento específico por anticorpos IgG mediante diferentes frações antigênicas dos protozoários estudados, realizamos ensaios sorológicos com amostras de soro de camundongos infectados experimentalmente. De forma geral, observamos distinção de sororeatividade entre soros de animais infectados e animais não infectados para ambos os parasitos (Figura I.2). De todas as frações antigênicas testadas por ELISA, as frações contendo os antígenos solúveis demonstraram maior potencial de reatividade, especialmente antígenos solúveis (STAg e NLA; Figura I.2A) e antígenos solúveis depletados de proteínas secretadas/excretada (STAg-TgESA e NLA-NcESA; Figura I.2B). Por outro lado, os antígenos de superfície apresentaram baixa reatividade em relação a outras frações antigênicas, sendo encontrada menor distinção entre animais infectados ou não com os protozoários em estudo. Notavelmente, houve diferença de reatividade específica para os antígenos secretados/excretados destes protozoários, sendo observada uma forte reatividade de soros de animais infectados com *T. gondii* para TgESA, enquanto menores níveis de IgG sérico de camundongos infectados *N. caninum* foram observados para NcESA (Figura I.2A e I.2B).

Como próximo passo, os limiares de reatividade dos ensaios imunoenzimáticos foram determinados para cada fração antigênica analisada. Os limiares de reatividade foram selecionados através do cálculo da sensibilidade e especificidade relativas para cada antígeno por TG-ROC (Figura I.3). Os antígenos solúveis e antígenos solúveis depletados de proteínas secretadas/excretadas (STAg/NLA e STAg-TgESA/NLA-NcESA, respectivamente) foram as frações antigênicas com os limiares de reatividade mais elevados, o que sugeriu que os testes ELISA baseados nestes antígenos possuem uma reatividade inespecífica elevada, se comparada aos outros antígenos em estudo.



**Figura I.2. Caracterização do padrão de reatividade específica de IgG de camundongos à diferentes frações antigênicas de *N. caninum* e *T. gondii*.** Amostras de camundongos infectados com *T. gondii* (A) ou *N. caninum* (B) foram submetidos a ensaios imunoenzimáticos utilizando frações antigênicas distintas provenientes de *T. gondii* (A) ou *N. caninum* (B). STAg – antígenos solúveis de *T. gondii*; ESA – antígenos secretado/excretado; STAg-TgESA – STAg depletados de antígenos secretado/excretado; NLA – antígenos solúveis de *N. caninum*; NLA-NcESA – NLA depletados de antígenos secretado/excretado.



**Figura I.3. Avaliação do limiar de reatividade para diferentes antígenos por *Graph Receiver Operating Characteristic Curve* (TG-ROC).** TG-ROC para diferentes ensaios imunenzimáticos realizados utilizando: (A) antígenos solúvel de *T. gondii* (STAg), (B) antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA), (C) antígenos secretado/excretado de *T. gondii* (TgESA), (D) antígenos secretado/excretado de *N. caninum* (NcESA), (E) STAg depletado de TgESA, (F) NLA depletado de NcESA (G), antígenos de superfície de *T. gondii*, (H) antígenos de superfície de *N. caninum*. O cruzamento das linhas representam o limiar de reatividade determinado pela análise, considerando sensibilidade ( $\ominus$ ) e especificidade ( $\ominus$ ) ótimas para cada fração antigênica analisada.



Nos ensaios sorológicos, podemos observar que os soros dos animais apresentaram perfis de reconhecimento distintos, dependendo da fração antigênica utilizada no ELISA. Em geral, camundongos infectados com *T. gondii* soroconverteram antes do que os infectados com *N. caninum* (Figura I.4). Exceção feita aos antígenos de superfície (Figura I.4G), os antígenos solúveis STAg (Figura I.3A) e STAg-TgESA (Figura I.4E) e antígenos secretados/excretados (TgESA; Figura I.3C) de *T. gondii* foram reconhecidos por maioria dos soros animais 15 dias após a infecção. Para *N. caninum*, a soroconversão dos animais infectados experimentalmente foi observada para NLA (Figura I.4B), NLA-NcESA (Figura I.4F) e para os antígenos de superfície (Figura I.4H) após 15 dias de infecção. No entanto, a completa reatividade positiva para o NcESA (Figura I.4D) somente foi observada com 30 dias de infecção experimental.

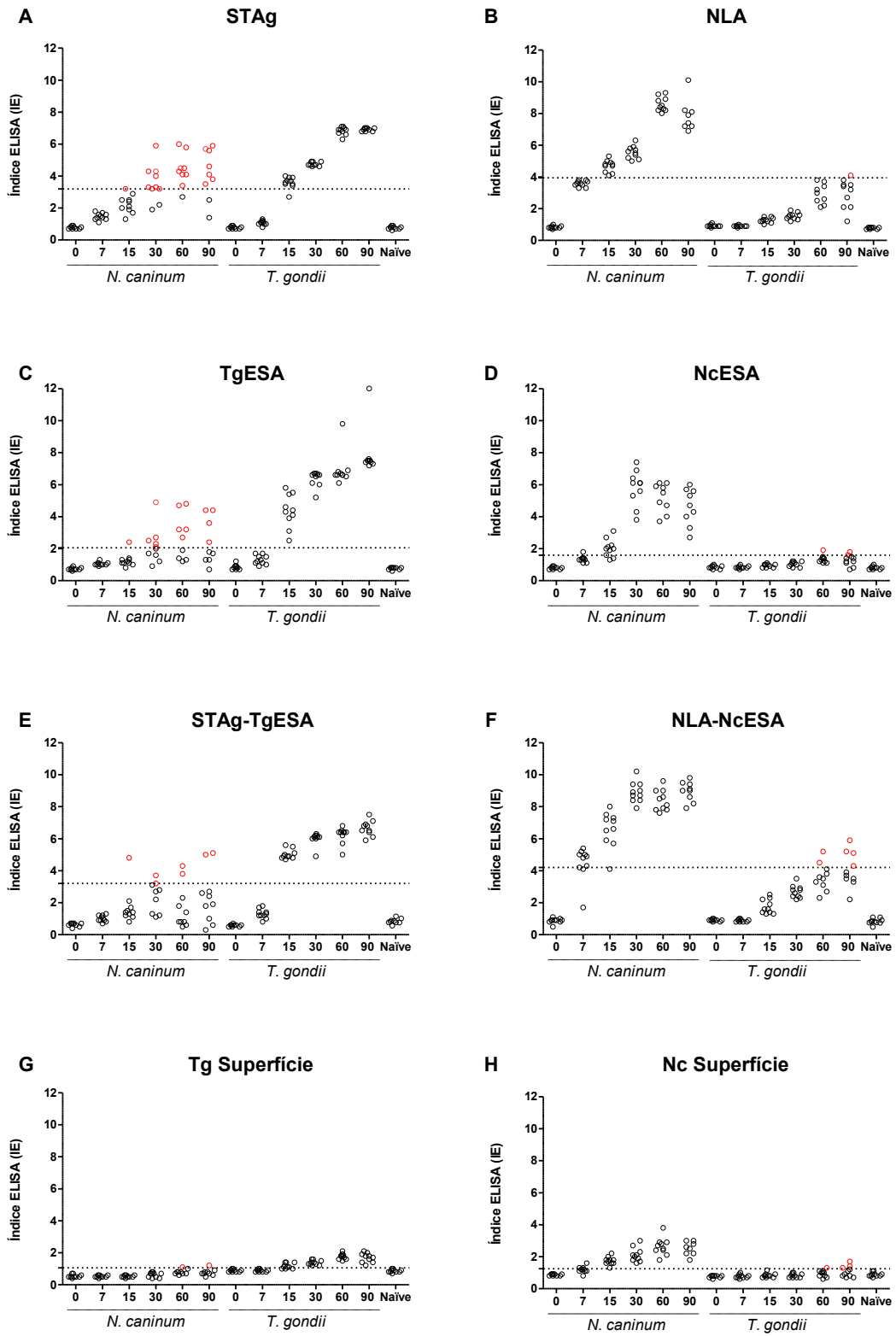
Quanto ao perfil de reatividade cruzada, claramente podemos notar que todos os grupos apresentaram reatividade para as frações antigênicas heterólogas testadas. No entanto, o número de animais que apresentaram anticorpos IgG com reatividade cruzada, bem como a intensidade de reação, variou entre as frações antigênicas testadas (Figura I.4). A adoção dos títulos de *cut off* calculados pela TG-ROC minimizou a porcentagem dos fenômenos de reatividade cruzada, embora não tenha sido capaz de eliminá-la completamente.

Foi observado um elevado grau de reatividade cruzada quando soros de camundongos infectados com *N. caninum* foram submetidos ao STAg (Figura I.4A), sendo esta a fração antigênica que apresentou maior índice de reatividade cruzada com aproximadamente 80% dos animais infectados com *N. caninum* apresentando reatividade a este antígeno de *T. gondii*. Por outro lado, soros de camundongos infectados com *T. gondii* reagiram de forma menos intensa ao NLA (Figura I.4B), sendo que somente após 90 dias após a infecção um animal do grupo infectado com *T. gondii* apresentou reatividade cruzada para NLA (Figura I.4B). Padrão semelhante de reatividade cruzada observada para os NLA e STAg também pode ser encontrado entre STAg-TgESA e NLA-NcESA (Figura I.4E e I.4F), onde a reatividade cruzada para o NLA-NcESA foi observada posteriormente a encontrada para o STAg-ESA.

Dentre os antígenos provenientes de *N. caninum* que apresentaram menores índices de reatividade cruzada, o NcESA revelou ser a fração com maior potencial de distinção entre animais com infecções pelos parasitos (Figura I.4D), perfil este de reatividade não observado por sua fração heteróloga (TgESA, Figura I.4C).

Embora os antígenos de superfície de ambos os parasitas tenham apresentado os menores níveis de reatividade por ELISA (Figura I.4G e I.4H), estes mostraram ser as frações com maior especificidade, sendo a reação com menor número de camundongos reconhecendo os antígenos heterólogos. Semelhante aos dados encontrados por IFAT (Figura I.1), antígenos de superfície de *N. caninum* apresentaram reatividade cruzada com IgG presente nos soro dos camundongos infectados com *T. gondii*.

○ Reação Específica  
○ Reação Cruzada



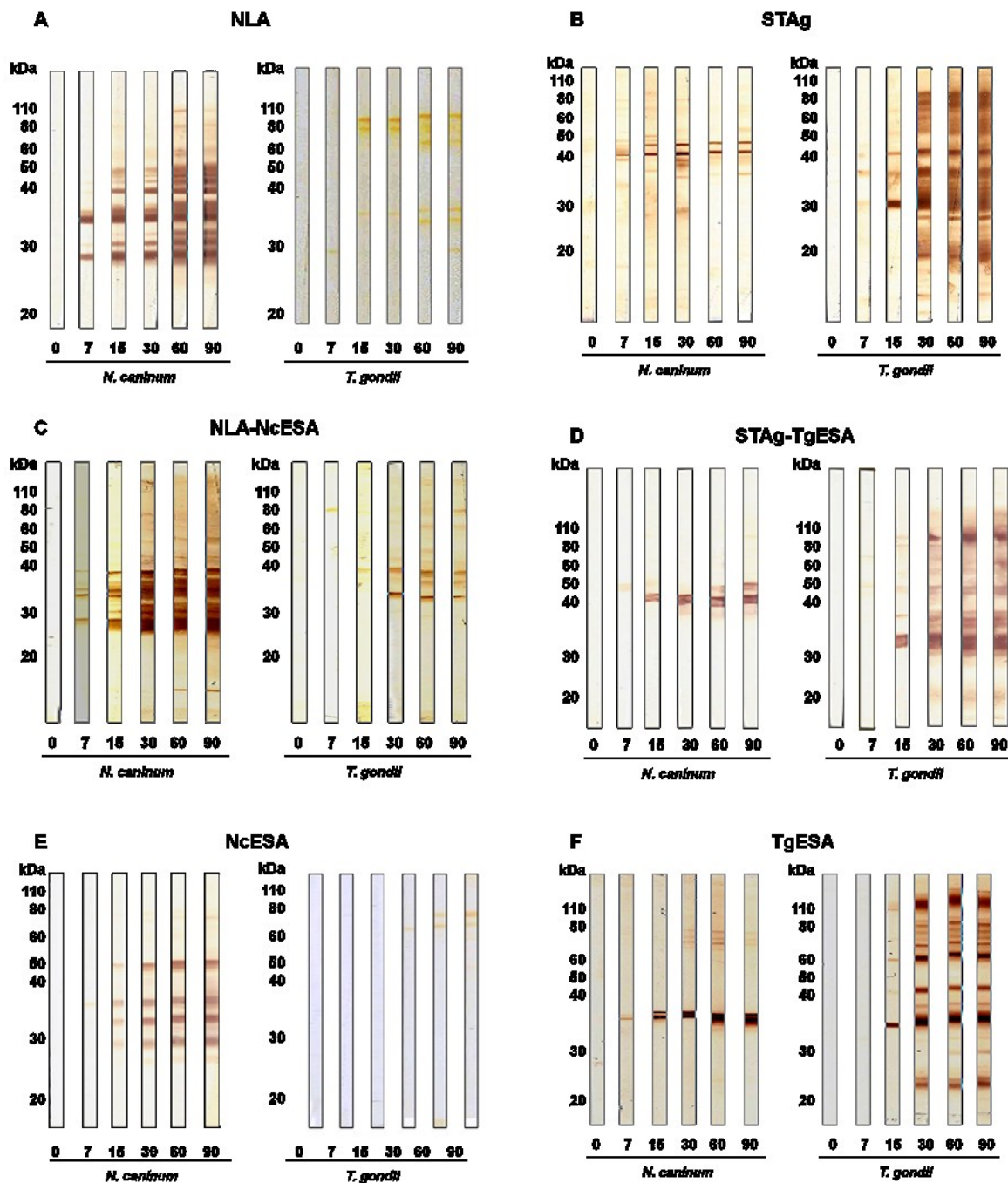
**Figura I.4. Caracterização dos níveis de reatividade cruzada por IgG de camundongos infectados experimentalmente para diferentes frações antigênicas de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*.** O perfil de reconhecimento de IgG provenientes de camundongos infectados por *N. caninum* ou *T. gondii* e animais não infectados foram expressos em Índice ELISA para reações utilizando (A) antígenos solúvel de *T. gondii* (STAg), (B) antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA), (C) a antígenos secretado/excretado de *T. gondii* (TgESA), (D) a antígenos secretado/excretado de *N. caninum* (NcESA), (E) STAg depletado de TgESA, (F) NLA depletado de NcESA (G) antígenos de superfície de *T. gondii*, (H) antígenos de superfície de *N. caninum*. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade obtido por TG-ROC para cada fração específica. Os pontos vermelhos representam os soros animais com a presença de reatividade cruzada.

Objetivando verificar o perfil da cinética de reconhecimento dos antígenos imunodominantes pelos diferentes grupos experimentais, foram avaliados a reatividade de IgG presente nos soro dos camundongos infectados experimentalmente à diferentes frações antigênicas de ambos os parasitas por *immunoblot* (Figura I.5). De forma geral, embora o reconhecimento dos antígenos por IgG no soro ser observado desde sete dias após a infecção, o amplo reconhecimento das frações proteicas em estudo foram realizado após 30 dias de infecção. Contudo, aos 15 dias de infecção os camundongos infectados com *N. caninum* apresentaram maior variabilidade de reconhecimento antigênico, quando comparado aos animais infectados com *T. gondii*, se considerado a reatividade frente suas frações específicas.

Animais infectados com *N. caninum* mostraram reconhecimento de dois antígenos imunodominantes em NLA (29-32 kDa e 36 kDa) a partir de sete dias pós-infecção (Figura I.5A). Da forma semelhante, soros de camundongos infectados com *T. gondii* reconheceram três porções antigênicas do STAg (30, 34-37, 40 kDa) após 15 dias de infecção (Figura I.5B). Aparentemente, as proteínas de alto peso molecular (80-110 kDa) de NLA foram reconhecidos em estágios mais avançados da infecção, mas estes mesmos antígenos apresentaram perfil de reação cruzada com IgG de camundongo infectado com *T. gondii* (Figura I.5A). Observamos também fraca reatividade cruzada com bandas de peso aproximado a 33, 36, 72-76 kDa do NLA após 15 dias de infecção e para a banda de 29 kDa após 90 dias de infecção (Figura I.5A). Já as bandas de 34, 39, 40 e 45-47 kDa apresentaram reatividade cruzada com soros de animais infectados com *N. caninum* (Figura I.5B). Novamente, foram observados resultados semelhantes entre STAg e STAg-TgESA, tanto para o perfil de reatividade específica como cruzada (Figura I.5B e I.5D).

De modo distinto, enquanto NLA foi intensamente reconhecido por anticorpos IgG de camundongos infectados por *N. caninum* e apenas alguns antígenos foram fracamente reconhecidos por soros de animais infectados com *T. gondii* (Figura I.5A), a depleção dos antígenos secretados/excretados das frações solúveis (NLA-NcESA) resultou em forte reconhecimento das bandas com pesos moleculares estimados em 32, 39 e 40 kDa (Figura I.5C).

Quanto ao reconhecimento específico de antígenos secretado/excretados no *immunoblot* os resultados confirmam aqueles obtidos por ELISA. Enquanto os antígenos presentes no TgESA apresentaram reconhecimento com maior intensidade e variabilidade de peso molecular por anticorpos IgG no soro de camundongos infectados por *T. gondii* (Figura 5F), os animais infectados com *N. caninum* reconheceram basicamente cinco bandas antigênicas situadas entre 20 e 50 kDa (Figura 5E). Enquanto IgG de camundongos infectados com *N. caninum* reconheceram fortemente antígenos do TgESA com peso molecular aparente de 33-34, 36-37, 65, 69-71, 74-76 e 80 kDa (Figura 5F), houve marcação de reação cruzadas evidente para os antígenos do NcESA com peso molecular estimado em 64-65 kDa e 69-70 kDa para 30 e 60 dias de infecção respectivamente (Figura 1.5E).



**Figura 1.5. Reconhecimento de antígenos imunodominantes mediante infecções homólogas e heterólogas.** Anticorpos IgG provenientes de camundongos infectados com *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* foram submetidos a ensaios de *Immunoblot* com frações (A) antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA), (B) antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg), (C) antígenos secretados/excretados de *N. caninum* (NcESA) (D) antígenos secretados/excretados de *T. gondii* (TgESA), (E) NLA depletados de NcESA, (F) STAg depletados de TgESA.

## 1.5. Discussão

Na natureza, estudos demonstram a presença de uma gama de animais que apresentam coinfeção para diferentes protozoários. Adicionalmente, já existem relatos de humanos com sorologia positiva para *N. caninum* e *T. gondii* (NAM, KAM E CHOI et al., 1998; TRANAS et al., 1999; TREES E WILLIAMS, 2000; LOBATO et al., 2006). Este fato tem levado o questionamento sobre a influência da proximidade filogenética e da homologia antigênica entre diferentes parasitos no detrimento da especificidade dos diagnósticos utilizados por diferentes laboratórios. Assim, estudos com potencial de entendimento do real papel do reconhecimento antigênico parasitário por diferentes organismos apresentam extrema relevância no ambiente científico e laboratorial.

Em nosso trabalho realizamos a avaliação antigênica, sua especificidade e reatividade cruzada por IgG presentes no soro de animais infectados com *N. caninum* e *T. gondii*. A reatividade cruzada pôde ser avaliada através da determinação do limiar de reatividade por análise de TG-ROC, pelo qual foi realizado o cálculo do *cut off* específicos para cada antígeno no modelo de infecção experimental murino. Por IFAT, ELISA e *Immunoblot* foram observados perfis distintos de reatividade cruzada entre os antígenos de *T. gondii* e *N. caninum*.

Por meio do IFAT e ELISA, verificou-se que os anticorpos IgG de camundongos infectados com *T. gondii* reconheceram antígenos de superfície de taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum*. O IFAT tem sido utilizado para o diagnóstico de neosporose em diferentes animais como um padrão ouro para a confirmação desta infecção. Contudo, considerável reatividade cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* é relatada, principalmente no complexo apical deste parasita (CONRAD et al., 1993; PARÉ et al., 1995). A estrutura do conóide de *N. caninum* é uma região importante do complexo apical que contém epítomos com apresentação de reação cruzada por IgG à *T. gondii* e outros parasitos com *Eimeria* spp. (SASAI et al., 1998). Além disso, a presença de antígenos de micronemas e roptrias com considerável identidade entre *T. gondii* e *N. caninum* pode possibilitar o aumento da reatividade cruzada por IFAT (GANLEY e COMSTOCK, 1980). Liao et al., 2005, utilizando dez anticorpos monoclonais contra proteínas de *N. caninum*



observou por IFAT e *Immunoblot* que seis monoclonais apresentaram reatividade cruzada com *T. gondii*, três deles identificados como proteínas PDI, HSP70 e RP1. Adicionalmente, os mAb utilizados no estudo e que reconheceram a proteína PDI, demonstraram potencial na inibição do processo de invasão de células Vero por *N. caninum* e *T. gondii in vitro*.

Por ELISA e *Immunoblot*, certificamos que IgG anti-*N. caninum* reconheceram antígenos solúveis de *T. gondii*, principalmente STAg, TgESA e do STAg-TgESA. Em contrapartida, a reatividade de IgG anti-*T. gondii* reconheceu minimamente os antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA), ocorrendo mais fortemente no NLA-NcESA.

Família de proteínas com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) identificadas na superfície de taquizoítos de *T. gondii* (MANGER et al., 1998) e *N. caninum* (HOWE et al., 1998) e designadas como SAG e SRS apresentam elevado perfil de homologia para ambos os parasitas (HOWE e SIBLEY, 1999), o que poderia sugerir a elevada presença de perfil de reatividade cruzada. Contudo, estudos com as proteínas p29 (SAG1) e p35 (SRS2) demonstraram ser conservadas em cinco cepas de *N. caninum* (NC-1, NC-2, NC-Liv, BPA-1 e BPA-3), mas também revelou que monoclonais específicos para estas proteínas não reconheceram proteínas de *T. gondii* ou *S. neurona*, o que revela que estas proteínas possuem epítomos próprios que não apresentam reatividade cruzada (HOWE et al., 1998).

HE et al., 2013, não encontraram reatividade cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* em soros de bovinos através da proteína recombinante de 40 kDa (NcSAG1 e NcSRS2), podendo este ser um alvo antigênico para o diagnóstico da neosporose bovina. Já em outro estudo utilizando soro policlonal de coelho infectado, proteína de 43 kDa de *N. caninum* (Nc-p43) revelou-se altamente antigênica com ausência de reatividade cruzada com *T. gondii* (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 1996). Contudo Nan, Kang e Choi, 1998 realizando avaliação sorológica entre 110 estudantes saudáveis encontraram soro de três destes reativos para a proteína de 43 kDa presente em extrato proteico proveniente de *N. caninum*. Posteriormente Hemphill et al., 1997, observou que a p43 de *N. caninum* possuía homologia com duas proteínas de *T. gondii*, SAG1 (43% de similaridade; 30% de identidade) e SAG3 (44% de similaridade; 23% de

identidade), mas não encontrou reatividade cruzada entre essas proteínas por IFAT e *Immunoblot*.

Em nossos resultados, *T. gondii* e *N. caninum* apresentaram diferentes padrões de reatividade cruzada em modelo experimental de infecção murina dependendo da fração antigênica e dos ensaios sorológicos utilizados na avaliação diagnóstica. Existiu uma predominância de reatividade cruzada aos antígenos de *T. gondii*, em relação aos antígenos de *N. caninum* em soros de animais infectados, sendo maior reatividade cruzada em nossos ensaios sorológicos encontrada para os antígenos presente no STAg. Adicionalmente, mais estudos de proteômica se tornam necessários para melhor identificação de proteínas com real potencial para o diagnóstico diferencial da neosporose e toxoplasmose.

## CAPÍTULO II

**Avaliação do perfil de reconhecimento antigênico de *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental bovino**

## II.1. Justificativa

No Brasil, o setor agropecuário é responsável por 27% do Produto Interno Bruto (PIB) (GOVERNO FEDERAL DO BRASIL, 2009), sendo a bovinocultura um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil é considerado o maior rebanho comercial do mundo com 212 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2011), o que representa 1,15 bovinos para cada indivíduo no país. Desde 2004, o Brasil assumiu a liderança em exportações com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. Desde então, o rebanho bovino representa a partir da cadeia produtiva de carne e leite um valor bruto estimado em R\$ 67 bilhões (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013). Nesse contexto, as doenças infecciosas relacionadas principalmente com a reprodução animal podem condenar matrizes e interferir na manutenção e expansão de indústrias que dependem de produtos cárneos e lácteos, o que confere danos de importância econômica para o país.

*N. caninum* foi inicialmente relacionado a abortos bovinos na década de 1990 e, desde então, tem despertado interesse de pesquisadores ao redor do mundo por sua eficiência em transferir-se para o embrião, bem como por sua capacidade de induzir perdas reprodutivas. Estima-se que o parasito é capaz de infectar os fetos em 95% das gestações em que as vacas eram previamente soropositivas (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). Em estudo realizado por Barling et al., 2000, a neosporose também foi relacionada com a perda de aproximadamente 7,5 Kg do peso corpóreo na idade de abate em animais sorologicamente positivos, fato este que evidencia as perdas econômicas para o setor.

Reichel et al., 2013, avaliando a soroprevalência em 10 países a partir de levantamento bibliográficos, observou que as infecções por *N. caninum* são encontrados em sua maioria em bovinos de leite quando comparado com bovinos de corte. Contudo, o estudo associou o maior risco de aborto em bovinos de corte se comparado com as raças destinadas à produção de leite. Reunindo a este fato, conforme descrição clássica, bovinos infectados com *N. caninum* possuem mais chances de aborto que animais não infectados (INNES et al., 2005; WESTON et al., 2005).

A resposta imunitária materna é também um importante determinante da propagação de parasitas e transmissão da neosporose (INNES et al., 2005). Entretanto, apesar de ser possível encontrar anticorpos específicos a *N. caninum* em infecções naturais e experimentais, as informações sobre diferentes marcadores humorais de fase da doença ainda são incipientes.

Os antígenos de *N. caninum* com valor para o diagnóstico da neosporose têm sido estudados há quase 20 anos (BJERKAS et al., 1994). Ensaio de *immunoblot* revelam quatro componentes imunodominantes com potenciais para o diagnóstico da neosporose, apresentando pesos moleculares aparentes de 17, 29, 30 e 37 kDa (BJERKAS et al., 1994). Em trabalho do nosso grupo, a fração 17 e 29-32 kDa do antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) apresentaram potencial imunodominante para o diagnóstico da neosporose canina (SILVA et al., 2007). Contudo, apesar destas frações antigênicas apresentarem potencial imunodominante para o diagnóstico da neosporose, elas não favorecem a identificação da fase aguda, crônica ou de recrudescência em que o animal se encontra. Assim, o entendimento sobre o papel de diferentes proteínas antigênicas específicas do parasito e de seus reconhecimentos em imunoenaios por distintas classes de imunoglobulinas podem ser útil para desenvolvimento de candidatos a marcadores diagnósticos eficazes e de vacinas para neosporose bovina.

Neste contexto, o presente capítulo propôs fornecer informações para suprir a real necessidade por insumos capazes de diagnosticar a neosporose bovina com altos índices de valores preditivos positivo e negativo, bem como sua potencial utilização na avaliação de medidas de profilaxia e controle da infecção vertical por *N. caninum* em bovinos.

## II.2. Objetivos específicos

O capítulo II desse trabalho teve como objetivos específicos:

- Caracterizar o perfil cinético de produção de anticorpos durante infecção experimental de bovinos com *N. caninum*;
- Comparar o perfil de reconhecimento entre a produção de anticorpos específicos para diferentes extratos antigênicos de *N. caninum*;
- Determinar, por *immunoblot*, frações proteicas que representem os principais determinantes de fase da doença, mediante análise temporal de amostras de soro de animais experimentalmente infectados;
- Delinear um fluxograma de interpretação de possíveis resultados sorológicos com objetivo de facilitar a interpretação de possíveis marcadores da neosporose bovina.

## **II.3. Material e Métodos**

### **II.3.1. Animais**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados seis bovinos machos, mestiços (Pardo suíço, Holandês e Simental), com idade média inicial entre sete e nove meses, e sorologicamente negativos para *N. caninum*. Estes animais foram mantidos na Fazenda Experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia sob condições sanitárias, nutricionais e de manejo adotadas pela fazenda. Os animais foram divididos em dois grupos de três animais: um grupo infectado por via subcutânea na base do pescoço, no antímero direito do animal, com  $1,5 \times 10^8$  taquizoítos viáveis de *N. caninum* no dia zero. Outro grupo inoculado com PBS foi considerado como grupo controle. Durante o modelo de infecção experimental, foram realizadas duas infecções, uma no dia zero, outra no dia 276 após a primeira infecção. Coletas periódicas de sangue de todos os animais foram coletadas para realização de ensaios sorológicos visando avaliar o perfil de reconhecimento antigênico destes animais. Os experimentos foram conduzidos seguindo as normas recomendadas e após aprovação pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo No. 52/2012).

### **II.3.2. Manutenção e obtenção de parasitos**

Parasitos do isolado Nc-1 (DUBEY et al., 1988) de *N. caninum* foram mantidos em cultura celular utilizando linhagem HeLa (ATCC No. CCL-2). As células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C até atingirem a confluência. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítos de Nc-1 e mantidas por passagens seriadas em meio RPMI sem adição de SFB, em intervalos de 48 a 72 horas. Parasitos presentes no meio de cultura celular foram

parcialmente purificados por passagem forçada através de agulha 25x7 mm e centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4 °C). O sobrenadante foi coletado e centrifugado (720 x g, 10 minutos, 4 °C) para a obtenção dos parasitos e posterior utilização em infecção experimental ou preparação de antígenos.

### **II.3.3. Preparação de antígenos de *N. caninum***

#### **II.3.3.1. Antígeno total de *N. caninum***

Taquizoítos de *N. caninum* foram ressuspensos em solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2), tratados com inibidores de proteases (Roche) e submetidos a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, seguido por ciclos (30 segundos *on*; 20 segundos *off*, 12 W, 30 kHz e amplitude de 90%) de ultrassom durante 5 minutos em banho de gelo. Em seguida a concentração proteica da preparação de antígenos totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD et al., 1976) e alíquotas do antígeno total foram armazenadas a -20 °C até sua utilização.

#### **II.3.3.2. Antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA)**

Antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) foi preparado como descrito anteriormente (SILVA et al., 2007), com algumas modificações. Os parasitos ressuspensos em PBS foram tratados com inibidores de proteases (Roche) e submetidos a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, seguido por ciclos (30 segundos *on*; 20 segundos *off*, 12 W, 30 kHz e amplitude de 90%) de ultrassom durante 5 minutos em banho de gelo. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi coletado e a concentração proteica determinada pelo método de Bradford. Alíquotas do antígeno NLA foram armazenadas a -20 °C até sua utilização nos experimentos.



### **II.3.3.3 Antígenos secretado-excretado de *N. caninum* (NcESA)**

Células Hela foram infectadas com taquizoítos de Nc-1 e mantidas em meio RPMI sem adição de SFB. Após 72 horas de infecção o sobrenadante de cultura contendo as proteínas secretadas/excretadas do parasito foi coletado, centrifugado (10.000 x g, 30 minutos, 4 °C), e posteriormente concentrado em sacarose. A concentração proteica do antígeno foi determinada por Bradford e alíquotas de NcESA foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas nos procedimentos.

### **II.3.4. Ensaio Imunoenzimático indireto para IgG anti-*N. caninum***

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para detectar anticorpos em amostras de bovinos infectados experimentalmente com *N. caninum*, conforme Silva et al., 2007, com algumas modificações. A otimização de cada reação foi estabelecida em experimentos preliminares por meio da titulação em bloco dos reagentes, utilizando soros controles positivos e negativos para *N. caninum*. Placas de microtitulação de baixa afinidade para IgG e de alta afinidade para IgG1, IgG2, IgM e IgA foram sensibilizadas com 10 µg/ml de NLA ou NcESA em tampão carbonato/bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó desnatado a 5% em PBST (PBSTM) para IgG, IgG1 e IgG2 e BSA 2% em PBST para IgM e IgA por 1 hora em temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soros foram adicionadas em duplicata para detecção de IgG, IgG1 e IgG2 (1:200) em PBSTM 5% e para a detecção de IgM (1:100) e IgA (1:50) em PBST EDTA-EGTA 7,5 mM pH 6,3. Após incubação por 1 hora a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os anticorpos secundários espécie específicos, marcados com peroxidase: IgG de coelho anti-IgG de bovino (1:20000; Sigma Chemical Co. LLC.), IgG de ovelha anti-IgG1 de bovino (1:2000; AbD Serotec), IgG de ovelha anti-IgG2 de bovino (1:2000; AbD Serotec), diluídos em PBSTM 1%, e IgG de ovelha anti-IgM de bovino (1:10000; AbD Serotec) ou IgG de ovelha anti-IgA de bovino (1:2000; AbD Serotec), em PBST EDTA-EGTA 7,5 mM pH 6,3, por uma hora a 37°C. Em seguida, um ciclo final de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático (0.03%

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,01M 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico)) (ABTS; KPL). Após incubação em temperatura ambiente, a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 405 nm. O *cut off* de cada reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula:  $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$ , como descrito anteriormente por Silva et al., 2002). Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

### II.3.5. ELISA avides para IgG anti-*N. caninum*

ELISA-avides para anticorpos IgG anti-*N. caninum* em amostras de soros de bovinos foi realizado como descrito para ELISA indireto convencional, com pequenas modificações (MARCOLINO et al., 2000). As amostras de soros foram adicionadas em duas duplicatas na diluição seriada de 1:200 a 1:1600 em PBS-TM por 1 hora a 37°C. Após três lavagem com PBS-T, uma das duplicatas foi submetida a lavagem com PBST e a outra proveniente do mesmo soro foi lavada de forma diferencial com PBST ureia a 6 M por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, todos os poços foram lavados por seis vezes com PBST e incubados com IgG de coelho anti-IgG de bovino conforme descrito em II.3.3. As reações foram reveladas como descrito para ELISA indireto convencional e os resultados expressos em Índice Avides (IA) calculado como a razão entre os valores de IE obtidos das amostras tratadas com ureia (U<sup>+</sup>) e as amostras não tratadas (U<sup>-</sup>), seguindo a fórmula:  $IA (\%) = [IE (U^+) / IE (U^-)] \times 100$ .

### II.3.6. Avaliação de Parasitismo

Ensaio de parasitismo celular foram realizados para avaliar o papel de anticorpos obtidos durante infecção bovina por *N. caninum* na proliferação de taquizoitos *in vitro*. Placas de 24 poços foram plaqueadas com 1.10<sup>6</sup> células HeLa ATCC (ATCC CCL-2) e cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de soro bovino proveniente dos animais infectado experimentalmente ou com soro de animais *Naïve* durante todo o período de cultura celular. Após atingirem confluência,

células HeLa foram infectadas com  $10^3$  taquizoítos de *N. caninum*. A cada 24 horas o meio de cultura suplementado foi trocado e o perfil de lise celular avaliado. Posteriormente, os poços foram fixados com Metanol e corados com Solução Cristal Violeta 0,01%.

### **II.3.7. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)**

Os antígenos de *N. caninum* foram fracionados em sistema unidimensional como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Os géis de poliacrilamida nas concentrações de 12% foram montados em placas do sistema de eletroforese SE250 (Amersham-Pharmacia Biothec, UK) de dimensões 8 x 10 x 0,075 cm. Antígenos de *N. caninum* solubilizados em SDS foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas ao gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram eletroforeticamente separadas utilizando uma corrente de 25 mA. Após a corrida, os géis foram corados com solução de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250 dissolvido em metanol 50% e ácido acético 10%) e mantidos em ácido acético 7% até a digitalização das imagens. Alternativamente, os antígenos resolvidos em SDS-PAGE 1D foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como descrito a seguir.

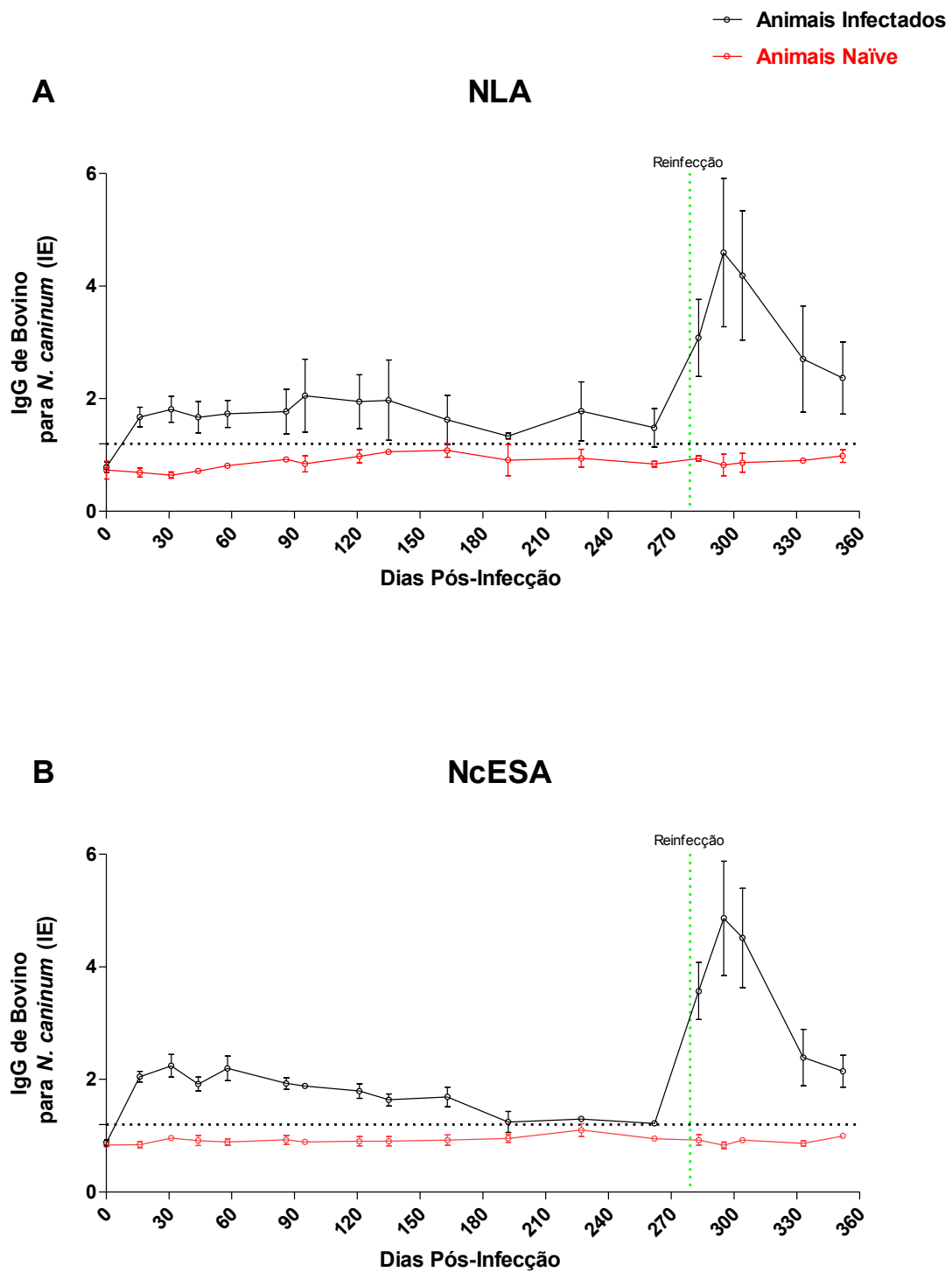
### **II.3.8. Immunoblot**

Os antígenos separados em SDS-PAGE foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como descrito anteriormente (TOWBIN et al., 1979). Para o *immunoblot*, membranas de nitrocelulose cortadas em tiras de 3-4 mm foram bloqueadas com solução PBS Tween 20 0,05% suplementada com leite desnatado 5% durante duas horas a temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram incubadas com amostras de soro bovino (1:100) por período de 1 hora a 37 °C. A seguir, a detecção da ligação dos anticorpos primários aos antígenos imobilizados em nitrocelulose foi realizada pela subsequente incubação das membranas com os anticorpos secundários espécie específicos, marcados com peroxidase: IgG de coelho anti-IgG de bovino (1:20000; Sigma Chemical Co.), IgG de ovelha anti-IgG1 de bovino (1:2000; AbD Serotec), IgG de ovelha anti-IgG2 de

bovino (1:2000; AbD Serotec), IgG de ovelha anti-IgM de bovino (1:10000; AbD Serotec) ou IgG de ovelha anti-IgA de bovino (1:1000; AbD Serotec). Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas em PBS Tween 20 0,05% e reveladas com 3,3'diaminobenzidina (Life Technologies Corporation) como descrito pelo fabricante.

## II.4. Resultados

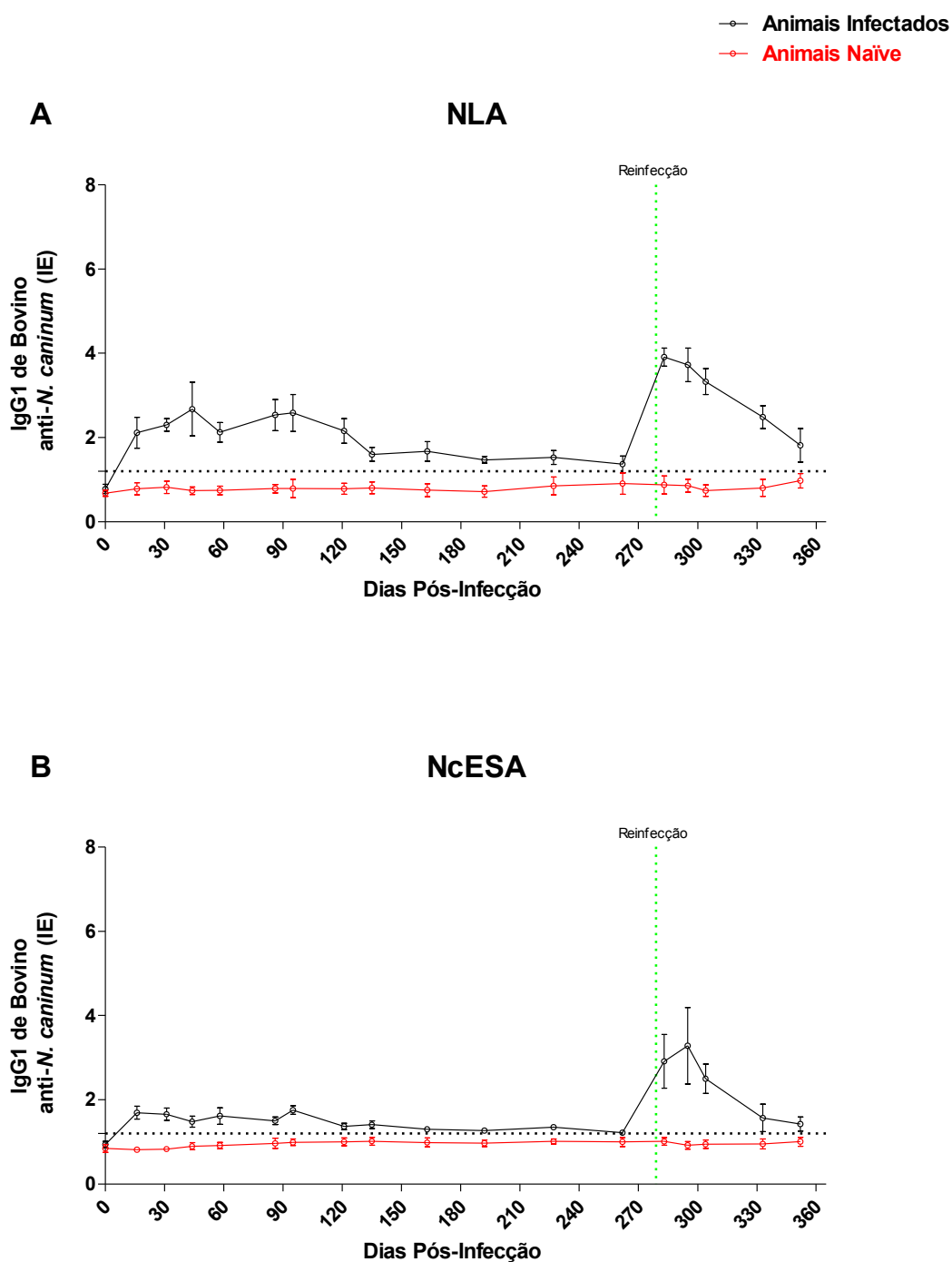
De forma geral, a infecção experimental de bovinos com alta dose subcutânea de taquizoítos induziu a soroconversão nos animais testados, sendo que a reinfecção – após 276 dias da primo-infecção – induziu um incremento significativo dos anticorpos séricos específicos aos diferentes extratos antigênicos testados de *N. caninum*. Os bovinos infectados experimentalmente apresentaram um pico de produção de IgG, detectável por ELISA, para NLA e NcESA após a primeira coleta venosa após 15 dias de infecção (Figura II.1). Durante o decorrer da infecção, os animais apresentaram títulos decrescentes de reatividade após o pico inicial de produção, mas com níveis de anticorpos acima do ponto de corte estabelecido ( $IE > 1,2$ ) até a reinfecção. Apesar dos animais infectados apresentarem menor variabilidade de reatividade entre o grupo para o ensaio de reconhecimento de IgG bovina anti-NcESA, estes exibiram positividade média próximo ao limiar de reatividade em fases tardias da infecção (210 a 270 dias pós-infecção). Contudo, após a reinfecção, os animais apresentaram reatividade semelhante ao reconhecimento do NLA (Figura II.1A e 1B).



**Figura II.1. Cinética de sororeatividade de IgG a *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental.** Níveis de anticorpos IgG total específico para antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) (A) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) (B) foram expressos em índices ELISA (IE). As linhas pontilhadas representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2). A barra vertical verde representa o momento da segunda infecção com *N. caninum* no modelo de infecção experimental bovino.

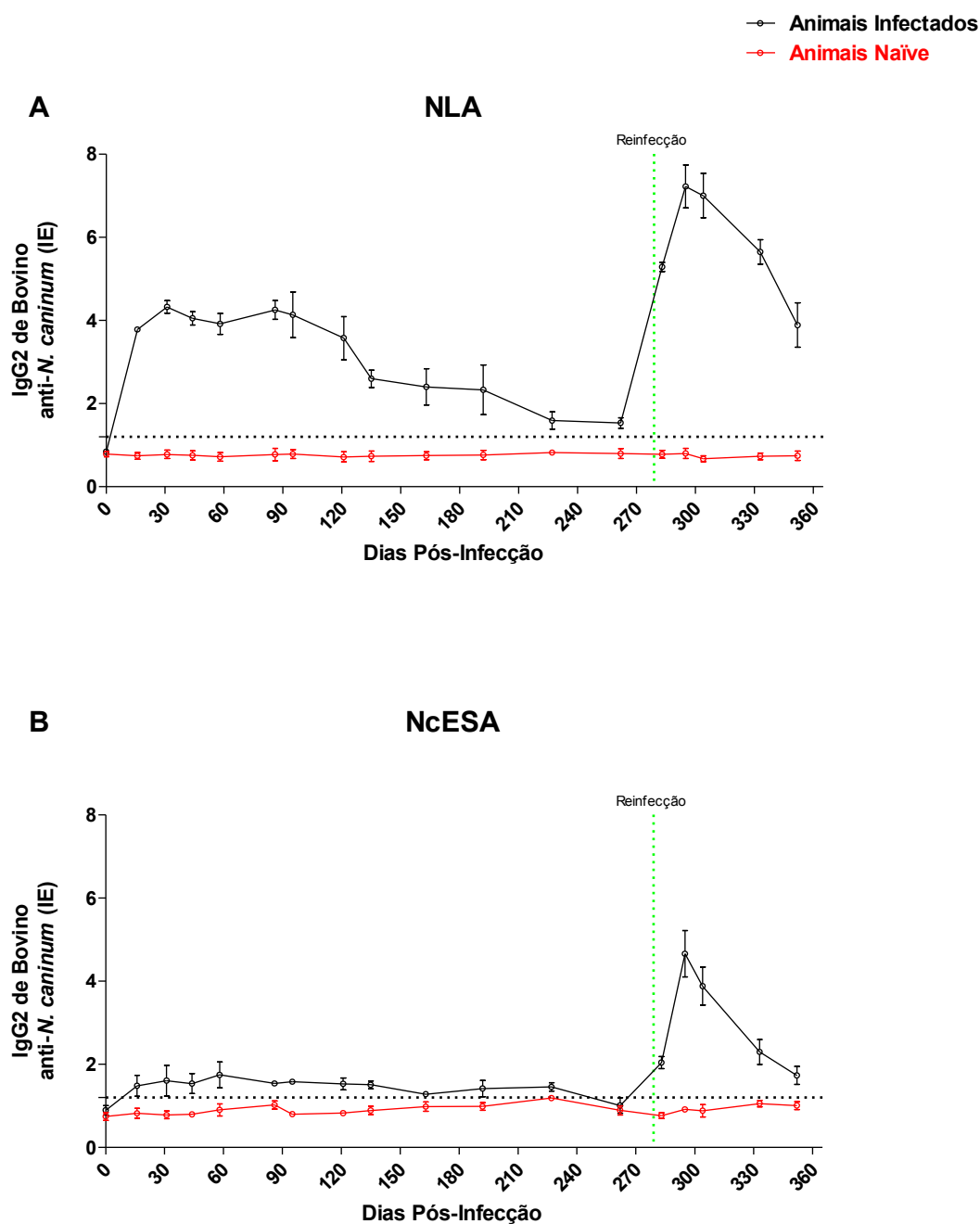
Os animais infectados também apresentaram padrões distintos de reconhecimento para subclasses de IgG entre NcESA e NLA. Em nossos resultados, encontramos maior produção das subclasses IgG1 (Figura II.2) e IgG2 (Figura II.3) específicas para NLA com maior intensidade quando comparado ao NcESA. Contudo, índices de reatividade foram semelhantes para IgG1 entre os antígenos após reinfecção (Figura II.2 e II.3).

Quando avaliado o perfil sorológico dominante entre as subclasses IgG1 e IgG2, também encontramos um perfil distinto de reatividade entre os antígenos, com predomínio durante a infecção do perfil de IgG2 sobre o IgG1, específico para NLA (Figura II.4). O predomínio de IgG2/IgG1 possuiu maior intensidade no início da infecção, apresentando valores decrescentes entre as subclasses com o decorrer da infecção até as fases mais tardias (210-270 dias pós-infecção), onde os índices entre subclasses foram semelhantes. Já a reatividade de subclasses para NcESA não revelou predomínio de IgG1 ou IgG2 durante a infecção primária. Contudo, pode ser observado um leve predomínio de IgG1 sobre IgG2 entre 240 a 270 dias pós-infecção. Já na reinfecção, pode ser notado o predomínio de IgG2 sobre IgG1 para ambas as frações, entretanto a razão entre as subclasses ainda apresentou níveis inferiores de reconhecimento para NcESA, quando comparado aos encontrados para NLA. De forma geral, os níveis de reatividade de IgG, IgG1 e IgG2 foram maiores para NLA, se comparados ao NcESA. Adicionalmente, durante todo o período experimental os animais controles não apresentaram qualquer reconhecimento das frações provenientes de *N. caninum*, por nenhuma das subclasses de anticorpos testadas (Figura II.1, II.2 e II.3).

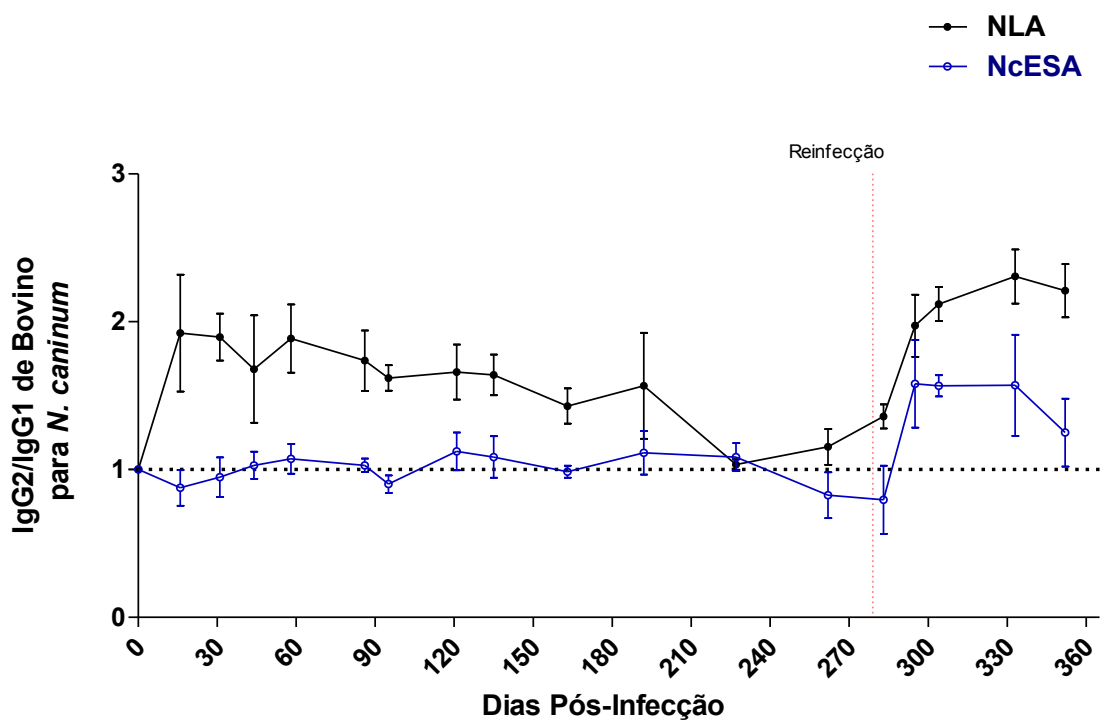


**Figura II.2. Cinética de sororeatividade de IgG1 a *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental.** Níveis de anticorpos IgG1 específico para antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) (A) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) (B) foram expressos em índices ELISA (IE). As linhas pontilhadas representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2). A barra vertical verde representa o momento da segunda infecção com *N. caninum* no modelo de infecção experimental bovino.



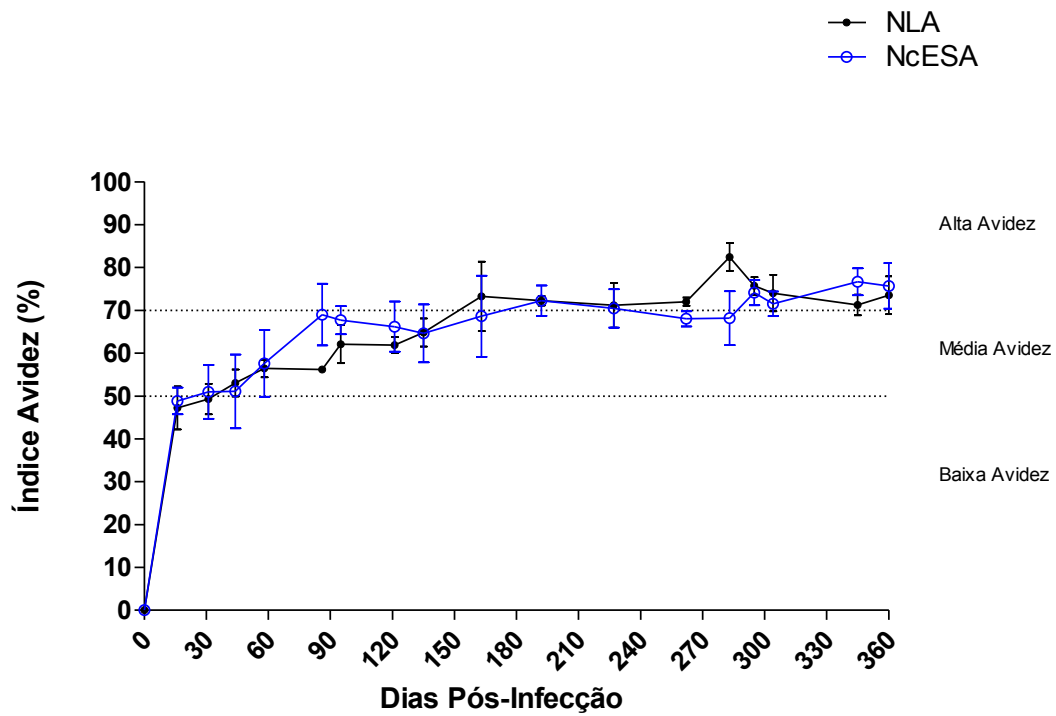


**Figura II.3. Cinética de sororeatividade de IgG2 a *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental.** Níveis de anticorpos IgG2 específico para antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) (A) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) (B) foram expressos em índices ELISA (IE). As linhas pontilhadas representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2). A barra vertical verde representa o momento da segunda infecção com *N. caninum* no modelo de infecção experimental bovino.



**Figura II.4. Perfil de reatividade sorológica entre IgG1 e IgG2 específico a *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental.** Razão IgG2/IgG1 foram realizadas entre Índices ELISAs provenientes de anticorpos específicos a antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA). A linha pontilhadas representa o limiar de igualdade para a reatividade entre IgG2 e IgG1 ( $IgG2/IgG1 = 1$ ). A barra vertical vermelha representa o momento da segunda infecção com *N. caninum* no modelo de infecção experimental bovino.

Para avaliação do processo de maturação da avidéz dos anticorpos IgG durante a infecção experimental, realizamos ensaios de ELISA frente à NLA e NcESA. Apesar das amostras de soro provenientes dos animais infectados apresentarem maior reatividade ao NLA, ambos apresentaram perfil de maturação de avidéz de IgG semelhante. Ambos apresentaram baixa avidéz com 15 dias pós-infecção. Entretanto pode ser observado rápida maturação de IgG, sendo encontrado avidéz média (50 a 70%) entre 30 e 120 dias pós-infecção e IgGs de alta avidéz foram encontrados após 150 dias de infecção (Figura II.5).

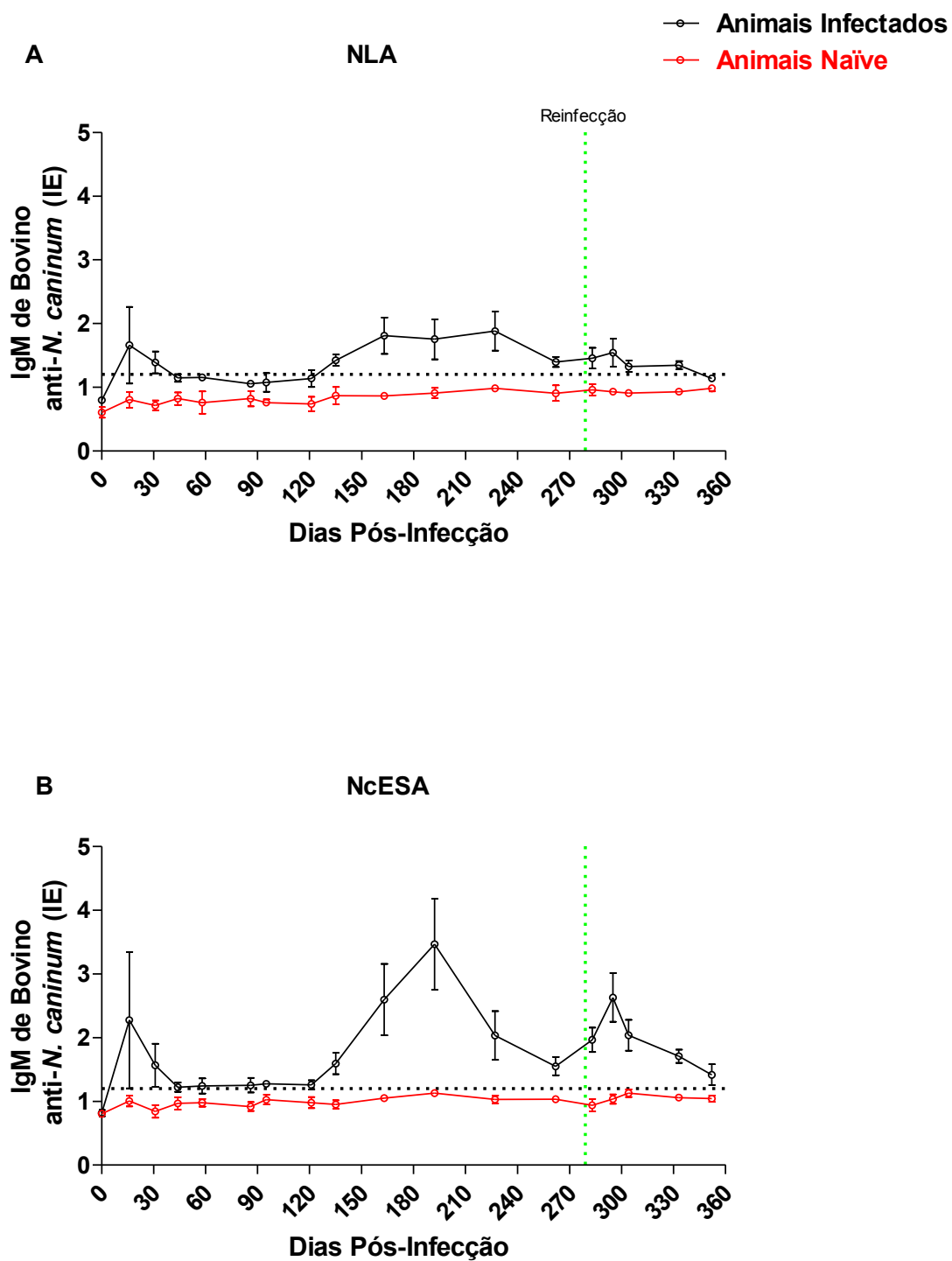


**Figura II.5. Maturação da avidiz de IgG em bovinos infectados experimentalmente com *N. caninum*.** Avidiz média de IgG foi obtida através da reatividade dos três bovinos infectados frente a antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) durante 360 dias. As linhas horizontais representam a distinção entres os diferentes níveis de avidiz de IgG.

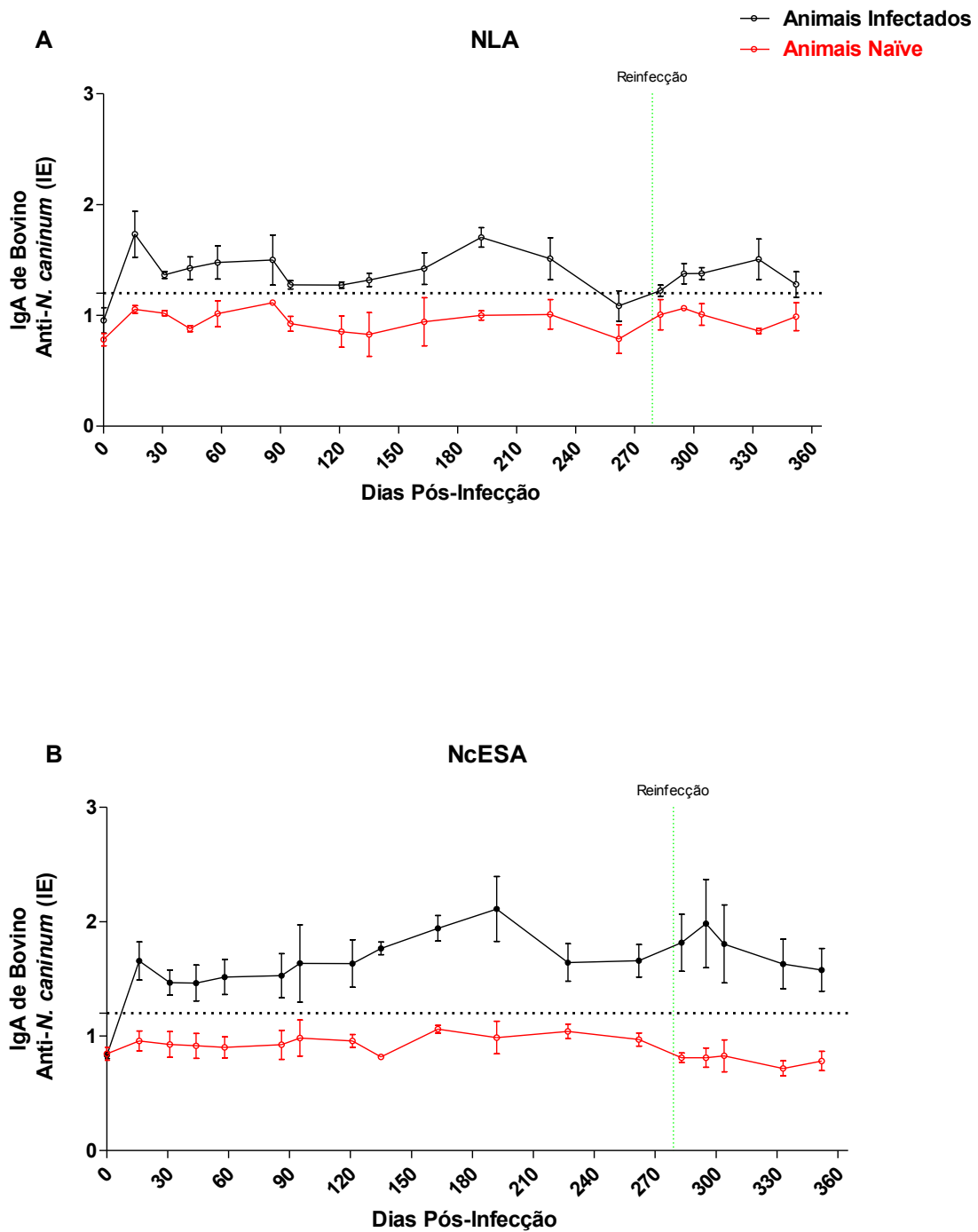
Os animais experimentalmente infectados apresentaram maior variabilidade na produção de anticorpos IgM e IgA específicos, se comparados a IgG. Apesar de ser observado um pico de IgM em fase aguda e após a reinfeção, IgM não pôde ser associado com fase aguda da infecção. Este fato pode ser justificado por inesperadamente ser encontrado um pico de IgM entre 150 a 240 dias pós-infecção com reatividade ao NLA e NcESA (Figura II.6).

Observamos a presença de IgA específica após 15 dias pós infecção, mantendo níveis aproximadamente constantes até 150 dias, onde acompanhando os níveis de IgM, ocorreu leve aumento dos níveis de reatividade para NLA e NcESA durante a fase tardia da infecção. Semelhante a IgM, foi notado maior reatividade para o NcESA após a reinfeção quando comparado no mesmo momento para NLA (Figura II.7).

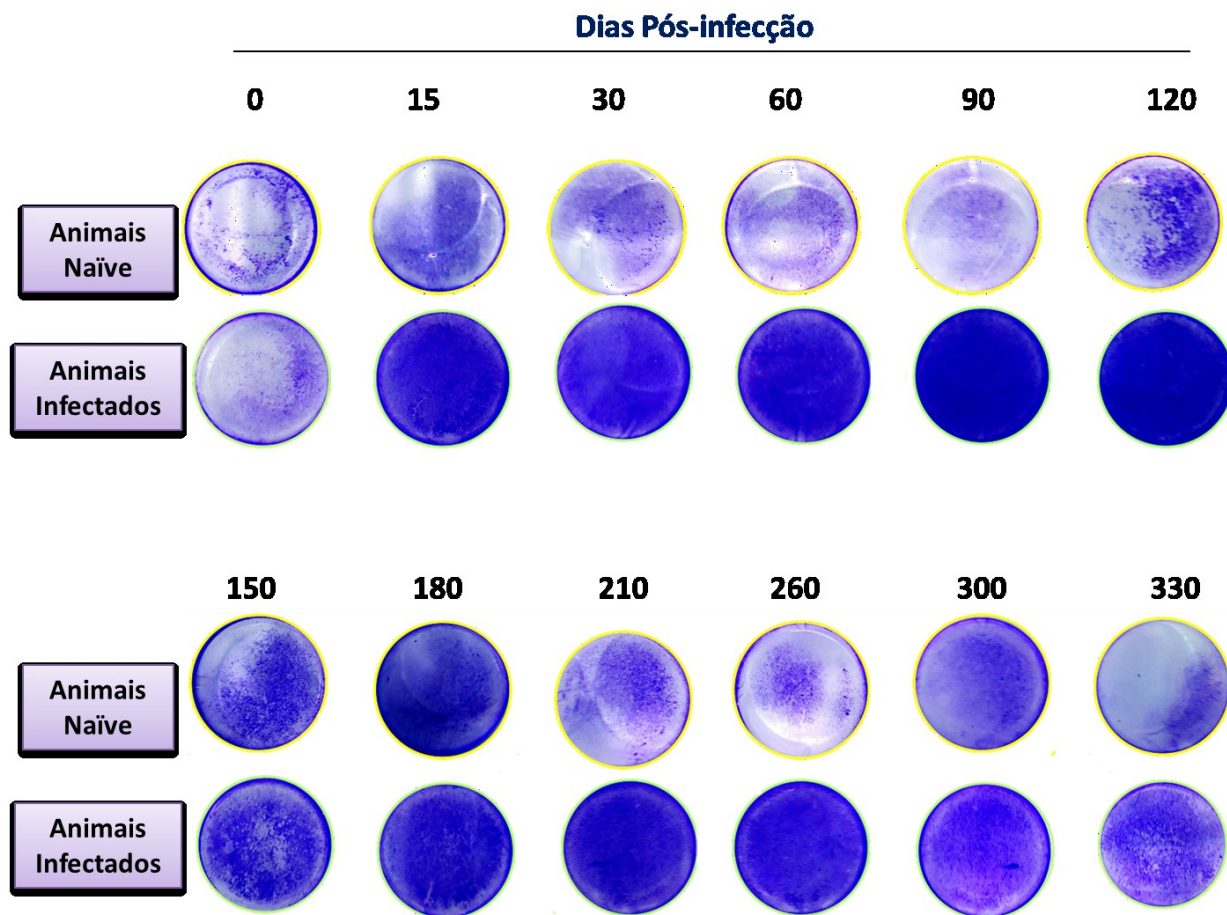
Adicionalmente, pode ser observado que os anticorpos presentes em soro dos bovinos infectados experimentalmente possuem potencial para inibição da proliferação de taquizoítos de *N. caninum* em ensaio de cultura celular *in vitro* (Figura II.8).



**Figura II.6. Cinética de sororeatividade de IgM à *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental.** Níveis de anticorpos IgM para antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) (A) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) (B) foram expressos em índices ELISA (IE). Linhas pontilhadas representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2). A barra vertical verde representa o momento da segunda infecção com *N. caninum* no modelo de infecção experimental bovino.



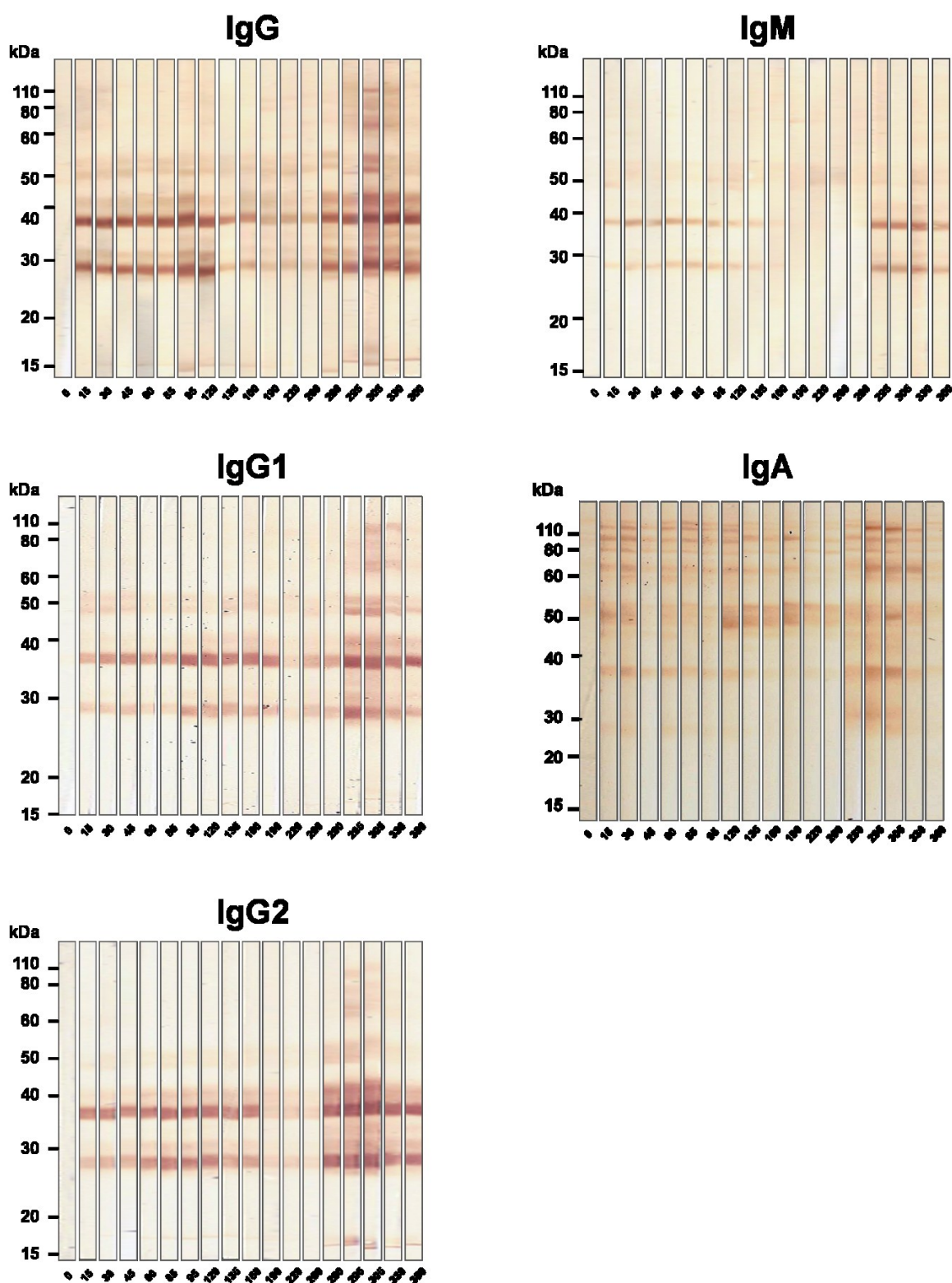
**Figura II.7. Cinética de sororeatividade de IgA à *Neospora caninum* em modelo de infecção experimental.** Níveis de anticorpos IgA para antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) (A) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) (B) foram expressos em índices ELISA (IE). Linhas pontilhadas representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2). A barra vertical verde representa o momento da segunda infecção com *N. caninum* no modelo de infecção experimental bovino.



**Figura II.8. Cinética de proliferação de taquizoítos de *Neospora caninum*.** Celulas HeLa infectadas com *N. caninum* e cultivadas com soro de animais naïve ou infectados com *N. caninum* foram coradas com Solução Cristal Violeta 0,01%. Ausência de coloração indica a presença de lise celular por proliferação de taquizoítos.



Com o intuito de avaliar o perfil de reconhecimento antigênico durante o período de infecção por *N. caninum* em bovino, foram realizados *immunoblot* para cada amostra sorológica utilizando antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) (Figura II.9), antígenos totais de *N. caninum* (Nc Total) (Figura II.10) e antígenos secretados-excretados de *N. caninum* (NcESA) (Figura II.11). Pode ser observado um reconhecimento de bandas de 29 e 36 kDa como frações imunodominantes do NLA para IgG, IgG1 e IgG2. Não foram encontradas distinções de reconhecimento entre IgG1 e IgG2, sendo as bandas 59-60, 80 e 110 kDa do NLA reconhecidas por ambos isotipos após reinfecção. IgM reconheceu de forma imunodominante as frações de 29 e 36 kDa até 135 dias pós-infecção. Essas frações passaram a não serem reconhecidas após esse período, mas voltaram a ser identificadas por IgM no período pós-reinfecção. Semelhante ao ELISA, houve reconhecimento do NLA por IgA durante todo período de infecção analisada. Bandas de alto peso molecular (80, 97 e 110 kDa) e de 37 e 50-52 kDa foram reconhecidas por IgA durante todo o período de infecção. A fração de 29 kDa foi reconhecida fracamente até 120 dias de infecção. Após a reinfecção, pode ser observado marcação da banda de 32 kDa por IgA.



**Figura II.9. Reconhecimento de Antígenos solúvel de *N. caninum* (NLA) imunodominantes mediante infecção experimental de bovinos. O reconhecimento de cada subclasse de imunoglobulina é indicado na parte superior de cada figura.**

As frações de 40, 42 e 50 kDa do antígeno total de *N. caninum* apresentam-se com reconhecimento por IgG de forma imunodominante (Figura II.10). De modo semelhante a fração 42 e 50 foram reconhecida por IgM, IgG1 e IgG2 durante o período de infecção. A IgA demonstrou reconhecer a banda de 50 kDa como imunodominante durante a infecção. IgG1 e IgG2 anti-Nc Total apresentaram um perfil de reconhecimento similar, com distinção nas frações de 34 e 37 kDa que apresentaram maior intensidade de marcação para IgG2 quando comparado a IgG1. Adicionalmente, o reconhecimento das frações de 15 e 24 kDa por IgG e 24 e 28 kDa por IgA foram observados mediante reinfecção.

Os antígenos secretados-excretados (Figura II.11) com pesos moleculares de 29, 30, 34, 36, 40 e 50 kDa foram reconhecidos por IgG de forma imunodominante durante todo o período de infecção. Sendo as bandas de 30 e 36 kDa reconhecidas por IgM de forma semelhante a IgG até 160 dias e logo após reinfecção. As bandas 30 e 36 kDa apresentaram fraco reconhecimento por IgG1 durante a infecção. Contudo essas frações apresentaram forte reconhecimento por IgG1, semelhante ao IgG2 e IgM após o período de reinfecção. Adicionalmente, a banda de 32 kDa apresentou reconhecimento apenas após a reinfecção por IgG1. IgA reconheceu como imunodominante a banda de 60 kDa durante toda infecção. As frações 80 e 110 kDa também puderam ser visualizadas durante a infecção pelo reconhecimento por IgA, mas com fraca marcação.

Adicionalmente, com o objetivo de facilitar a interpretação de possíveis marcadores da neosporose bovina durante a rotina laboratorial, delineamos a partir dos nossos resultados um fluxograma de interpretação de possíveis ensaios sorológicos (Figura II.12).

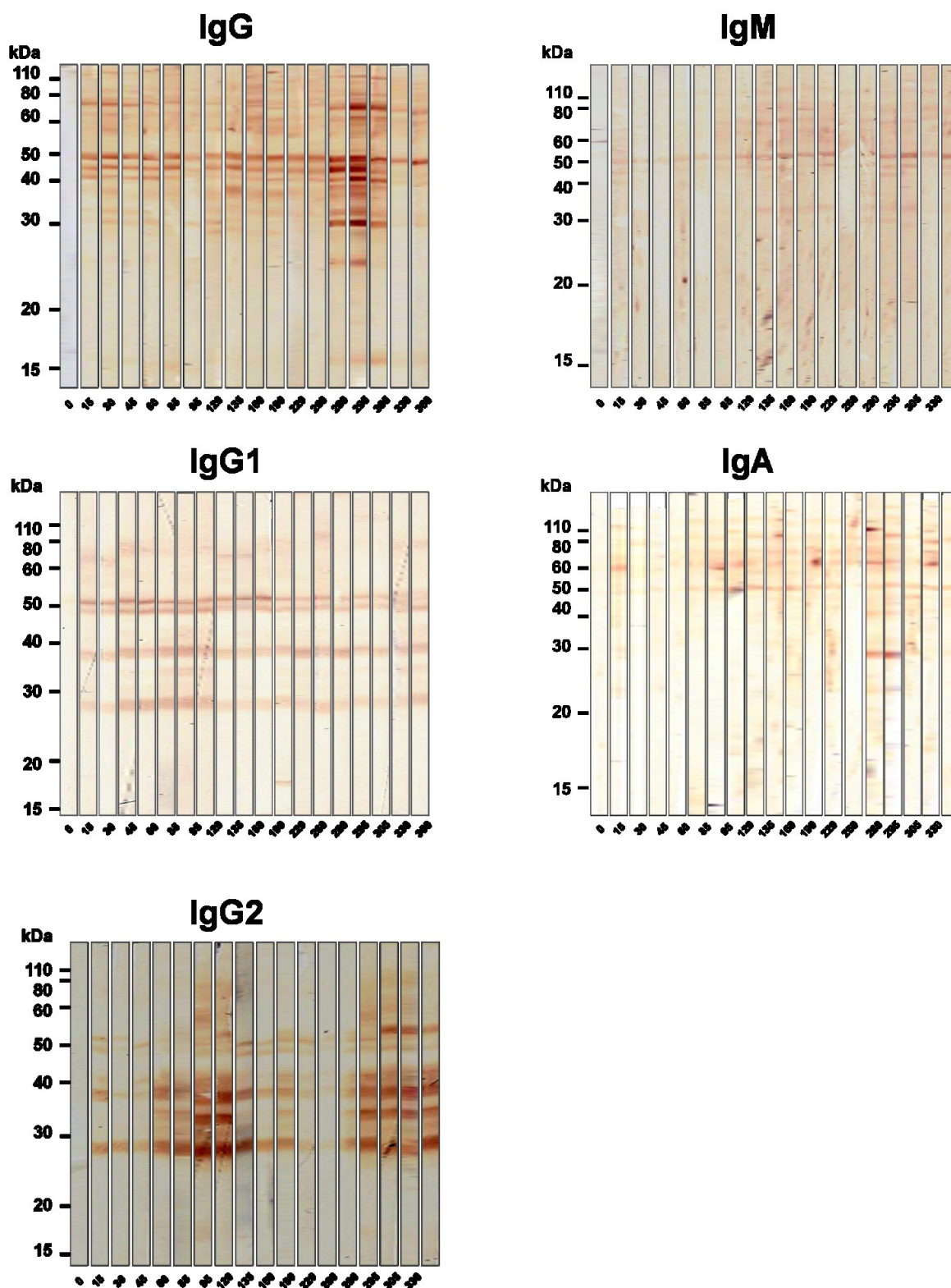
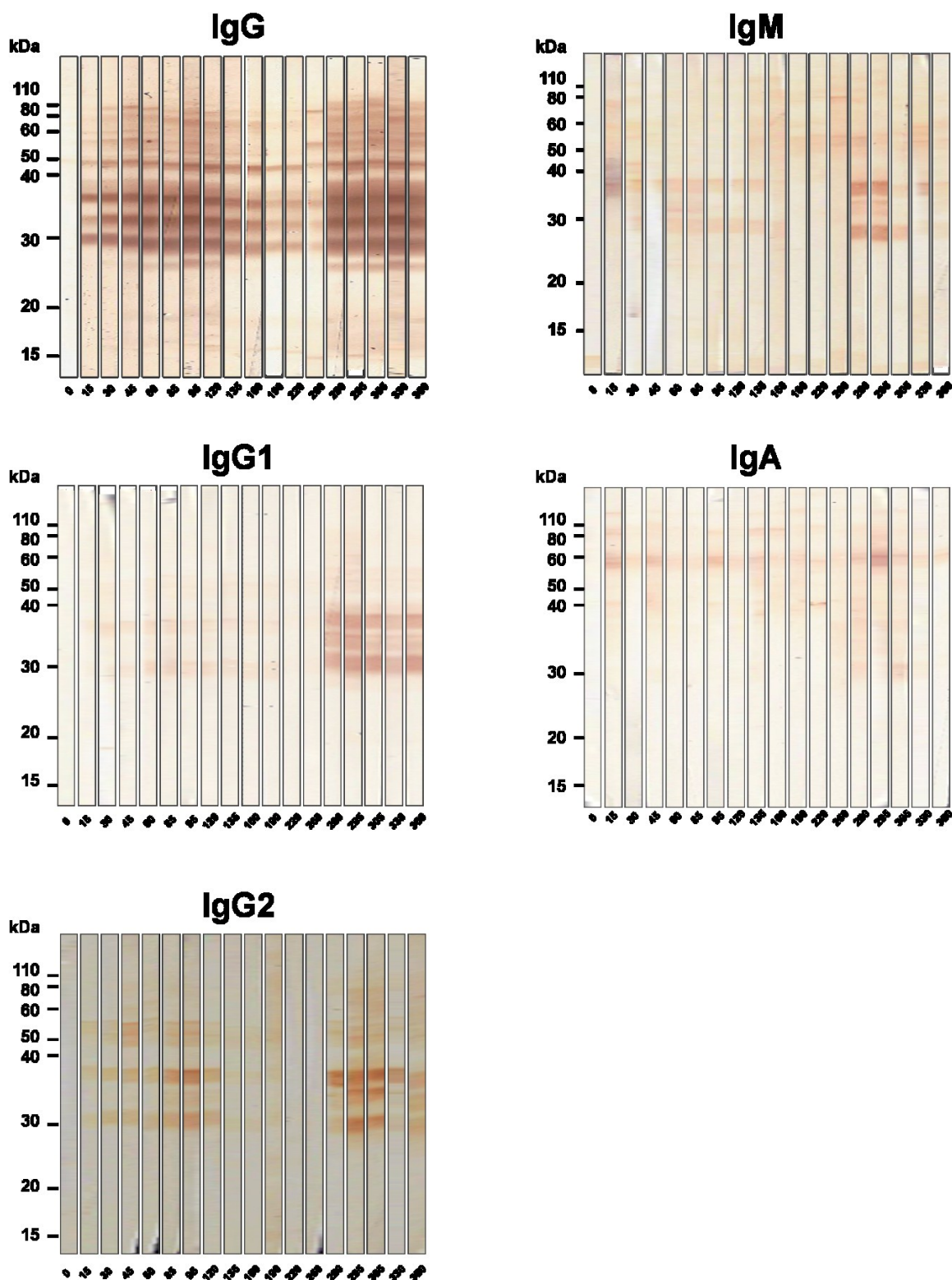
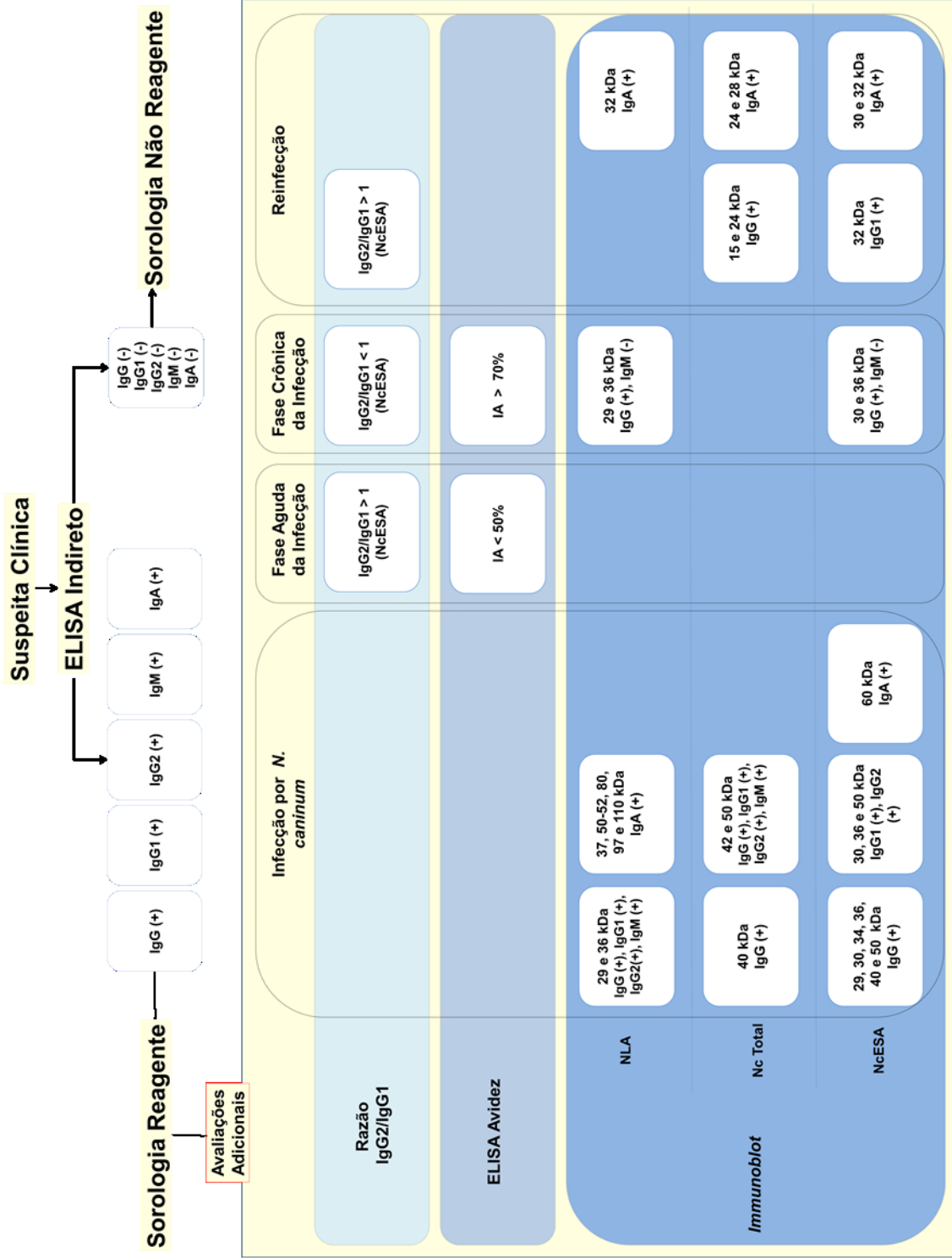


Figura II.10. Reconhecimento de Antígenos Total de *N. caninum* (Nc Total) imunodominantes mediante infecção experimental de bovinos. O reconhecimento de cada subclasse de imunoglobulina é indicado na parte superior de cada figura.



**Figura II.11. Reconhecimento de Antígenos Secretados-Excretados de *N. caninum* (NcESA) imunodominantes mediante infecção experimental de bovinos. O reconhecimento de cada subclasse de imunoglobulina é indicado na parte superior de cada figura.**



**Figura II.12. Fluxograma de interpretação dos possíveis marcadores da neosporose bovina.**

## II.5. Discussão

Distintas técnicas convencionais, como imunofluorescência indireta e ELISA, são utilizadas rotineiramente em inquéritos epidemiológicos e diagnósticos para pesquisa de anticorpos específicos para *N. caninum* (AGUADO-MARTINEZ et al., 2005). Entretanto, poucos são os estudos que caracterizam o perfil de subtipos de imunoglobulinas por um longo período de infecção e os relacionam com fase aguda, crônica e de recrudescência.

Na vida animal, a presença de anticorpos específicos para *N. caninum* pode ser considerado como indicativo de infecção. Estes anticorpos podem permanecer em altos títulos por elevado tempo ou sofrer flutuações durante a gestação (BJÖRKMAN et al., 1999). Estudo utilizando touros infectados com *N. caninum* (cepa Nc-1) observou pico de sororeatividade por IgM, IgG, IgG1 e IgG2 desde os 7 dias de infecção. Contudo, vale salientar que os níveis de IgM apresentaram baixa reatividade durante todo o período de infecção e IgG e IgG1 foram encontrados com títulos médios decrescentes até 91 dias de infecção onde foi realizado a última coleta de soro (FERRE et al., 2008).

Apesar de diferentes estudos demonstrarem que a produção de IgG2 específicos para *N. caninum* é encontrado em maior índice que IgG1 (FERRE et al., 2005; MOORE et al., 2011), estudo realizado por Adrianorive et al., 2001, revelou a presença da possibilidade de três perfis de produção de anticorpos: um perfil com níveis de IgG2 predominante, um com níveis equivalentes entre IgG1 e IgG2 e outro com predomínio de IgG1. Em nossas análises, encontramos os perfis de subclasses dependentes do antígeno utilizado no ensaio sorológico, sendo encontrado maior variabilidade para o NLA do que os antígenos secretados-excretados. Adicionalmente, em nossos estudos pode ser observado um predomínio de IgG2 durante a reinfeção independente do antígeno utilizado no imunoensaio.

Infeções experimentais em fêmeas gestantes revelaram que os animais demoraram 21 dias para produzirem anticorpos IgG antígenos-específicos. Contudo, estes animais demoraram apenas sete dias para produzirem anticorpos após reinfeção (BARTLEY et al., 2004). Adicionalmente, foram observados anticorpos IgM e IgG nos fetos de mães primo-infectadas e reinfectadas

(BARTLEY et al., 2004). Este fato sugere que a resposta imunológica formada durante a primeira infecção não é suficiente para um efeito protetor da neosporose congênita em casos de reinfecção.

Os testes imunoenzimáticos também têm sido úteis em estudos epidemiológicos para discriminação entre abortos provenientes de infecção pós-natal recente, onde a maioria dos animais apresentam anticorpos de baixa avides, e abortos endêmicos associados à recrudescência de animais portadores de infecção crônica, onde os animais apresentam anticorpos de elevada avides. Entretanto, ainda existem incertezas nestes casos sobre potencialidades desses testes para a classificação de uma possível reinfecção de uma recrudescência em um animal com infecção crônica (AGUADO-MARTINEZ et al., 2005).

O índice avides em amostra de soro de animais com presença de abortos geralmente são expressos em valores menores que os de animais sem problemas de abortos (BJÖRKMAN et al., 1999). A Avides de IgG em soros coletados de bovinos apresentaram um significativo aumento da avides em amostras coletadas semanas a meses após o aborto (SANGER et al., 2003). McAllister et al., 2000, encontrou após 14 a 85 dias pós-surto de abortos elevação da avides da IgG. Em outro estudo, um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o antígeno de superfície p38 (NcSRS2) de *N. caninum* observou que soros de bovinos infectados por via intravenosa apresentou IA p38-específico variando de inicialmente 20 a 40% até 50 e 80% após 23 e 91 dias pós-infecção, respectivamente. Nesse estudo, a presença de IA baixos p38-específico foram associados com abortos (SCHARES et al., 2002). Estes achados indicam que a presença de anticorpos de baixa avides esta diretamente associado com um indicador de risco de aborto.

AGUADO-MARTINEZ et al., 2005 em estudo para diferenciar fase da neosporose determinou que o ELISA avides foi capaz de distinguir infecção primária de infecção crônica. Contudo, ELISA ou *immunoblot* avides não permitiu a discriminação dos casos de reinfecção ou recrudescência de infecção crônica. Contudo foram encontrados baixos IA para as frações de 17, 34-35, 36-37 e 60-62 kDa com 4 semana de infecção. Índices de alta avides foram encontrados para estas frações após a 20<sup>o</sup> semana.



Björkman et al., 1999, em estudos com bovinos infectados experimentalmente com cepas Nc-SweB1 ou Nc-1 sugerem que IA<35% pode ser um indicador de bovinos com infecção aguda e IA>50% foram encontrados nos animais com maior ou igual oito semanas de infecção. Entretanto, devido a possível variação do IA individual entre os animais, os autores sugerem que análises pareadas de soros coletados em diferentes períodos poderão mensurar de forma mais confiável a fase de infecção com *N. caninum*. Adicionalmente, nesse estudo pode ser observado que no modelo experimental de infecção, independente da cepa utilizada (Nc-SweB1 ou Nc-1), da dose ( $10^6$  ou  $10^8$ , em dose individual ou por três dias consecutivos) e da via de infecção (subcutânea ou intravenosa), os animais apresentaram similaridade nos valores de avides para IgG presente no soros dos animais. Este fato potencializa a transposição dos dados encontrados no estudo experimental para comparação dos achados de soros animais provenientes do campo com via de infecção desconhecida.

Em nossos estudos encontramos IA próximos a 50% desde quatro semanas de infecção. Esses achados sustentam a ideia que IA < 50% são encontrados em fase iniciais da neosporose bovina. Contudo, devido a rápida maturação da IgG sugerimos a coleta seriada de soro para avaliação dos títulos de reatividade ou diagnóstico laboratorial utilizando antígenos com melhor potencial de distinção na maturação da avides de IgG em diferentes fases da doença.

Poucos estudos de imunoproteômicas são realizados para identificação de proteínas de *N. caninum*. Shin, Lee e Jung, 2005, avaliando o perfil de reconhecimento em antígeno total de *N. caninum*, observaram distintos perfis de proteínas imunodominantes por IgM (29, 33, 37,46, 49, 55, 69, 72, 79, 103 kDa), IgG (33, 37, 46, 55,75, 79 kDa), IgE (30, 41, 46, 61,69 kDa) e IgA (63 e 72 kDa). Já outro estudo mais detalhado realizado por Shin et al., 2004, com objetivo de identificar os antígenos de *N. caninum* reconhecidos por diferentes imunoglobulina de bovinos, 132, 84, 4, e 40 spots proteicos foram identificados por IgM, IgE, IgA e IgG respectivamente. Dentre as proteínas reconhecidas por IgM foram identificadas a cadeia- $\beta$  da tubulina (54,3 kDa), frutose-1,6-bisfosfatase (41,47 kDa) e a proteína GRA2 (28,8 kDa). Já as proteínas HSP70 (69,2 kDa), piruvato quinase (61,3 kDa), cadeia- $\alpha$  da tubulina (56,1 kDa), actina (45,6-45,9

kDa), proteína ribossomal S2 (40,9-41,2 kDa), e NCDG-1 (32,9-33,4 kDa) foram reconhecidas por IgM e IgG. Por outro lado a proteína NTPase (64,1 kDa), HSP60 (61,5 kDa), cadeia- $\alpha$  da tubulina, proteína putativa disulfeto isomerase (53,7 kDa), enolase (53,7 kDa), lactato desidrogenase (40,4 kDa), serina-treonina fosfatase (37,9 kDa) e proteína homologa 14-3-3 (35,3 kDa) foram identificadas por IgM e IgE. A IgA detectou apenas 4 spots sendo um deles a HSP70. Entretanto, estes estudos não relacionam as proteínas identificadas com o perfil de reconhecimento sorológico em distintas fases da doença.

A proteína dissulfeto isomerase de *N. caninum* (NcPDI; 50kDa), presente no antígeno total do parasito, é uma chaperona com importante papel no enovelamento de proteínas presentes no retículo endoplasmático. Com o objetivo de determinar se IgA presentes em mucosas poderiam reconhecer a NcPDI, Liao et al., 2006, revelou que IgA em lágrimas de 58% (30/52) de bovinos foi capaz de reconhecer a NcPDI recombinante e nativa em amostras de lisado parasitário por *immunoblot*. Em nossos resultados, as frações de 50 kDa presentes em NLA e Nc Total foram encontradas como imunodominante durante todo o período de infecção por IgA. Esses, dados sugerem que a fração de 50 kDa pode ser utilizado como proteína imunodominante para diagnóstico da neosporose a partir da utilização de amostras sorológicas ou provenientes de mucosa. Contudo, aparentemente o reconhecimento da fração de 50 kDa não produz a informação sobre em qual fase da doença os animais soropositivos se encontram.

Apesar de nossos estudos terem revelados distintos padrões de reconhecimento nas frações antigênicas estudadas, estudos complementares para identificação da proteínas com potencial do diagnóstico diferencial na neosporose se tornam necessários.

### 3. Discussão Geral

Divergências entre os resultados de distintos imunoenaios proveniente de diferentes grupos de pesquisas são encontrados dependendo do *cut off* estabelecido para cada reação. Limiar de reatividade este estabelecido por parâmetros locais dependentes do ambiente e de materiais de consumo disponíveis nos laboratórios. Devido aos conflitos de resultados presentes entre diferentes laboratórios e muitas vezes discordantes entre ELISA e IFAT, recomenda-se a utilização de uma terceira técnica, como o *immunoblot*, com potencialidade de distinção dos resultados entre positivos e negativos.

Em experimentos prévios do nosso grupo, com o objetivo de avaliar antígenos de *N. caninum* reconhecidos por soros de cães infectados, três bandas de NLA foram consideradas imunodominantes (17, 29-32, 35-37 kDa) e 86% dos soros com positividade concordantes entre IFAT e ELISA reconheceram pelo menos dois desses antígenos (29-32 e 35-37 kDa). Já os soros com resultados discordantes, onde apresentaram positividade para ELISA ou IFAT apenas, reconheceram as bandas de 35-37 kDa. Estes resultados indicam que divergências de reatividade sorológica obtidas nos imunoenaios não são dependentes apenas da sensibilidade e especificidade de cada técnica, mas da relação destes com a diversidade de anticorpos produzidos por cada animal.

Devido o número de hospedeiros comuns na natureza para *N. caninum* e *T. gondii* e da proximidade filogenética entre estes protozoários, o diagnóstico sorológico de animais coparasitados ou animais infectados por único parasito podem ser comprometidos pela presença da reatividade cruzada. Diversos são os trabalhos soropidemiológicos que expressam distintos perfis de infecção dependentes, do local de coleta e do ensaio utilizado. Em caninos, por exemplo, observam-se soropositividades variáveis para anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* por meio de teste de imunofluorescência indireta (ROMANELLI et al., 2007; FIGUEREDO et al., 2008; YILDIZ et al., 2009; VALADAS et al., 2010; MINERVINO et al., 2012). Valadas et al., 2010, demonstraram soropositividade de 69,8% para anticorpos anti-*T. gondii* e 12,4% para anticorpos anti-*N. caninum*, já Romanelli et al. (2007) apontaram positividade de 29,1% para anticorpos anti-*N. caninum* e 20,8% para anticorpos anti-*T. gondii*.

Em caprinos, Moraes et al. (2011) encontraram por IFAT a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em 17,39% e 3,35%, respectivamente. Outros trabalhos, apontaram em caprinos maior positividade de IgG anti-*T. gondii* do que anti-*N. caninum* utilizando ELISA (CZOPOWICZ, et al., 2011; GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2012).

Silva et al. (2007) revelou por ensaio de inibição heteróloga de reconhecimento de frações antigênicas por *Immunoblot*, que bandas com peso molecular acima de 40 são as que apresentam maior reatividade cruzada e que os antígenos com peso inferior a 35 kDa são espécie específicos. Em nossos resultados encontramos reatividade cruzada para os antígenos de *N. Caninum* com alto peso no NLA (80-110 kDa), para NLA-NcESA com bandas acima de 32 kDa e para bandas acima de 64 kDa do NcESA. Já para os antígenos de *T. gondii* foram encontradas reatividade cruzada para bandas variando entre 34-50 kDa de STAg e STAg-TgESA e bandas acima de 33-34 kDa para TgESA. Dessa forma frações antigênicas menores que 32 kDa de NLA e abaixo de 60 de NcESA seriam possíveis candidatos para o diagnósticos da neosporose e frações com peso moleculares abaixo de 33-34 kDa para STAg e TgESA ou superior a 50 kDa para o STAg-TgESA são potenciais para o diagnóstico da toxoplasmose, com diminuição da possibilidade de reatividade cruzada entre os parasitos em questão.

Embora estudos tenham revelado a potencialidade de infecção natural por *T. gondii* (COSTA et al., 2011) e de transmissão congênita em bovinos com potencialidade de abortos (WIENGCHAROEN et al., 2011) a presença desse parasito em bovinos é pouco encontrado. Panadero et al. (2010) revelaram positividade de anticorpos anti-*N. caninum* em 24,1% e anti-*T. gondii* em 7,3% em bovinos por meio de testes de aglutinação e ELISA. Entretanto, Yildiz et al., 2009, encontraram maior soroprevalência, onde 24,77% (138/557) dos animais avaliados foram soropositivos para *T. gondii*. Nesse mesmo estudo foi revelada a presença de copositividade de 8% entre *N. caninum* (ELISA) e *T. gondii* (*Sabin-Feldman dye test* (SFDT)) (YILDIZ et al., 2009). Entretanto, apesar da baixa soroprevalência para *T. gondii* ser encontrada em bovinos, antígenos com ausência de reatividade heteróloga entre *N. caninum* e *T. gondii* pode favorecer

aumento nos valores de especificidade dos possíveis diagnósticos utilizados na rotina laboratorial.

Em nosso estudo encontramos perfis variáveis de reconhecimento de bandas imunodominantes no *immunoblot* dependendo da fração antigênica, do isotipo de imunoglobulina e do tempo de infecção experimental em bovinos e murinos. Em ambos modelos experimentais, soro de bovinos e murinos infectados com *N. caninum* reconheceram como imunodominante as bandas 29 e 36 kDa de NLA. Bandas estas consideradas como imunodominante no reconhecimento antigênico por soros de ovinos, caninos, murinos e bovinos (HOWE et al., 1998; ALMEIDA, 2004; SILVA et al., 2007). As bandas de alto peso moleculares no NLA (80-110 kDa) foram reconhecida por IgA como imunodominante durante a infecção experimental bovina. Contudo estas bandas apresentaram reatividade cruzada com soro de camundongos infectados com *T. gondii*. Adicionalmente, apesar das bandas de alto peso não serem reconhecido em nossos soros controles, existe relato de reconhecimento inespecífico das bandas de 83 e 110 kDa por soro de ovinos com sorologia negativa para *N. caninum* (ALMEIDA, 2004).

Apesar dos antígenos secretados/excretados de *N. caninum* apresentarem uma menor variabilidade de bandas imunodominantes, o NcESA apresentou reconhecimento antigênico durante todo o período de infecção bovina. Considerando assim, o elevado reconhecimento imunogênico e a baixa reatividade cruzada encontradas com soro de camundongos infectados com *T. gondii*, o NcESA possui elevado potencial para sua utilização como insumo para o diagnóstico da neosporose. Contudo, as associações de diferentes técnicas de diagnóstico podem elucidar o perfil de infecção favorecendo a distinção entre fases iniciais, tardias e de reinfeção da neosporose bovina.

## 4. Conclusão

### 4.1. Capítulo I:

- Antígenos de superfície apresentam rápido reconhecimento antigênico no início da infecção com *N. caninum* e *T. gondii* por IFAT, sendo encontrada reatividade para antígenos da porção apical de taquizoítos de *N. caninum* com soros de camundongos infectados com *T. gondii*. Este perfil de reatividade cruzada foi ausente para taquizoítos de *T. gondii* na presença soros de camundongos infectados com *N. caninum*;

- Os antígenos solúveis e antígenos solúveis depletados de proteínas secretadas/excretadas (STAg/NLA e STAg-TgESA/NLA-NcESA, respectivamente) são as frações antigênicas com maiores limiares de reatividade por TG-ROC, o que sugere a presença de maior reatividade inespecífica quando comparado ao NcESA e antígenos de superfície utilizados no estudo;

- A reatividade cruzada é intensa por ELISA para antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg e STAg-TgESA) em soros de animais infectados com *N. caninum*. Já o NLA e NLA-NcESA apresentam menores índices de reconhecimento heterólogo;

- O NcESA é a fração com maior potencialidade de distinção de infecção pelos parasitos em estudo, perfil este não observado em TgESA;

- Reatividade cruzada é observada para os antígenos de *N. caninum* com alto peso molecular no NLA (80-110 kDa) e para com bandas acima de 32 kDa e 64 kDa do NLA-NcESA e NcESA, respectivamente. Dessa forma, frações antigênicas menores que 32 kDa do NLA e inferiores a 60 kDa de NcESA são os possíveis candidatos para o diagnóstico da neosporose com significativa diminuição da possibilidade de reatividade cruzada com *T. gondii*;

#### 4.2. Capítulo II:

- Bovinos infectados experimentalmente com *N. caninum* apresentam anticorpos IgG (Total, IgG1, IgG2), IgM e IgA específicos para NLA e NcESA após 15 dias de infecção;

- Existe o predomínio de IgG2/IgG1 específico para NLA no início da infecção ou após reinfecção. Contudo, leve predomínio de IgG1 sobre IgG2 específico para NcESA pode ser encontrado em fase tardia da infecção;

- Por ELISA, a produção de IgM e IgA, anti- NLA e NcESA, não podem ser associados a fase aguda da neosporose bovina;

- Índices de avidéz inferiores a 50% e superiores a 70% estão associados com fase inicial e tardia da infecção, respectivamente;

- São consideradas imunodominantes as bandas de 29 e 36 kDa de NLA para IgG, IgG1 e IgG2, 42 e 50 kDa do antígenos total de *N. caninum* para IgG, IgG1, IgG2 e IgM e 30, 32, 36, 40 e 50 kDa de NcESA para IgG;

- Distintas bandas foram consideradas como marcadores de reinfecção da neosporose. Sendo o reconhecimento das bandas 59-60, 80 e 110 kDa de NLA por IgG1 e IgG2 e 32 kDa desse mesmo antígeno por IgA associado a reinfecção;

- Para antígenos totais de *N. caninum*, as bandas de 15 e 24 kDa reconhecidas por IgG e 24 e 28 kDa por IgA, foram consideradas indicadores de reinfecção da neosporose bovina. Já para NcESA foram consideradas marcadores de reinfecção o reconhecimento da banda de 32 kDa por IgG1 e 30 e 32 kDa por IgA;

- O perfil de marcação, IgG(+) e IgM(-), para as bandas 32 e 36 kDa do NcESA estão associados com fase crônica da infecção;

#### 4.3. Conclusão Geral

- A associação de diferentes técnicas de diagnóstico com diferentes frações antigênicas podem elucidar o perfil de infecção favorecendo a distinção específica entre fases iniciais, tardias e de reinfecção da neosporose.



## Referências Bibliográficas

- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; ARNAIZ-SECO, I.; INNES, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n.5, p. 442-450, 2005.
- ALBUQUERQUE, G.R.; MUNHOZ, A.D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R.T.; ALMEIDA, C.R.; MEDEIROS, S.M.; LOPES, C.W. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle from Sul Fluminense Paraíba Valley, State of Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 125-128, 2005.
- ALMEIDA, M.A.O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, s.1, p 37-40, 2004.
- ALMERÍA, S.; NOGAREDA, C.; SANTOLARIA, P.; GARCIA-ISPIERTO, I.; YÁÑIZ, J.L.; LÓPEZ-GATIUS, F. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 130, n. 1-2, p. 35-42, 2009.
- ANDRIANARIVO, A.G.; BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; ROWE, J.D.; PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v.87, n.10, p. 817-825, 2001.
- Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Veterinary Parasitologic**, v. 112, n. 1-2, p. 1-10, 2003.
- BARLING, K. S.; McNEILL, J. W.; THOMPSON, J. A.; PASCHAL, J. C.; McCOLLUM III, T.; CRAIG, T. M.; ADAMS, G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 217, n. 9, p. 1356-1360, 2000.
- BARTLEY, P.M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S.W.; SCHOCK, A.; RAE, A.G.; HAMILTON, C.; INNES, E.A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 81-91, 2004.
- BELLI, S.I.; WALKER, R.A.; FLOWERS, S.A. Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. **Proteomics**, v. 5(4):918-24, 2005.
- BJERKAS, I.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 1, n.2, p.214-21, 1994.

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

BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O.J.M.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Vet. Parasitol.** v. 68, p.251-260, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CONRAD, P.A.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J.P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. **Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993.

COSTA, G.H.; DA COSTA, A.J.; LOPES, W.D.; BRESCIANI, K.D.; DOS SANTOS, T.R.; ESPER, C.R.; SANTANA, A.E. *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 277-81, 2011.

COSTA, G.H.N.; CABRAL, D.D.; VARANDAS, N.P.; SOBRAL, E.A.; BORGES, F.A.; CASTAGNOLLI, K.C. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Ciências Agrárias**, v. 22, p. 61-66, 2001.

CZOPOWICZ, M.; KABA, J.; SZALUS-JORDANOW, O.; NOWICKI, M.; WITKOWSKI, L.; FRYMUS, T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Veterinary parasitology*, v. 178, n. 339-341, 2011.

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

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

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep: The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163:1-14, 2009.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, Toxoplasmosis and Sarcocystosis in Ruminants. **Vet Clin Food Anim**, v. 22, p. 645–671, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323–367, 2007.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S.W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 155-171, 1999.

FAJARDO, H.V.; D'AVILA, S.; BASTOS, R.R.; CYRINO, C.D.; DE LIMA DETONI, M.; GARCIA, J.L.; DAS NEVES, L.B.; NICOLAU, J.L.; AMENDOEIRA, M.R. Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 191, 2013.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n.5, p.1504-1518, 2005.

FERRE, I.; SERRANO-MARTÍNEZ, E.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 905-911, 2008.

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

GANLEY, J.P.; COMSTOCK, G.W. Association of cats and toxoplasmosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 111, p. 238-246, 1980.

GARCÍA, G.A.; PÉREZ, I.L.; INNES, E.; FERNANDEZ, E.C.; GARCIA, A.F.; BAUTISTA, M.G.; MORA, L.M.O. Use of an immunodominant P17 antigenic fraction of *Neospora caninum* in detection of antibody response in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n. 5, p. 529-34, 2006.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; CABEZON, O.; PABON, M.; GOMEZ-GUILLAMON, F.; ARENAS, A.; ALCAIDE, E.; SALAS-VEGA, R.; DUBEY, J.P.; ALMERIA, S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). **Veterinary Journal**, v. 191, p. 257-260, 2012.

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

GOVERNO FEDERAL DO BRASIL. Agricultura: Importância estratégica. <http://www.sae.gov.br/brasil2022/?p=318>, acesso: 12/09/2013, 02:29.

HE, P.; LI, J.; GONG, P.; LIU, C.; ZHANG, G.; YANG, J.; TUO, W.; YANG, B.; ZHANG, X. *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattle neosporosis. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2117-2120, 2013.

HEMPHILL, A.; FELLEISEN, R.; CONNOLLY, B.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; MÜLLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. **Parasitology**, v. 15, p. 581-590, 1997.

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

HOSSEININEJAD, M.; HOSSEINI, F.; MOSHARRAF, M.; SHAHBAZ, S.; MAHZOUNIEH, M.; SCHARES, G. Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 337-42, 2010.

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

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

HOWE, D.K.; TANG, K.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle

based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 3, p.611-5, 2002.

IBGE. Censo demográfico.

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/popul/default.asp?t=3&z=t&o=25&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>, acesso: 12/09/2013, 02:39.

IBGE. Efetivos dos rebanhos.

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>, acesso: 12/09/2013, 02:30.

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

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

INNES, E.A.; LUNDEN, A.; ESTEBAN, I.; MARKS, J.; MALEY, S.; WRIGHT, S.; RAE, A.; HARKINS, D.; VERMEULEN, A.; MCKENDRICK, I.J.; BUXTON, D.; A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 121-132, 2001.

INNES, E.A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, 2005.

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

KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KATIC-RADIVOJEVIC, S.; NIKOLIC, A. Crosssectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 121-131, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LASRI, S.; DE MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.25-32, 2004.

LEE, E.G.; KIM, J.H.; SHIN, Y.S.; SHIN, G.W.; KIM, Y.R.; PALAKSHA, K.J.; KIM, D.Y.; YAMANE, I. KIM, Y.H.; KIM, G.S.; SUH, M.D.; JUNG, T.S. Application of proteomics for comparison of proteome of *Neospora caninum* and *Toxoplasma*

*gondii* tachyzoites. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 815(1-2):305-14, 2005.

LI, L.; CRABTREE, J.; FISCHER, S.; PINNEY, D.; STOECKERT, C.J.JR.; SIBLEY, L.D.; ROOS, D.S. ApiEST-DB: analyzing clustered EST data of the apicomplexan parasites. **Nucleic acids research**, v. 32, p. 326-328, 2004.

LIAO, M.; MA, L.; BANNAI, H.; LEE, E.G.; XIE, Z.; TANG, X.; ZHANG, H.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Identification of a protein disulfide isomerase of *Neospora caninum* in excretory-secretory products and its IgA binding and enzymatic activities. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 47-56, 2006.

LIAO, M.; XUAN, X.; HUANG, X.; SHIRAFUGI, H.; FUKUMOTO, S.; HIRATA, H.; SUZUKI, H.; FUJISAKI, K. Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 130, p.481-488, 2005.

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

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

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

MARCOLINO, P. T.; SILVA, D. A. O.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western Blotting. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.3, p.384-389, 2000.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLIS, R.A.; McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MCALLISTER, M.M.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 6, p. 881-887, 2000.

MINEO, J.R.; CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection Immune**, v. 27, p. 283-287, 1980.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.; VON ANCKEN, A.C.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 4, p. 239-45, 2001.

MINERVINO, A.H.; CASSINELLI, A.B.; DE LIMA, J.T.; SOARES, H.S.; MALHEIROS, A.F.; MARCILI, A.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti- *Neospora caninum* and anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from two different indigenous communities in the Brazilian Amazon Region. **The Journal of Parasitology**, v. 98, p. 1276-1278, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Bovinos e bubalinos:  
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>, acesso: 12/09/2013, 02:33.

MOORE, D.P.; ECHAIDE, I.; VERNA, A.E.; LEUNDA, M.R.; CANO, A.; PEREYRA, S.; ZAMORANO, P.I.; ODEÓN, A.C.; CAMPERO, C.M. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 245-51, 2011.

MORAES, L.M.; RAIMUNDO, J.M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H.A.; MACEDO JUNIOR, G.L.; MASSARD, C.L.; MACHADO, R.Z.; BALDANI, C.D. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20(4):312-7, 2011.

MORENO, B.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L.M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Veterinary Parasitology*, v. 187, p. 312-318, 2012.

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

NEMATOLLAHI, A.; MOGHDDAN, G. Survey on Seroprevalence of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Cattle in Tabriz (Iran) by IFAT. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, p. 40-42, 2008.

ORDEIX, L.; LLORET, A.; FONDEVILA, D.; DUBEY, J. P.; FERRER, L.; FONDATI, A. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n.5, p.415-419, 2002.

PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; LOPEZ, C.; VAZQUEZ, L.; PAZ, A.; DIAZ, P.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; FERNANDEZ, G.; LAGO, N.; DIEZ-BANOS, P.; MORRONDO, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in

wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 111-115, 2010.

PARE, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v. 7, p. 352-359, 1995.

PERLÉ, K.D.M.; PIERO, F.; CARR, R.F.; HARRIS, C.; STROMBERG, P.C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, n.3, p.252-255, 2001.

PINHEIRO, J.W.; MOTA, R.A.; OLIVEIRA, A.A.; FARIA, E.B.; GONDIM, L.F.; DA SILVA, A.V.; ANDERLINI, G.A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 105, p. 709-715, 2009.

REICHEL, M.P.; ALEJANDRA, A. M.; GONDIM, L.F.; ELLIS, J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **Intrnational Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133-42, 2013.

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

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

SAGER, H.; GLOOR, M.; BJÖRKMAN, C.; KRITZNER, S.; GOTTSTEIN B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 1-2, p. 1-10, 2013.

SANTOS, S.L.; DE SOUZA COSTA, K.; GONDIM, L.Q.; DA SILVA, M.S.; UZEDA, R.S.; ABESANDES, K.; GONDIM, L.F. INVESTIGATION of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitology Research**, v. 106, p. 457-461, 2010.

SASAI, K.; LILLEHOJ, H.S.; HEMPHILL, A.; MATSUDA, H.; HANIOKA, Y.; FUKATA, T.; BABA, E.; ARAKAWA, A. A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora*, and *Toxoplasma*. **The Journal of parasitology**, v. 84, p. 654-656, 1998.



SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; SÖNDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRÖDER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F.J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n.4, p. 293-305, 2002.

SHIN, Y.S.; LEE, E.G.; JUNG, T.S. Exploration of immunoblot profiles of *Neospora caninum* probed with different bovine immunoglobulin classes. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, n. 2, p. 157-160, 2005.

SHIN, Y.S.; LEE, E.G.; SHIN, G.W.; KIM, Y.R.; LEE, E.Y.; KIM, J.H.; JANG, H.; GERSHWIN, L.J.; KIM, D.Y.; KIM, Y.H.; KIM, G.S.; SUH, M.D.; JUNG, T.S. Identification of antigenic proteins from *Neospora caninum* recognized by bovine immunoglobulins M, E, A and G using immunoproteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 11, p. 3600-3609, 2004.

SILVA, D.A.O., SILVA, N.M., MINEO, T.W.P., PAJUABA NETO, A.A., FERRO, E.A., MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, 107, 181-195, 2002

SILVA, D.A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p.234-244, 2007.

SILVA, D.A.O.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1212-1216, 2005.

STAUBLI, D.; NUNEZ, S.; SAGER, H.; SCHARES, G.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. **Parasitology Research**, v. 99, n. 6, p. 648-58, 2006.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

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

- TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558-561, 2000.
- VALADAS, S.; MINERVINO, A.H.; LIMA, V.M.; SOARES, R.M.; ORTOLANI, E.L.; GENNARI, S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Para State, Amazon, Brazil. **Parasitology Research**, v. 107, p. 453-457, 2010.
- WASTLING, J.M.; XIA, D.; SOHAL, A.; CHAUSSEPIED, M.; PAIN, A.; LANGSLEY, G. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa--where's the message? **International Journal for Parasitology**, v. 39(2):135-43, 2009.
- WESTON, J.F.; WILLIAMSON, N.B.; POMROY, W.E. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, n.2, p. 142-148, 2005.
- WIENGCHAROEN, J.; THOMPSON, R.C.; NAKTHONG, C.; RATTANAKORN, P.; SUKTHANA, Y. Transplacental transmission in cattle: is *Toxoplasma gondii* less potent than *Neospora caninum*? **Parasitology Research**, v. 108, n. 5, p. 1235-1241, 2011.
- WILLIAMS, D.J.; MCGARRY, J.; GUY, F.; BARBER, J.; TREES, A.J. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 13, p. 328-31, 1997.
- WILLIAMS, D.J.L.; HARTLEY, C.S.; BJO RKMAN, C.; TREES, A.J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v.136, p. 1895–1900, 2009.
- YBAÑEZ, R.H.; TERKAWI, M.A.; KAMEYAMA, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum* infection. **Clinical Vaccine Immunology**, 2013, *in press*.
- YILDIZ, K.; YASA DURU, S.; YAGCI, B.B.; BABUR, C.; OCAL, N.; GURCAN, S.; KARACA, S. Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. **Acta Parasitologica Turcica**, v. 33, p.116-119, 2009.
- YIN, J.; QU, G.; CAO, L.; LI, Q.; FETTERER, R.; FENG, X.; LIU, Q.; WANG, G.; QI, D.; ZHANG, X.; MIRAMONTES, E.; JENKINS, M.; ZHANG, N.; TUO, W. Characterization of *Neospora caninum* microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnostic marker for neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p.28-35, 2012.

ZHANG, H.; COMPAORE, M.K.; LEE, E.G.; LIAO, M.; ZHANG, G.; SUGIMOTO, C.; FUJISAKI, K.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 151, p. 205-12, 2007.

ZHANG, H.; LEE, .E.G.; YU, L.; KAWANO, S.; HUANG, P.; LIAO, M.; KAWASE, O.; ZHANG, G.; ZHOU, J.; FUJISAKI, K.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. **Parasitology Research**, v. 109, n.3, p. 899-911, 2011