



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”



**NcROP4 como um marcador de fase crônica no sorodiagnóstico da
infecção por *Neospora caninum***

Eliézer Lucas Pires Ramos

Uberlândia – MG

Julho – 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia



**NcROP4 como um marcador de fase crônica no sorodiagnóstico da
infecção por *Neospora caninum***

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte de obtenção do título de
Mestre.

Eliézer Lucas Pires Ramos

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Orientador

Uberlândia – MG

Julho – 2014

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

R175n
2014 Ramos, Eliézer Lucas Pires, 1990-
 NcROP4 como um marcador de fase crônica no sorodiagnóstico da
 infecção por *Neospora caninum* / Eliézer Lucas Pires Ramos. - 2014.
 89 f. : il.

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

 1. Protozoário - Teses. 2. Sorodiagnóstico - Teses. 3. Proteínas -
 Teses. 4. Infecção - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca.
 II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em
 Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Eliézer Lucas Pires Ramos

“NcROP4 como um marcador de fase crônica no sorodiagnóstico da infecção por *Neospora caninum*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de julho de 2014.



Prof. Dr. João Luis Garcia – UEL/PR



Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro – ICBIM/UFU



Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo (orientador) – ICBIM/UFU

"Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem."

John Quincy Adams

"Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega e no outro vai embora."

Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz."

Almir Sater

Com todo meu amor e carinho à minha mãe
Patrícia, aos meus avós Francisco e Tereza
e a grande parceira de vida Renata. Vocês
tem grande responsabilidade nesta vitória.

Muito obrigado!



Agradecimientos

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Sobretudo agradeço a oportunidade de trabalhar com você. Sem dúvidas aprendi muito durante esse tempo e foi graças a você, obrigado pelo apoio, pelo incentivo e pela orientação. Obrigado por confiar em mim e acreditar no meu potencial, sem dúvidas isso foi fundamental para que chegasse até aqui!

Ao Dr. Arlindo Gomes de Macêdo Junior

Grande amigo e parceiro, você me ensinou muito sobre técnicas e rotinas laboratoriais, grande parte do que sei inclusive. Mas você foi muito além, com você aprendi a ser mais paciente, atencioso, educado... Por isso, agradeço à paciência, a disposição, a simpatia, a presença e sem dúvidas o carinho que teve por mim todo esse tempo. São virtudes que levarei para o resto da minha vida profissional e pessoal também. Serei eternamente grato!

Agradeço a Deus, primeiramente por ter me dado o dom da vida e ter me mantido nela até hoje. Agradeço também a força e a sabedoria cedidas a mim que sem dúvidas foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Aos Professores colaboradores deste trabalho:

A Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro pela simpatia, prontidão e carinho demonstrado por mim este tempo. Sem dúvida sua contribuição foi essencial neste trabalho e em minha formação.

A Profa. Dra. Neide Maria da Silva pela oportunidade de conhecer seu espaço e sua pesquisa e por ter colaborado em passos importante no desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Fernanda Maria Santiago pelo convívio e pelo aprendizado gerado durante este tempo. Agradeço também aos ensinamentos e a colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rone Cardoso pela colaboração nas técnicas moleculares.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pelo conhecimento transmitido e pela disposição. Sei que poderia contar com sua sabedoria quando precisasse.

Aos demais colaboradores do trabalho:

À Flávia Batista Ferreira França, sobretudo pela amizade. Sem dúvidas passamos muitos momentos bons juntos, os quais levarei para eternidade. Aprendi muito com você e sei que tenho muito a aprender. Obrigado pela

presença, carinho, apoio e principalmente pelas palavras. Serei eternamente grato!

Ao MSc. Murilo Vieira da Silva pela amizade, apoio, carinho e confiança que sempre depositou em mim. Acima de tudo, sei que levarei seus ensinamentos o resto da minha vida e onde quer que vá lembrarei-me de você. Obrigado por tudo!

À Dra. Wânia Rezende de Lima pela paciência, apoio, sugestões e pela fundamental colaboração. Saiba que tenho e levo uma admiração muito grande por você. Sem dúvidas você é uma grande referência profissional para mim e para várias pessoas. Obrigado mesmo!

Ao MSc. Patrício da Silva Cardoso Barros primeiramente pela amizade. Agradeço ao apoio, ao companheirismo e a disposição em momentos cruciais desta pesquisa.

Ao Gustavo Augusto Ferreira pela ajuda em técnicas moleculares e no desenvolvimento do *phage display*.

Ao PhD. Peter John Bradley por ceder os anticorpos monoclonais e o plasmídeo para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos demais amigos do Laboratório de Imunoparasitologia: Mylla, Vanessa Resende, Vanessa Miranda, Cristina, Carol, Lucas, Silas, Gebrim, Miguel, Maraísa, Lydiane, Mariana, Lara, Paula, Leandro, Héber, Lourenço, Renata, Fernando, Elivaine e principalmente à Kamilla pelo bom convívio, amizade, paciência e carisma que tiveram por mim esse período.

Aos colegas que finalizaram sua jornada no laboratório e que tive o prazer de conhecer e passar bons momentos, especialmente: Ana Carol, Amanda, Nathâny, Luciana, Laura, Margareth e Tamires

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia: Max, Ana Cláudia, Marley, Zilda e Edilge, que auxiliaram para a viabilização deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas: Lucileide e Lucélia, pela eficiência e pronto atendimento em ajudar em tudo que fosse necessário.

A todos meus verdadeiros amigos e companheiros de jornada, pelas alegrias vividas e compartilhadas e pelas palavras de conforto e motivação nos momentos de dificuldade e desânimo agradeço principalmente: Aline Caroline, Aline Fagundes, Ana Carolina, André, Arlindo, Black, Bruna, Camilla, Daiane, Edson, Elaine, Flávia, Heloísa, José Eduardo, Josi, Kamilla, Kelly, Kléber, Gabriela Lícia, Karine, Letícia Delfini, Letícia Maróstica, Lígia, Mardiany, Maria Carolina, Mariane, Meiriane, Murilo, Nathália, Nathâny, Patrícia, Pollyanna, Rafael, Renata Moura, Renata Oliveira e Taison.

A todos os meus familiares: minha mãe Patrícia, meu avô Francisco, minha avó Tereza, meus irmãos Adauto, Aline, Ingrid e Jonathan, minha cunhada Camila, meus sobrinhos Giovana e Davi e meu padrasto Ismail aos quais são minhas referências e levo os seus ensinamentos por toda a minha vida, obrigado pelas orações, pelas palavras e pelo carinho, vocês são essenciais em minha vida!

À minha turma de mestrado Edson, Elivaine, José Eduardo, Layane, Leilane, Letícia, Melina, Murilo e Pâmella pelos momentos difíceis e pelos de diversão que compartilhamos todo esse tempo. Certamente levarei um pouco de cada um de vocês aonde eu for e tenho certeza que esse mestrado nunca terá uma turma igual a nossa! Valeu mesmo galera!

Aos animais que cederam sua vida em prol do desenvolvimento desta pesquisa.

Todos vocês foram fundamentais durante essa jornada! Muito obrigado!

RESUMO

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório, capaz de causar doença em uma variedade de hospedeiros. Desde sua primeira descrição, a infecção por *N. caninum* tem emergido como uma importante doença em cães e bovinos em todo o mundo. Testes sorológicos como imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA são classicamente utilizados no diagnóstico da neosporose, sendo o primeiro considerado padrão ouro no sorodiagnóstico. Entretanto, ainda não há testes comerciais que visam avaliar o estágio da infecção, uma vez que os principais sinais clínicos são relatados durante a fase aguda ou reativação do parasito. Diversos alvos proteicos do patógeno vem sendo testados a fim de verificar a fase de infecção do hospedeiro, apresentando resultados satisfatórios, todavia, novos alvos devem ser avaliados para desenvolver um diagnóstico efetivo para os estágios da infecção. Desse modo, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial da proteína NcROP4 de *N. caninum* como marcador de fase da infecção pelo protozoário. Para tanto, avaliou-se a expressão e localização de NcROP4 durante o processo de infecção em células HeLa para investigar a possível exposição da proteína a anticorpos. Posteriormente, análises de bioinformática e *phage display* foram desenvolvidas visando prever e determinar os epítomos de células B da proteína. Camundongos e bovinos foram infectados experimentalmente a fim de investigar através de ensaios imunoenzimáticos indireto e reverso a produção de anticorpos IgG anti-NcROP4 durante a infecção. Observou-se que a proteína NcROP4 é secretada no citoplasma de células HeLa durante o processo de invasão, o que permite seu extravasamento para o ambiente extracelular após lise das células. Análises de bioinformática demonstrou que NcROP4 exibe 23 regiões que são potenciais epítomos de célula B e as análises de *phage display* constataram que o mAb 20D2 se liga a região

de 360 – 400 aminoácidos da proteína. Certificou-se também que camundongos produzem anticorpos de alta avidéz contra NcROP4 recombinante (rNcROP4) após 30 dias de infecção (fase crônica) e que não há diferença entre as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) neste processo de reconhecimento. Além disso, anticorpos de bovinos infectados experimentalmente reconheceram rNcROP4 após 44 dias de infecção, caracterizando um reconhecimento de fase crônica. Observou-se ainda que NcROP4 é reconhecida somente durante reinfecção em ELISA reverso, no qual há o bloqueio de um epítipo da proteína. Desse modo, conclui-se que NcROP4 pode ser utilizada como marcador de fase crônica na infecção por *N. caninum*, sendo uma estratégia adicional no sorodiagnóstico da neosporose.

Palavras-chave: NcROP4, sorodiagnóstico e *N. caninum*

ABSTRACT

Neospora caninum is an obligate intracellular parasite which is able to infect a wide range of hosts. Since its first description, *N. caninum* has emerged as an important disease of cattle and dogs worldwide. The neosporosis diagnosis is classically performed by serological tests as indirect immunofluorescence (RIFI) and ELISA, being the first gold standard for serodiagnosis that aim to detect the presence of antibodies against the parasite. However, there are no commercial tests designed to assess the stage of infection, once the main clinical signs are reported during the acute phase or during infection reactivation. Several protein targets of this pathogen has been tested in order to check the phase of host infection with satisfactory results. However, new targets should be evaluated in order to develop an effective diagnostic for the stages of infection. Thus, the present study aimed to studied the potential of NcROP4 protein as a stage marker of *N. caninum* infection. For this purpose, we evaluated the expression and localization of NcROP4 during infection in HeLa cells to investigate the possible exposure of this protein to antibodies. Subsequently, bioinformatic analysis and phage display were developed aiming to predict and determine B cell epitopes of the NcROP4. Mice and cattle were experimentally infected to investigate the producing of IgG through indirect and reverse immunoenzyme assay against NcROP4 during infection. It was observed that the NcROP4 protein is secreted into the cytoplasm of HeLa cells during the invasion process, which allows its extravasation to the extracellular environment after cell lysis. Bioinformatics analysis showed that NcROP4 displays 23 regions that are potential B-cell epitopes and analysis of phage display have showed that mAb 20D2 binds to the region 360-400 amino acids of this protein. Also made sure that mice produce high avidity antibodies against recombinant NcROP4 (rNcROP4) after 30 days

of infection (chronic phase) and that there is no difference between the IgG subclass (IgG1 and IgG2) in this recognition process. Moreover, experimentally infected cattle recognize rNcROP4 after 44 days of infection, featuring the recognizing of chronic phase. It was also observed that NcROP4 is recognized only during reinfection in reverse ELISA, in which there is the block an epitope of the protein. Thus, it is concluded that NcROP4 can be used as chronic phase marker during *N. caninum* infection, being an additional strategy in the serodiagnosis of neosporosis.

Keywords: NcROP4, serodiagnosis and *N. caninum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BL21DE	Cepa de <i>Escherichia coli</i>
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	DNA complementar
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
GRA	Proteínas de grânulos densos
IA	Índice Avidéz
IE	Índice ELISA
IEDB	Immune Epitope Database
IFN- γ	Intérferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IPTG	Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosideo
LB	Meio de cultura Lúria Bertani
M13	Bacteriófago filamentoso
mAb	Anticorpo monoclonal
MIC	Proteínas de Micronemas
MOI	Quantidade de parasito por célula
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88 (<i>Myeloid differentiation factor 88</i>)
Nc-1	Isolado de <i>Neospora caninum</i>

NcROP4	Proteína de roptria 4 de <i>N. caninum</i>
NK	Células Natural Killer
NLA	Antígeno solúvel de <i>N. caninum</i>
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade ótica (<i>Optical density</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween
PBS-TM	Solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween e leite desnatado
PBT	Solução salina tamponada com fosfato com 0,1% de Triton-X100
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rNcROP4	Proteína de roptria 4 de <i>N. caninum</i> recombinante
ROP	Proteínas de roptrias
SAG	Antígeno de superfície
SDS-PAGE	dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris com 0,05% de Tween
TBS-TM	Solução salina tamponada com Tris com 0,05% de Tween e leite desnatado
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
VP	Vacúolo parasitóforo



Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Parasito	19
1.2	Hospedeiros	22
1.3	Patogênese e Patologia	22
1.4	Invasão celular no filo Apicomplexa	23
1.5	Resposta Imune	28
1.6	Diagnóstico da neosporose	30
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Parasito	37
4.2	Amostra de soro	37
4.3	Antígenos	39
4.4	Anticorpo monoclonal 20D2	42
4.5	Biopanning e seleção de peptídeos ligantes ao mAb 20D2 por <i>phage display</i>	42
4.6	Análise de bioinformática	44
4.7	Imunomarcagem para avaliar a localização de NcROP4 em parasitos extracelulares	44
4.8	Ensaio de expressão de NcROP4 durante o processo de invasão	46
4.9	Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA)	47
4.10	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	50
5.1	NcROP4 é expressa durante o processo de invasão e é secretada para o citoplasma de células HeLa	51
5.2	Mapeamento de epítomos de células B em NcROP4	54
5.3	Clonagem e purificação de rNcROP4 em modelo procarioto (<i>E. coli</i>)	57
5.4	Anticorpos IgG específico contra rNcROP4 são produzidos na fase crônica da infecção em camundongos	60
5.5	Anticorpos IgG de bovinos reconhecem NcROP4 na fase crônica da infecção e reexposição ao parasito	64
5.6	Anticorpos IgG de animais naturalmente infectados por <i>N. caninum</i> exibem sororreatividade a NLA, rNcROP4 e NcROP4 nativa	66
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	74
8	REFERÊNCIAS	76



1. Introdução

1.1 Parasito

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, que exibe um número considerável de hospedeiros. O parasito apresenta estreita relação evolutiva com o protozoário *Toxoplasma gondii*, sendo alvo de estudos nas últimas décadas por causar abortamento em bovinos com consequentes perdas econômicas na pecuária, além de causar doenças neuromusculares em cães (DUBEY, 2003; REICHEL e ELLIS, 2009; REICHEL et al., 2013).

Infecções por *N. caninum* foram primeiramente identificadas em 1984 na Noruega em cães com distúrbios neurológicos semelhantes aos induzidos por *T. gondii*, contudo sem reatividade sorológica para este parasito (BJERKÅS et al., 1984). Após alguns anos desta descrição, o parasito foi identificado, por meio de análise retrospectiva de cortes histológicos com a presença de cistos teciduais no cérebro de cães semelhantes ao de *T. gondii*. Todavia, algumas características diferenciais eram observadas: paralisia dos membros posteriores; características ultraestruturais de parasitos livres e cistos teciduais; testes sorológicos e imunoistoquímicas negativos para *T. gondii*. Propôs-se assim uma nova espécie de protozoário denominado *N. caninum*, posteriormente isolado em cultura celular e identificado em bovinos (DUBEY et al., 1988a; DUBEY et al., 1988b; THILSTED e DUBEY, 1989).

Acredita-se assim que a atual identificação e classificação de *N. caninum* estão relacionadas às suas características bioquímicas, morfológicas e vitais, demonstrando forte semelhança ao *T. gondii* o que encobriu sua identificação por décadas (HEMPHILL et al., 2006). Além de diferirem-se em características de indução de patologias, tais espécies de protozoários são distintas também em suas interações com o hospedeiro e ciclo vital (HEMPHILL et al., 2006; INNES e MATTSSON, 2007).

Ciclo biológico

N. caninum possui ciclo de vida heteroxênico, apresentando os canídeos como hospedeiro definitivo, além de várias espécies de mamíferos e aves como hospedeiros intermediários (THILSTED e DUBEY, 1989; BARR et al., 1991; GONDIM et al., 2004; COSTA et al., 2008). Tal ciclo envolve basicamente três formas evolutivas: esporozoítas presentes em oocistos, taquizoítas, e bradizoítas no interior de cistos teciduais. O parasito pode ser transmitido de forma horizontal e vertical, sendo que a primeira ocorre tanto em hospedeiros definitivos quanto em hospedeiros intermediários. Não se conhece ao certo como ocorre a infecção nos canídeos, especula-se que seja semelhante a *T. gondii* em felídeos, no qual após a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítas ocorre no estômago e digestão química e enzimática, liberando as formas infectantes para a luz do intestino (DUBEY et al., 1999) onde há a reprodução assexuada por merogonia e sexuada por gamogonia culminando na formação de oocistos não esporulados. Tais oocistos podem ser eliminados no ambiente junto às fezes, aonde em condições propícias de umidade e temperatura esporulam-se, formando uma estrutura contendo dois esporocistos com quatro esporozoítas (McALLISTER et al., 1998; RINALDI et al., 2005). Oocistos esporulados, quando ingeridos por bovinos ou outros hospedeiros intermediários, atingem o trato entérico, liberando esporozoítas capazes de invadir o epitélio intestinal transformando-se em taquizoítas que se multiplicam no interior de células nucleada por endodiogenia. A partir desse momento, os taquizoítas são disseminados pelo organismo do animal, através da circulação linfática, sanguínea e também via ascendente por tecidos nervosos periféricos, atingindo diretamente o sistema nervoso central (SAWADA et al., 1997; SHIBAHARA et al., 1999).

A pressão do hospedeiro sobre o parasito, principalmente mediada por ação do sistema imunológico, induz a transformação do parasito em bradizoítas capazes de

formar uma parede espessa ao redor de vários parasitas, tal estrutura é denominada cisto tecidual (DUBEY et al., 1988a ; DUBEY et al., 1988b). A intensa multiplicação no início da infecção caracteriza a fase aguda da neosporose (COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006; AGUADO-MARTINEZ et al., 2008), já a formação de cistos teciduais é característico da fase crônica da infecção que persiste por toda a vida do hospedeiro (SHIBAHARA et al., 1999; COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006; AGUADO-MARTINEZ et al., 2008).

A forma vertical de transmissão é uma alternativa do parasito para se propagar e ocorre devido à capacidade deste ultrapassar a barreira transplacentária. Essa forma de transmissão já foi descrita em diversas espécies de animais e apresenta considerável importância em bovinos, pois durante a infecção do feto pode ocorrer abortamento (DUBEY, 2003; TREES e WILLIAMS, 2005; REICHEL e ELLIS, 2009). A transmissão vertical pode ocorrer de duas formas distintas: a primeira se dá pela infecção de fêmeas durante a gestação e a segunda ocorre pela reativação da infecção decorrente de variação hormonal e mudança no perfil de resposta imunológica, de pró-inflamatória (Th1) para anti-inflamatória (Th2), sendo o primeiro importante para manter a latência do parasito (INNES et al., 2001; QUINN et al., 2002) (Figura 1).

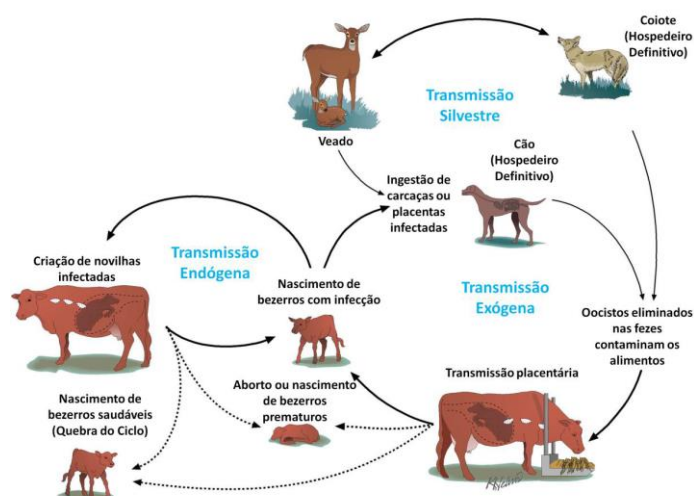


Figura 1 - Ciclo vital de *N. caninum* (adaptado de Milton M. McAllister, 2007).

1.2 Hospedeiros

Os relatos iniciais da neosporose demonstraram que cães domésticos são os hospedeiros definitivos do parasito devido à reprodução sexuada que ocorre em seu intestino (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999). No entanto, estudos posteriores consideraram coiotes (*Canis latrans*), dingos (*Canis lupus dingo*) e lobos cinzas (*Canis lupus*) como hospedeiros definitivos adicionais de *N. caninum*, apontando a possibilidade de outros canídeos exercerem o papel de hospedeiro definitivo para o parasito (GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011).

A infecção por *N. caninum* é frequentemente relatada em cães e bovinos, contudo, há relatos sorológicos da presença do parasito em outros organismos como carneiros, cabras, cavalos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, veados, alpacas, camelos, galinhas, dentre outros (DUBEY, 2003; COSTA et al., 2008). Experimentalmente, relatos na literatura demonstraram que tal microrganismo é capaz de infectar com êxito espécies de mamíferos como bovinos, cães, cabras, carneiros, camundongos, gerbis, gatos, macacos, pombos e porcos (DUBEY et al., 2002; GONDIM et al., 2010). Embora não haja estudos que comprovem a infecção por *N. caninum* em humanos, alguns autores relatam evidências sorológicas da exposição do homem ao parasito em diferentes populações (NAM et al., 1998; TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006; ROBERT-GANGNEUX e KLEIN, 2009).

1.3 Patogênese e Patologia

Os sinais clínicos decorrentes da infecção são bem descritos em cães e bovinos. Os cães exibem quadros graves de comprometimento neuromuscular, sendo que há

relatos de infecções congênitas com neonatos apresentando doenças graves dentro do primeiro ano de vida. Dependendo da virulência do isolado e carga parasitária, pode haver o acometimento de outros órgãos como pulmões, coração, intestino e pele (ORDEIX et al., 2002; DUBEY, 2003; BASSO et al., 2005). Em bovinos, a neosporose gera perdas econômicas importantes, devido à indução de abortamento (WILLIAMS et al., 2000; INNES et al., 2005). Ocorrem também danos à placenta materna por taquizoítas devido à interrupção do fornecimento de nutrientes (DUBEY et al., 1992).

O parasito exibe virulência variável que está relacionada ao crescimento *in vitro* e a diferentes isolados *in vivo*, como o de cães e bovinos sintomáticos, bezerros natimortos ou fetos abortados os quais apresentam virulência acentuada (ATKINSON et al., 1999; SCHOCK et al., 2000; QUINN et al., 2002; PÉREZ-ZABALLOS et al., 2005; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006). Já isolados obtidos de bezerros saudáveis, mas infectados congenitamente, foram associados à baixa virulência (SHIBAHARA et al., 1999; MILLER et al., 2002; ROJO-MONTEJO et al., 2009).

1.4 Invasão celular no filo Apicomplexa

Os parasitos do filo Apicomplexa invadem a célula hospedeira utilizando mecanismo conservado e extremamente bem sucedido. O processo de invasão é totalmente dirigido pelo parasito, num processo conhecido por entrada ativa, diferindo da entrada induzida, provocadas por bactérias ou outros protozoários. O processo exige que o parasito utilize seu próprio sistema de actina/miosina para induzir o processo de invasão, ou seja, a célula hospedeira não apresenta função ativa neste processo, como ocorre a indução da fagocitose por alguns protozoários como *Leishmania* sp (DOBROWOLSKI e SIBLEY, 1996; DOBROWOLSKI et al., 1997; SOLDATI et al.,

2001; MEISSNER et al., 2002; JEWETT e SIBLEY, 2003). Há a penetração na célula sem alteração da actina do hospedeiro, em um processo independente de cálcio. De forma contrária, o parasito utiliza-se de um mecanismo de secreção regulado por cálcio intracelular (CARRUTHERS e SIBLEY, 1999). Diversos receptores de superfície associado a uma série de proteínas liberadas por micronemas, roptrias e grânulos densos estão relacionadas a diversos processos de reconhecimento, movimentação e replicação (CESBRON-DELAUW et al., 2008; DAHER e SOLDATI-FAVRE, 2009; LOURIDO et al., 2010).

Micronemas e roptrias estão localizados na porção anterior do parasito (complexo apical) enquanto os grânulos densos estão mais amplamente distribuídos no citoplasma (JOINER e ROOS, 2002; RAVINDRAN e BOOTHROYD, 2008). Micronemas e roptrias são fundamentais na invasão, processo que leva aproximadamente 15 a 20 segundos (RAVINDRAN e BOOTHROYD, 2008), enquanto os grânulos densos são fundamentais para o estabelecimento do parasito no vacúolo formado, bem como sua replicação (JOINER e ROOS, 2002) além de modular as vias de sinalização intracelular da célula hospedeira e manter sua permanência até o momento de evasão (ROSOWSKI et al., 2011).

O processo de invasão celular pode ser resumido em três etapas: (1) Inicialmente ocorre adesão da forma taquizoíta à célula hospedeira, processo que não envolve a orientação do parasito e que requer antígenos de superfície glicosilados como SAG1 e SAG2. Após tal adesão, o parasito posiciona a extremidade anterior (região apical) para extrusão do conoide, seguida pela invaginação da membrana celular, formando o vacúolo parasitóforo (VP), momento em que proteínas oriundas dos micronemas (MIC1, 2, 3 e 4) são secretadas e funcionam como adesinas. Estudos recentes indicaram que a ligação de proteínas do tipo MIC a receptores de célula hospedeira, desencadeiam

a secreção dos componentes proteicos de roptrias (SINGH et al., 2010). A aderência conferida permite o movimento da junção ao redor do taquizoíta, que juntamente ao citoesqueleto do parasito, impulsiona-o para o interior do VP, culminando na invasão. O VP é revestido pela membrana celular do hospedeiro o que não permite a fusão aos lisossomos. (2) Na etapa seguinte, proteínas de roptrias são secretadas no interior do VP e ligam-se à membrana deste para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que a mitocôndria e o retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP. (3) A etapa final consiste na secreção de proteínas de grânulos densos que modificam a membrana do VP, o que contribui na remodelação e maturação do VP, formando uma rede de membrana intravacuolar, metabolicamente ativa para a multiplicação parasitária. Os taquizoítas no interior do VP proliferam-se por endodiogenia, produzindo novos parasitos em poucas horas, os quais subsequentemente lisam a célula hospedeira e ficam livres para invadir novas células (HELMPHILL et al., 2006) (Figura 2).

T. gondii exibe um conjunto de 8 a 12 roptrias que apresentam forma de clava, consistindo de um corpo bulboso e um pescoço estreito e eletro denso. Já se conhece mais de 44 proteínas de roptrias, sendo parte transmembrana e parte constituindo o ambiente interno (PEIXOTO et al., 2010). Algumas proteínas de roptrias são homólogas a quinases, fosfatases e proteases, revelando sua importância para as funções do parasito (FLEIGE e SOLDATI-FRAVE, 2008). Algumas dessas proteínas de *T. gondii* como ROP5, ROP16 e ROP18 funcionam como proteínas quinases ou pseudoquinases que modulam ou auxiliam na modulação da resposta imune do hospedeiro, funcionando com um mecanismo de evasão do parasito (TAYLOR et al., 2006; SAEIJ et al., 2006; SAEIJ et al., 2007; KAHAN et al., 2009; PEIXOTO et al., 2010; REESE et al., 2011; BUTCHER et al., 2011; BEHNKE et al., 2011).

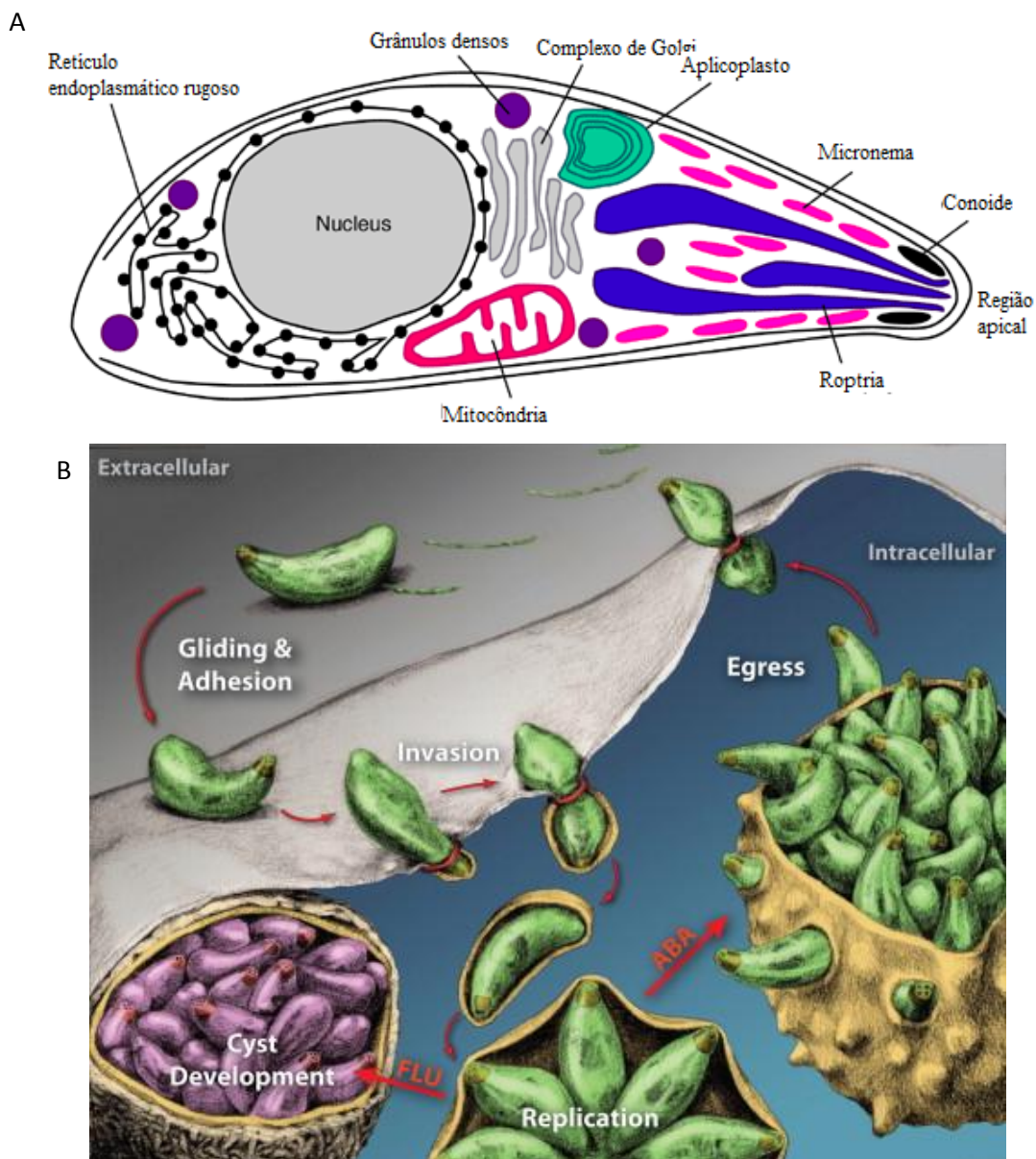


Figura 2 – Esquema da estrutura de taquizoíta (A) e representação do processo de invasão por taquizoítas de *T. gondii*. (A) O parasita é formado por duas membranas, a membrana plasmática e a membrana interna. Na região apical do parasito encontram-se estruturas conoide e as organelas apicais micronemas e roptrias. Grânulos densos são distribuídos ao longo do parasito. Outras organelas também são presentes como apicomplasto, mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Adaptado de Joiner e Roos, 2002). (B) A porção esquerda superior da figura representa a região extracelular da célula hospedeira com membrana plasmática em azul. Em 1, ocorre o contato iniciação entre o parasito (verde) e a célula hospedeira via antígenos de superfície. Em 2 ocorre a reorientação do parasito e as junções (vermelho) entre a região apical e a membrana celular com participação de proteína micronêmica e de roptrias. Em 3 há a representação do processo de invasão ativa e início da formação do vacúolo parasitóforo. Em 4 o vacúolo parasitóforo está formado e inicia-se a secreção de proteínas de grânulos densos (Adaptado de Billker et al., 2009).

A descarga de proteínas de roptrias ocorre seguindo a descarga das proteínas micronêmicas, o que coincide e contribui para formação do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS; SIBLEY, 1999). Após esta descarga, tais proteínas permanecem associadas ao vacúolo parasitóforo ou são exportadas para célula hospedeira onde participam dos processos de remodelamento celular (ROY et al., 2006; DUBREMETZ, 2007).

Das proteínas de roptrias de *T. gondii* identificadas e estudadas, sabe-se que ROP1 é um componente ativo na penetração do parasito na célula (NORRBY e LYCKE, 1967; OSSORIO et al., 1992), no entanto, tal proteína não é essencial para o processo de invasão (KIM et al., 1993). Já ROP2 é liberada no interior do vacúolo parasitóforo e induz a associação de tal estrutura à mitocôndria da célula hospedeira, além de ser importante na biogênese da roptria (SINAI e JOINER, 2001; NAKAAR, et al., 2003). ROP4 é um membro da família ROP2 e é secretada durante a invasão, associando-se à membrana do vacúolo parasitóforo, onde torna-se fosforilada e exerce atividade quinase, o que permite a ativação de fatores da célula hospedeira (CAREY et al., 2004).

Em relação a ROP4 de *N. caninum* (NcROP4) ainda pouco se sabe a respeito das funções desta proteína. A proteína apresenta 594 aminoácidos, foi identificada como componente secretor do parasito em 2011 e também é denominada membro 1 da família das ROP2 (ALAEDDINE et al., 2013). Um anticorpo monoclonal identificado como 20D2 foi desenvolvido e certificou-se que ele se liga a NcROP4 e que a proteína apresenta peso molecular de 65 kDa (SOHN et al., 2011). Além disso, apesar de algumas proteínas de roptrias exibirem propriedade quinase, NcROP4 aparentemente não apresenta sítio catalítico. Entretanto, tal proteína exibe capacidade imunogênica e sua importância durante a invasão já foi demonstrada. Constatou-se que anticorpos

gerados contra a proteína são capazes de neutralizá-la e prejudica a capacidade de invasão celular pelo parasito “*in vitro*” (ALAEDDINE et al., 2013). Contudo, não foi relatado até o momento qual a participação da proteína durante o processo de invasão e a localização dentro da célula hospedeira, além do seu potencial alvo no diagnóstico da infecção por *N. caninum*.

1.5 Resposta Imune

Tanto a resposta imune inata quanto a resposta adaptativa participam de mecanismos protetores contra *N. caninum*. A primeira barreira física é representada por enterócitos e espessas junções intercelulares da mucosa intestinal que podem deter a invasão do parasito transmitido pela via oral. Quando às células epiteliais intestinais (enterócitos) são infectadas secretam moléculas citotóxicas como o Óxido Nítrico (NO), citocinas (IL-15) que ativam as células *natural killer* (NK), induzindo a produção de IFN- γ e de quimiocinas, recrutando leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas. A partir deste recrutamento, ocorre a ativação de células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas via reconhecimento pelo TLR2 (*Toll like receptor 2*) dependente da molécula adaptadora MyD88 levando à secreção de IL-12 (MINEO et al., 2009; MINEO et al., 2010) que ativa células NK e induz a diferenciação de células TCD4⁺ em uma subpopulação Th1 produtora de IFN- γ . Esta citocina ativa macrófagos, células dendríticas e enterócitos, culminando na destruição do parasito por indução de mecanismos efetores (BUZONI-GATEL et al., 2006; GOODSWEN et al., 2013). Devido ao fato do IFN- γ inibir a replicação de taquizoítas, a neutralização ou depleção desta citocina desencadeia maior susceptibilidade do hospedeiro ao patógeno (INEES et al., 1995; KHAN et al., 1997; INNES et al., 2002; TANAKA et al., 2000

NISHIKAWA et al., 2003; INNES e VERMEULEN, 2006 KLEVAR et al., 2007). Linfócitos TCD8⁺ parasito-específicos podem destruir as células infectadas pelo patógeno através de uma via dependente de perforina-granzima (STASKA et al., 2003; GOODSWEN et al., 2013).

Macrófagos e outras células mononucleares podem induzir diferenciação do parasito da forma taquizoíta para a forma bradizoíta e formação e manutenção de cistos teciduais (WILLIAMS et al., 2009). Esta interconversão entre os estágios evolutivos desempenha um papel fundamental no estabelecimento da infecção crônica (LYONS et al., 2002). O processo de interconversão tem sido extensivamente estudado em *T. gondii* (SKARIAH et al., 2010; PENG et al., 2011), contudo há poucos estudos sobre tal fenômeno em *N. caninum* (EASTICK e ELSHEIKHA, 2010). Estudos iniciais de formação de cistos teciduais de *N. caninum in vitro* indicaram que, em contraste com *T. gondii*, a espécie não produz cistos eficientemente (WEISS et al., 1999; VONLAUFEN et al., 2004). Trabalhos posteriores utilizando nitroprussiato de sódio, um composto doador de NO, permitiu uma análise mais detalhada do bradizoíta e do conteúdo dos cistos teciduais (VONLAUFEN et al., 2002; VONLAUFEN et al., 2004; RISCO-CASTILLO et al., 2004).

Com relação aos bovinos, embora estes gerem uma imunidade protetora contra *N. caninum*, crescentes evidências sugerem que a severidade da infecção está intimamente relacionada ao trimestre de gestação, combinado ao estado do sistema imune do feto, além da variação genotípica do parasito. Sabe-se que os bovinos, infectados experimental ou naturalmente, geram uma resposta imune associada a elevada produção de IFN- γ e anticorpos IgG2 antígeno-específicos (WILLIAMS et al., 2000; ANDRIANARIVO et al., 2005; HECKER et al., 2012), indicando a participação ativa de imunidade celular e humoral.

Sabe-se que a imunidade protetora ocorre em rebanhos bovinos devido a evidências de exposição precedentes ao *N. caninum*, pois tais animais demonstram menor susceptibilidade ao aborto do que animais com infecções primárias (McALLISTER et al., 2000). Willians e colaboradores (2003) corroboraram essas afirmações e relataram que, em estado natural, bovinos infectados naturalmente adquirem uma resposta imune protetora contra a infecção oral por *N. caninum*. Contudo, os autores evidenciaram que tal resposta foi ineficaz na proteção contra transmissão vertical ou prevenção da recrudescente em infecções latentes. Os estudos mencionados fornecem evidências da geração de uma imunidade protetora contra uma transmissão pós-natal, mas não em uma infecção endógena.

1.6 Diagnóstico da neosporose

O diagnóstico da infecção por *N. caninum* é realizada tanto pela detecção direta do parasito, bem como de modo indireto, pela detecção de anticorpos circulantes específicos a antígenos parasitários, sendo o segundo mais comumente empregado. A detecção do protozoário em amostras biológicas ocorre pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), testes imunohistoquímicos e através de bioensaios em cultura de células e animais experimentais. Dentre os ensaios sorológicos comumente utilizados, destaca-se a Reação de Imunofluorescências Indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), sendo o primeiro considerado o padrão ouro para o sorodiagnóstico da infecção (DUBEY et al., 2007). Entretanto, uma das maiores deficiências das técnicas sorológicas é que estas geralmente indicam somente a exposição prévia do hospedeiro ao parasito, não permitindo informações sobre o estágio de infecção. Tal contratempo é parcialmente solucionado pela aplicação de técnicas baseadas em isotipos de anticorpos.

Um marcador utilizado para determinação da fase aguda de infecção é a soropositividade de IgM, enquanto o que determina a fase crônica é presença de anticorpos IgG antígeno-específicos (BJORKMAN et al., 1999). Outra forma de se determinar o estágio da infecção é utilizando técnicas que mensuram a avidéz de IgG frente aos antígenos de interesse, sendo que tal tipo de técnica utiliza-se dos fenômenos relacionados a força de ligação do anticorpo a seus alvos (HEDMAN et al., 1989), a qual torna-se progressivamente maior no decorrer da infecção. Um índice avidéz alto está geralmente relacionado às fases crônicas de infecção e a baixa avidéz geralmente correlaciona-se a infecções ativas ou recentes (SENSINI et al., 1996 e COZON et al., 1998; SCHARES et al., 2002, AGUADO-MARTINEZ et al., 2005 AND BJORKMAN et al., 2006). Contudo, apesar de tais evidências, não é possível inferir com exatidão a fase de infecção que o hospedeiro se encontra, pois não há como garantir que tais fenômenos sejam estáveis em cada indivíduo testado (ASHBURN et al., 1998; BERTOZZI et al., 1999; LEFEVRE-PETTAZZONI et al., 2006; IQBAL e KHALID, 2007; HUANG et al., 2007).

Uma ferramenta hoje aplicada com frequência para se avaliar a soropositividade a diferentes infecções é a utilização de proteínas recombinantes. Trabalhos empregando proteínas recombinantes como NcSAG1, NcSRS2, NcGRA6, NcGRA7 e NcSAG4 de *N. caninum* no sorodiagnóstico apresentaram resultados satisfatórios como marcadores de fase aguda, crônica e até mesmo recrudescência da neosporose (LOUIE et al., 1997; NISHIKAWA et al., 2001; HOWE et al., 2002; CHAHAN et al., 2003; JENKINS et al., 2005; AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2008; HIASA et al., 2012). Desse modo, outros antígenos devem ser testados e se possível aplicados no diagnóstico da infecção por *N. caninum*.



2. Justificativa

A neosporose apresenta grande importância para a medicina veterinária, principalmente devido às perdas econômicas induzidas na pecuária decorrente da eficácia na transmissão vertical acarretando a abortamentos, aumento na frequência de natimortos, absorção fetal e nascimento de animais persistentemente infectados. Tais características atingem a cadeia produtiva do leite e carne. Assim, essa doença é extremamente danosas em um país que o setor agropecuário é responsável por um terço do Produto Interno Bruto (PIB) direto, visto que estimou que o dano econômico da neosporose gira em torno de bilhões de dólares.

A compreensão sobre os antígenos utilizados por patógenos durante os processos de invasão e replicação são importantes para o desenvolvimento de protocolos vacinais, terapêuticos e de diagnóstico. *N. caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa e necessita de sua maquinaria celular para poder invadir, se multiplicar e se estabelecer no hospedeiro. Essa maquinaria compreende componentes secretórios em organelas específicas como as roptrias, que contém proteínas essenciais para o estabelecimento da infecção por *N. caninum* em seus hospedeiros. A partir de análises enfocando a capacidade imunogênica de tais proteínas, é possível o desenvolvimento de ensaios imunológicos capazes de determinar a sororeatividade contra a infecção pelo parasito e, desse modo, traçar estratégias para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico diferenciais.



3. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o potencial da proteína NcROP4 no sorodiagnóstico da infecção por *Neospora caninum*.

Objetivos específicos

- Determinar a presença e localização de NcROP4 durante o processo de invasão e replicação parasitária;
- Predizer, por análise de bioinformática, os possíveis epítomos de células B em NcROP4;
- Identificar, por meio de *phage display*, o epítopo ligante do anticorpo monoclonal específico ao antígeno;
- Determinar a cinética de produção de anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) específicos contra NcROP4, em camundongos infectados experimentalmente;
- Determinar a cinética de produção de anticorpos IgG anti-NcROP4 em bovinos infectados experimentalmente;
- Verificar a presença e padrão de reatividade de anticorpos anti-NcROP4 em bovinos e caninos naturalmente infectados.

4. Material e Métodos

4.1 Parasitos

Taquizoítas do isolado Nc-1 de *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988) foram mantidos em cultura de células linhagem HeLa (ATCC No. CCL-2), cultivadas em frascos com área de 25 cm² em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem confluência. Foram feitas passagens seriadas em meio RPMI, em intervalos de 48 a 72 horas. O sobrenadante contendo parasitos extracelulares foi coletado e os parasitos foram purificados parcialmente através de passagens forçadas em agulha 25 × 7 mm e centrifugação diferencial (70 × g, 1 minuto, 4°C), para remoção de debris celulares. O sobrenadante foi novamente coletado e centrifugado (720 × g, 10 minutos, 4°C) para a obtenção dos parasitos utilizados em infecção dos animais, preparação de antígenos solúveis (NLA) e realização de imunoenaios.

4.2 Amostras de soros

Todos experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com aprovação do comitê de ética institucional (Comitê de Ética na Utilização de Animais; CEUA-UFU), protocolo número 52/2012.

Infecção experimental em camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas 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 um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e com água e ração *ad libitum*. Dez camundongos foram infectados com 1×10^6 taquizoítas de *N. caninum* (Nc-1) pela via intraperitoneal. Para avaliar a presença de anticorpos específicos durante a infecção, amostras de sangue foram coletadas pela via retro-orbital 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a infecção. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas ($400 \times g$ por 10 minutos), o soro foi coletado e armazenado a -20°C até a sua utilização em ensaios sorológicos.

Infecção experimental em bovinos

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*. Tais animais foram mantidos na Fazenda Experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia sob condições sanitárias, nutricionais e de manejo adotadas no local. Dividiram-se os bovinos em dois grupos de três animais cada, sendo um grupo infectado pela via subcutânea na base do pescoço, no antímero direito do animal, com $1,5 \times 10^8$ taquizoítas viáveis de *N. caninum* (Nc-1) e o outro grupo controle inoculado com PBS. Uma segunda infecção foi realizada 276 após a primeira nas mesmas condições descritas anteriormente. Coletou-se o sangue via jugular de todos os animais de 15 em 15 dias para realização de ensaios sorológicos.

Amostra de soro de bovinos e caninos naturalmente infectados

Amostras de soro de bovinos e caninos previamente triadas para *N. caninum* por RIFI e ELISA foram obtidas do banco de soros do Laboratório de Imunoparasitologia

“Dr. Mário Endsfieldz Camargo”. As amostras foram divididas de acordo com os resultados sorológicos prévios: bovinos positivos (n=27), bovinos negativos (n=14), caninos positivos (n=21) e caninos negativos (n=14).

4.3 Antígenos

Antígeno solúvel de N. caninum (NLA)

O antígeno solúvel de *N. caninum* foi preparado como descrito por Silva e colaboradores (2005). Taquizoítas em suspensão foram tratados com coquetel de inibidores de protease (Complete, Roche, Basel, Suíça) e submetidos a criólise por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria (37°C), seguido por ciclos (12 W, 30 kHz e amplitude de 90%) de ultrassom durante 5 minutos em banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (10.000 × g, 30 minutos, 4°C), os sobrenadantes foram coletados e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de NLA foram armazenadas a -20°C até sua utilização em imunoensaios.

Produção da proteína NcROP4 recombinante (rNcROP4)

Para avaliar o potencial da proteína NcROP4 (Identificação no banco de dados: ADM48813.1) recombinante no sorodiagnóstico da neosporose, expressou-se os resíduos de aminoácidos correspondentes entre 86-509 da proteína nativa em *Escherichia coli*. De modo a obter o cDNA para expressão proteica, RNA total foi isolado de *N. caninum* extracelular (Trizol, Invitrogen, Carlsbad-CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A transcrição reversa de NcROP4 foi desenvolvida utilizando par de primers: 3'-TAGCCTCGTGTCTCCGTTTC-5' e 3'-

CACCCAAGAAGAGGTCGAGCAAGTGC-5'. O produto da reação foi clonado em vetor pET161, que contém uma calda de histidina na porção C-terminal para purificação.

E. coli da cepa BL21DE competentes foram preparadas para posterior inserção do plasmídeo pET161+NcROP4. Brevemente, as bactérias foram crescidas em meio Luria e Bertani (LB) até atingir densidade óptica (OD) de 0,6 a 600 nm, centrifugadas a $3.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C, ressuspensas em 60 mM de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) e incubado a 0°C por uma hora. A transformação bacteriana ocorreu com a adição de 10 μL (200 ng) de DNA plasmidial que foi mantida a 0°C durante 30 minutos. Posteriormente, as bactérias foram incubadas a 42°C durante duas horas e colocadas novamente na condição anterior. Adicionou-se meio de cultura LB às bactérias que foram mantidas a 37°C por uma hora. Após incubação, as células foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensão em meio LB com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e 34 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol e plaqueado em placas de ágar para análise de colônias transformadas. Além disso, o DNA plasmidial foi isolado de cada uma das colônias crescentes e avaliado por PCR.

Bactérias transformadas foram crescidas em meio LB com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e 34 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol até atingirem densidade óptica (OD) de 0,6 a 600 nm. A expressão rNcROP4 foi induzida com 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) por 18h, a 20°C. A indução foi avaliada em gel de eletroforese SDS-PAGE e *Western blotting*.

Bactérias expressando rNcROP4 foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspensão em tampão de lise (200 mM de sacarose, 500 mM de NaCl, 1 $\mu\text{g/mL}$ de lisozima e coquetel de inibidores de protease diluídos em tampão fosfato pH 8,0) e mantidos em banho de gelo durante 30 minutos. Posteriormente, as bactérias foram submetidas a seis

ciclos de congelamento em N₂ líquido e descongelamento a 37°C, seguido de ciclos posteriores de ultrassom (12 W, 30 kHz e amplitude de 90%) durante 5 minutos em banho de gelo. O lisado foi centrifugado a 13.500 × g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante estocado a -20°C. Para purificação de rNcROP4, o sobrenadante foi passado em coluna Ni²⁺ acoplado a sefarose (GE Biosciences, Uppsala, Suécia) com tampão de equilíbrio (5 mM de imidazol, 500 mM de NaCl e 20 mM de Tris-HCl, pH 7,9). Após aplicação do material, a coluna foi lavada e as proteínas foram eluídas com tampão fosfato com imidazol (300 mM de imidazol em tampão fosfato pH 8,0).

Eletroforese unidimensional e Western blotting

A fim de avaliar a indução e purificação de NcROP4, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%. rNcROP4 foi fracionada em sistema unidimensional (LAEMMLI, 1970), os géis de poliacrilamida na concentração de 10% foram montados em placas do sistema de eletroforese SE250 (Amersham-Pharmacia Biothec, UK) de dimensões 8 × 10 × 0,075 cm. rNcROP4 solubilizada em SDS foi aquecida a 95°C por 5 minutos e aplicada ao gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). A proteína foi eletroforeticamente separada 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, rNcROP4 resolvida em SDS-PAGE 1D foi eletrotransferida para membranas de nitrocelulose conforme protocolo padrão (TOWBIN et al., 1979). As membranas de nitrocelulose foram submetidas a protocolos de *Western blotting*, sendo tiras de 3-4 mm bloqueadas com PBS adicionada de Tween 20 (0,05%) e suplementada com leite desnatado 5% (PBS-TM), durante duas horas a temperatura ambiente. Após este período, as membranas

foram incubadas com amostras de soro camundongos infectados com *N. caninum* (1:100) por período de 18 horas a 4°C. A seguir, as membranas foram lavadas e a detecção da ligação dos anticorpos primários à proteína imobilizada em nitrocelulose foi realizada pela subsequente incubação das membranas com os anticorpos secundários anti-IgG de camundongos na diluição 1:1000 diluído em PBS-TM a 1%. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas e reveladas com 3,3'-diaminobenzidina (Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA).

4.4 Anticorpo monoclonal 20D2

Hibridoma secretor do anticorpo monoclonal 20D2 foi produzido pelo Prof. Peter J. Bradley, Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, Universidade da Califórnia em Los Angeles (EUA), e cedidos para realização deste estudo. Tais células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2mM glutamina, 50 µM de 2-β-mercaptoetanol, 40 µg/mL de gentamicina em frascos com área de 25 cm², durante 48 horas e transferidos para outro frasco com o mesmo meio de cultivo sem a adição de soro fetal bovino. Após 24 horas, coletou-se o sobrenadante de cultura contendo o anticorpo monoclonal 20D2 que foi estocado a -20°C até a utilização em imunoenaios.

4.5 Biopanning e seleção de peptídeos ligantes ao mAb 20D2 por *phage display*

Visando avaliar o sítio de ligação do mAb 20D2 à proteína NcROP4, a tecnologia de *phage display* foi empregada. Para tanto, peptídeos miméticos (mimetopos) ao epítipo do mAb foram obtidos a partir de duas bibliotecas comerciais

(Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit - New England Biolabs e Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit - New England Biolabs), as quais expressam seqüências com 12 e 7 aminoácidos, respectivamente, randomicamente dispostos e ligados a fagos filamentosos M13. Cada biblioteca apresentava $2,7 \times 10^9$ clones independentes. Placas de microtitulação de alta afinidade (Maxisorp – Nunc) foram sensibilizadas com 10 µg do anticorpo diluídos em 200 µL de uma solução tampão (0,1 M de NaHCO₃, pH 8,6) e incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida, a placa foi lavada e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução tampão de bloqueio (0,1 M de NaHCO₃, pH 8,6, 5 mg/mL de BSA), por duas horas a 4°C. As placas foram lavadas com TBS com 0,1% de Tween 20 (TBS-T). Em cada poço, foram adicionados 4×10^{10} fagos de cada biblioteca diluídos em TBS-T que foram mantidos sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. Os fagos não ligantes foram removidos por 10 sucessivas lavagens dos poços com TBS-T a 0,1% no primeiro ciclo e nos ciclos subsequentes com TBS-T a 0,5%. Este procedimento foi repedido mais duas vezes. Os fagos ligantes foram eluídos com tampão de eluição (0,2 M de glicina-HCl, pH 2,2, contendo 1 mg/mL de BSA) por 10 minutos a temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com tampão de neutralização (1 M de Tris-HCl, pH 9,2). Alíquotas dos eluatos foram utilizadas para determinar a titulação. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a reamplificação, a cada próximo ciclo, pela infecção em *E. coli* ER2738.

Sequenciamento de DNA dos fagos específicos

Após três ciclos de Biopanning, os clones de fagos individuais selecionados foram coletados aleatoriamente de colônias isoladas e posteriormente amplificados. DNA de fita simples foi extraído e purificado para cada clone conforme descrito por

Xinhua et al. (2000). Realizou-se o sequenciamento utilizando o kit DYEnamic™ ET dye termination (GE Healthcare, EUA) e um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences, NLD). Para a reação do sequenciamento, utilizaram-se os iniciadores M13 (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG -3'), f88-4/15-mer (5'-HOAGAAGTCCGAAGACGATGA - 3') e fUSE5/6-mer (5'-HOGGAGTATGTCTTTTAAGT-3') que amplificam as regiões de DNA do fago correspondente a insertos de aminoácidos codificantes de peptídeos randômicos fusionados a proteína PIII. A análise das sequências de DNA foi realizada em software apropriado (Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15).

4.6 Análises de bioinformática

Sequências de peptídeos selecionadas por *phage display* foram analisadas em dois banco de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> e <http://toxodb.org/>). O alinhamento da sequência de peptídeos selecionados foi desenvolvido utilizando Clustal W2 (<http://www.program.ebi.as.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Predições de epítomos de NcROP4 para células B foi determinada de acordo o banco de dados do IEDB (http://tools.immuneepitope.org/main/html/bcell_tools.html) utilizando “Bepipred Linear Epitope Prediction”. Análise “*in silico*” de NcROP4 ocorreu por modelagem molecular através dos softwares Modeller 8V2 e SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) empregando a proteína ROP2 de *T. gondii* como modelo.

4.7 Imunomarcacão para avaliar a localização de NcROP4 em parasitos extracelulares

Reações de imunofluorescência indireta e imunomicroscopia eletrônica foram desenvolvidos para investigar a ligação do anticorpo monoclonal à proteína NcROP4. Resumidamente, suspensões parasitárias foram tratadas com formaldeído 4% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação lenta e centrifugado a $720 \times g$ por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em água destilada estéril e adicionado em áreas demarcadas de lâminas microscópicas para imunofluorescência. Tais lâminas foram neutralizadas com 100 mM de glicina, lavadas três vezes em PBS e bloqueadas em 3% de BSA em PBS, durante 30 minutos. Após o bloqueio, as lâminas foram permeabilizadas com solução PBT (3% de BSA, 0,1% de triton X-100 em PBS) por 20 minutos. Sobrenadante de cultura contendo o mAb 20D2 foi adicionado aos poços durante uma hora. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas por uma hora com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com AlexaFluor 488 (Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) diluído em PBT (1:2000). As análises foram realizadas em microscópio confocal (LM 510 Meta, Zeiss, Alemanha).

Para imunomicroscopia eletrônica, taquizoítas foram centrifugados a $720 \times g$ por 10 minutos a 4°C e fixados em 4% de paraformaldeído e 0,5% de glutaraldeído em PBS. Os parasitos foram lavados com PBS, fixados em 1% de solução de tetróxido de ósmio, incluídos em 2% de ágar, desidratados em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100%) e incluídos em resina LR White (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Os blocos de resinas foram seccionados (~60 nm) por meio de ultramicrotomo. Os cortes foram colocados em telas de níquel de 200-mesh e processadas para imunomarcção com ouro coloidal. As telas foram bloqueadas em 5% de leite desnatado em TBS contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-TM) e bloqueadas novamente com 2,5% de soro de cabra em TBS. Sobrenadante do hibridoma contendo o mAb 20D2 foi utilizado como anticorpo primário que foi incubado durante duas horas a 37°C. Após ciclos de lavagens, o

anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com ouro coloidal (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) foi inserido nas telas e incubado por mais uma hora a 37°C, lavados novamente e contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo. A ultraestrutura e a marcação foram analisadas e documentadas em microscópio eletrônico de transmissão (EM-109, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de captura de imagens (MegaviewG2/ Soft Imaging Solutions, Olympus, Japão).

4.8 Ensaio de expressão de NcROP4 durante o processo de invasão

Ensaio de presença da proteína NcROP4 foi desenvolvido para determinar o momento em que NcROP4 é encontrada e a sua localização após o processo de invasão. Para tanto, células HeLa foram plaqueadas e cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (1×10^4 células por poço) em lâminas com câmeras (Lab-Tek chambered coverglass, Nunc, Nova York, EUA) até atingirem confluência. Após isso as células foram infectadas em MOI 5 (cinco parasitos por célula) e em diferentes momentos (3, 6 e 18 horas) as células foram fixadas com metanol. O processo de marcação procedeu-se do mesmo modo que na imunofluorescência indireta e as imagens foram analisadas e documentadas em microscópio invertido de epifluorescência (FSX100, Olympus, Japão).

A presença da proteína em células HeLa foi mensurada através de imunomarcação análise em citometria de fluxo. Células HeLa foram plaqueadas e cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (8×10^5 células por poço) em placas de cultivo de 12 poços estéreis (BD Biosciences, Franklin Lakes-NJ, EUA). Após a confluência da monocamada, as células foram infectadas em MOI 5, descoladas com EDTA centrifugadas a $450 \times g$ durante 10 minutos, lavadas três vezes

com PBS e fixadas em 4% de formaldeído a 4°C por 30 minutos. As células foram lavadas e permeabilizadas com PBT durante 20 minutos. Após este período, as células foram incubadas com sobrenadante de cultura de hibridoma com o mAb 20D2 diluído em PBT (1:2), durante uma hora, a 37°C. Utilizou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com AlexaFluor 488 diluído em PBT (1:2000) durante uma hora, a 37°C. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences) e analisadas por meio do software FlowJo (Versão X, TreeStar, Ashland-OR, EUA).

4.9 Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

ELISA indireto para detecção de IgG de camundongos e suas subclasses específicos

Soro de camundongos infectados com *N. caninum* foram submetidos ao ELISA indireto utilizando NLA e rNcROP4 para avaliar o perfil de sororreatividade de IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) aos antígenos. Para tanto, placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Costar 3590, Bloomington, EUA) foram sensibilizada com NLA (10 µg/mL) ou rNcROP4 (5 µg/mL) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após o processo de adsorção, os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e leite desnatado (PBS-TM) a 5% por uma hora a temperatura ambiente. Cada placa foi incubada com soros de camundongos infectados e não infectados (controle) na diluição 1:25 em PBS-TM a 5% a 37°C por uma hora seguido por lavagem em PBS-T. Subsequentemente, adicionou-se às placas anticorpos secundários IgG de coelho anti-IgG de camundongo (1:1000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), IgG de coelho anti-IgG1 (1:4000) e anti-IgG2a (1:2000) (Caltag, South San Francisco, EUA)

marcados com peroxidase em PBS-TM a 1% incubado por uma hora a 37°C. Após lavagem em PBS-T, a reação foi desenvolvida através da adição do substrato da enzima (0,03% H₂O₂ 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 espectrofotômetro (SpectraMax M2e, Molecular Devices).

Em todos os ensaios dois soros positivos e três soros negativos obtidos a partir animais sabidamente infectados ou não com *N. caninum* foram incluídos em cada placa de ELISA como controle da reação. O limiar de reatividade das reações foi calculado 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 e colaboradores (2002) ($IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$).

ELISA avides

ELISA avides procedeu-se semelhantemente ao ELISA indireto para detecção de IgG contra NLA e NcROP4 de camundongos. Um passo adicional foi executado: após incubação com o soro, as placas foram lavadas e adicionou-se ureia a 6 M durante 10 minutos para remover os anticorpos de baixa avides por nova lavagem. Os resultados foram expressos em índice de avides (IA), calculado como a razão entre os valores de índice ELISA obtidos a partir das amostras tratadas (U+) e as amostras não tratadas com ureia (U-) de acordo com a fórmula geral: $IA (\%) = [(IE \text{ U}+) / IE \text{ (U-)}] \times 100$.

ELISA indireto para detecção de IgG de bovinos e caninos utilizando NLA e rNcROP4

ELISA indireto foi realizado para detecção de IgG de bovinos e caninos específicos a NLA e rNcROP4. Os passos dessa reação assemelhou-se ao ELISA para detecção de IgG em soro de camundongo, variando as diluições dos soros de bovino (1:200) e canino (1:100) e dos respectivos conjugados (1:20000 e 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

ELISA reverso para detecção de IgG de bovinos e caninos anti-NcROP4

ELISA reverso foi desenvolvido utilizando o mAb 20D2 como anticorpo de captura da proteína NcROP4 presente no NLA como previamente descrito por Carvalho et al., (2008). Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Costar 3590, Bloomington, EUA) foram adsorvidas com o sobrenadante de cultura do hibridoma secretor do mAb 20D2 diluído (1:1) em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após incubação, procedeu-se a lavagem das placas em PBS-T e os sítios inespecíficos foram bloqueados com o PBS-TM a 5% por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com NLA (20 µg/mL) diluído em PBS-TM a 5% por uma hora a 37°C. Os demais passos da reação (diluição do soro e conjugado) foram iguais ao ELISA indireto para detecção de IgG de bovinos e caninos.

4.10 Análise estatística

Os valores foram expressos em média desvio padrão ou erro padrão da média quando as amostras apresentavam distribuição normal e em mediana e intervalo de confiança quando as amostras não passavam pelo teste de normalidade. Empregou-se o teste *t* de Student para distribuições normais ou Mann-Whitney quando não passavam no teste de normalidade a fim de comparar diferenças das médias entre os níveis de anticorpos expressos em índice ELISA. A associação entre a razão de IgG2a:IgG1 foi analisada pelo teste de *t* de Student. Valores de erro $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla-CA, EUA).



5. Resultados

5.1 NcROP4 é expressa durante o processo de invasão e é secretada para o citoplasma de células HeLa

Por meio de ensaios de imunofluorescência indireta e imunomicroscopia eletrônica foi confirmada a ligação do anticorpo monoclonal à proteína NcROP4. Pôde-se observar a marcação de roptrias de taquizoítas de *N. caninum* evidenciando o reconhecimento da proteína NcROP4 neste compartimento (Figura 3).

Foi analisado a expressão de NcROP4 durante o processo de infecção em células HeLa e detectou-se a expressão da proteína de forma tempo-dependente, exibindo pico de expressão as 18 horas. Quanto a localização, observou-se que a proteína fica retida no vacúolo parasitóforo no início da infecção (3 horas) e, com o passar das horas, a proteína é encontrada de forma difusa no citoplasma da célula hospedeira (6 e 18 horas) (Figura 4).

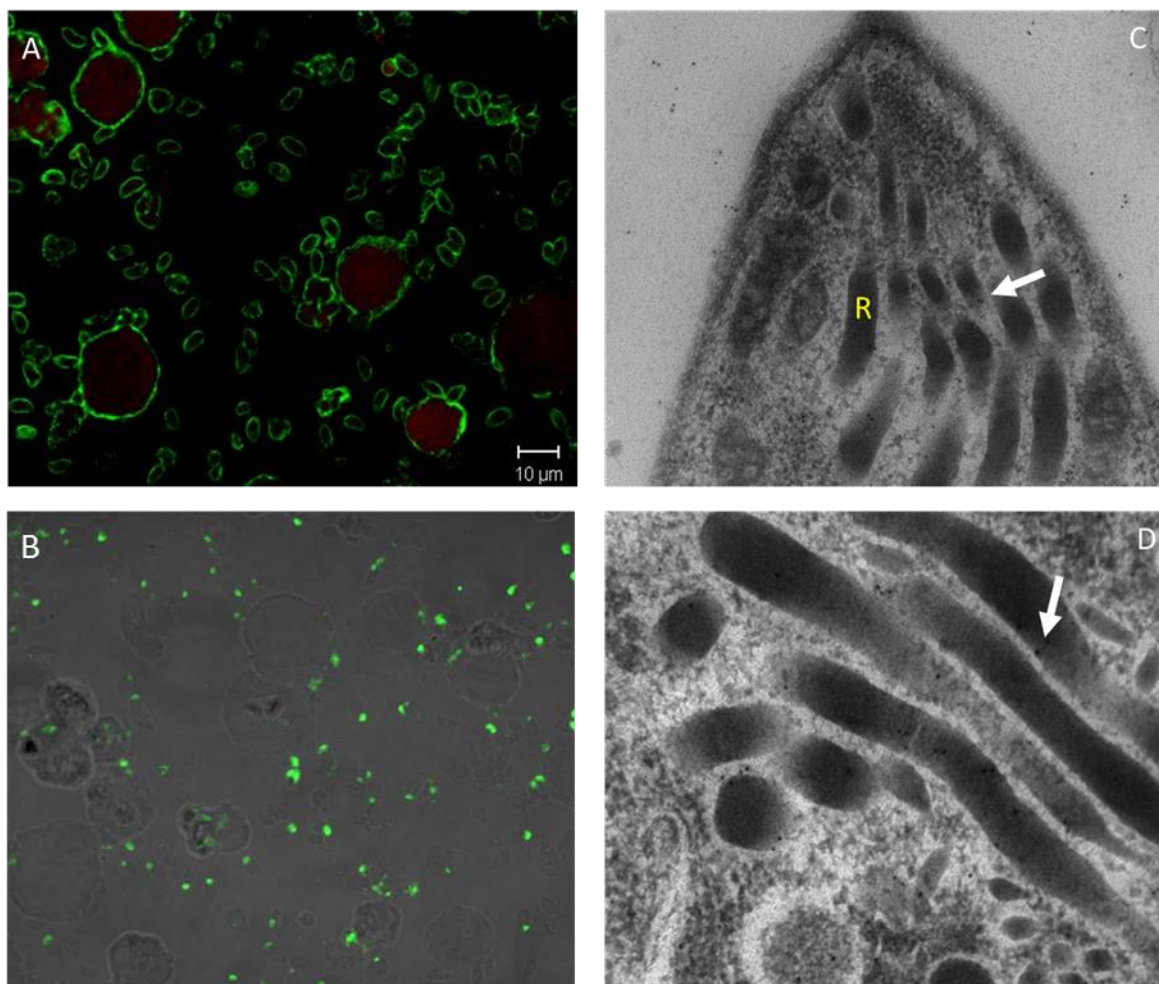


Figura 3 – Reação de imunofluorescência indireta e imunomicroscopia eletrônica evidenciando o reconhecimento do anticorpo monoclonal à proteína NcROP4. (A) Imunofluorescência com anticorpo primário policlonal anti-*N. caninum*. (B) Imunofluorescência com anticorpo primário monoclonal 20D2 anti-NcROP4. (C e D) Microscopia eletrônica de transmissão e marcação da proteína NcROP4 (no interior de roptrias – R) pelo anticorpo monoclonal 20D2 reconhecido por anti-IgG de camundongo marcado com ouro coloidal (setas).

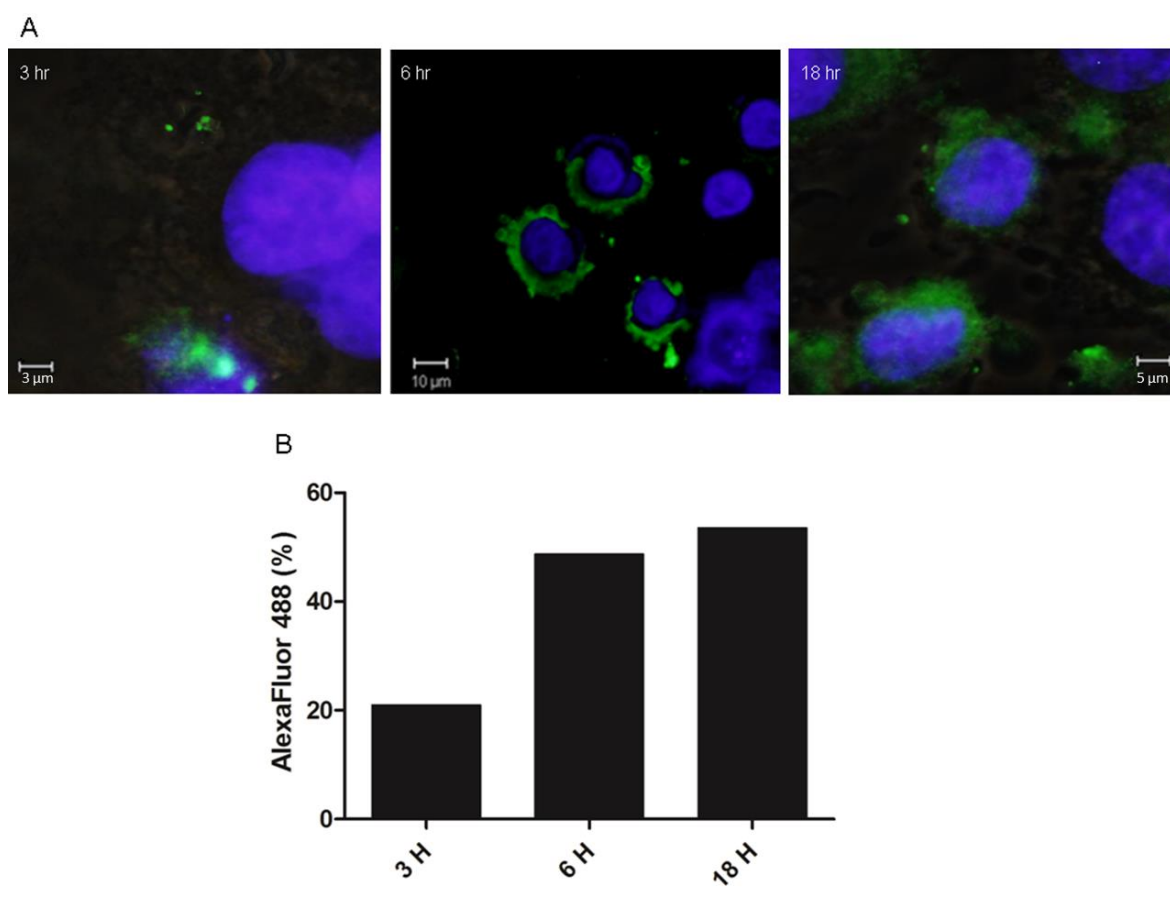


Figura 4 – Análise por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo da expressão e localização de NcROP4 de *N. caninum* durante a invasão em células HeLa. (A) NcROP4 em verde (AlexaFluor488) e núcleo celular em azul (DAPI). (B) Porcentagem de célula com NcROP4.

5.2 Mapeamento de epítomos de células B em NcROP4

Os resultados do mapeamento de epítomos de células B em NcROP4 evidenciaram que a proteína apresenta 23 potenciais epítomos (Figura 5). O epítopo ligante da região reconhecida pelo mAb 20D2 foi identificado através da seleção de peptídeos presente em biblioteca de *phage display*. A partir da biblioteca conformacional de peptídeos constituídos por sete aminoácidos presente em bacteriófagos foi possível identificar 17 diferentes sequências ligantes ao anticorpo, enquanto a utilização da biblioteca de peptídeos de 12 aminoácidos permitiu a identificação de oito sequências ligantes ao mAb. Realizou-se o alinhamento das sequências dos peptídeos selecionados por *phage display* com a sequência de NcROP4 para verificar a região reconhecida pelo anticorpo 20D2, desse modo, observou-se que o epítopo de ligação do mAb se localiza entre os aminoácidos 360 e 400 da sequência nativa (Figura 6).

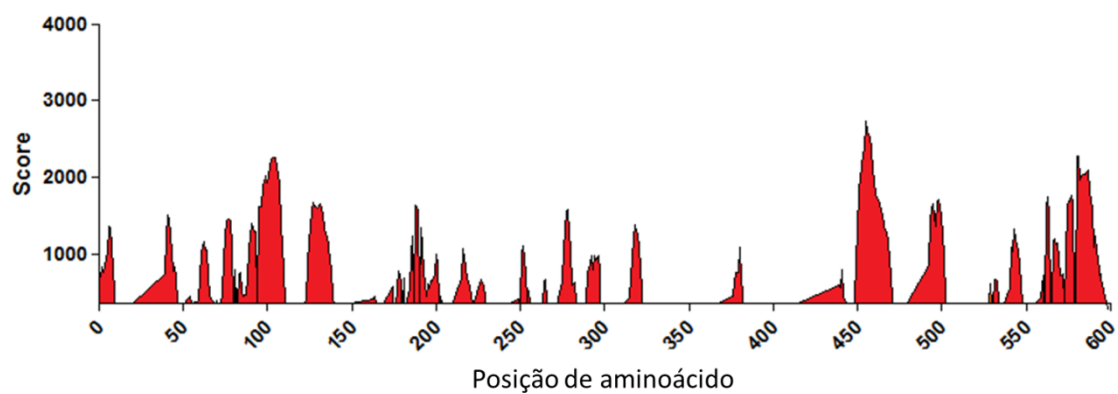


Figura 5 – Predição de epítomos de célula B para NcROP4 segundo “Bepipred Linear Epitope Prediction”. Eixo Y inicia com o limiar de predição de 350. Eixo X representa a sequência de aminoácidos nativos.

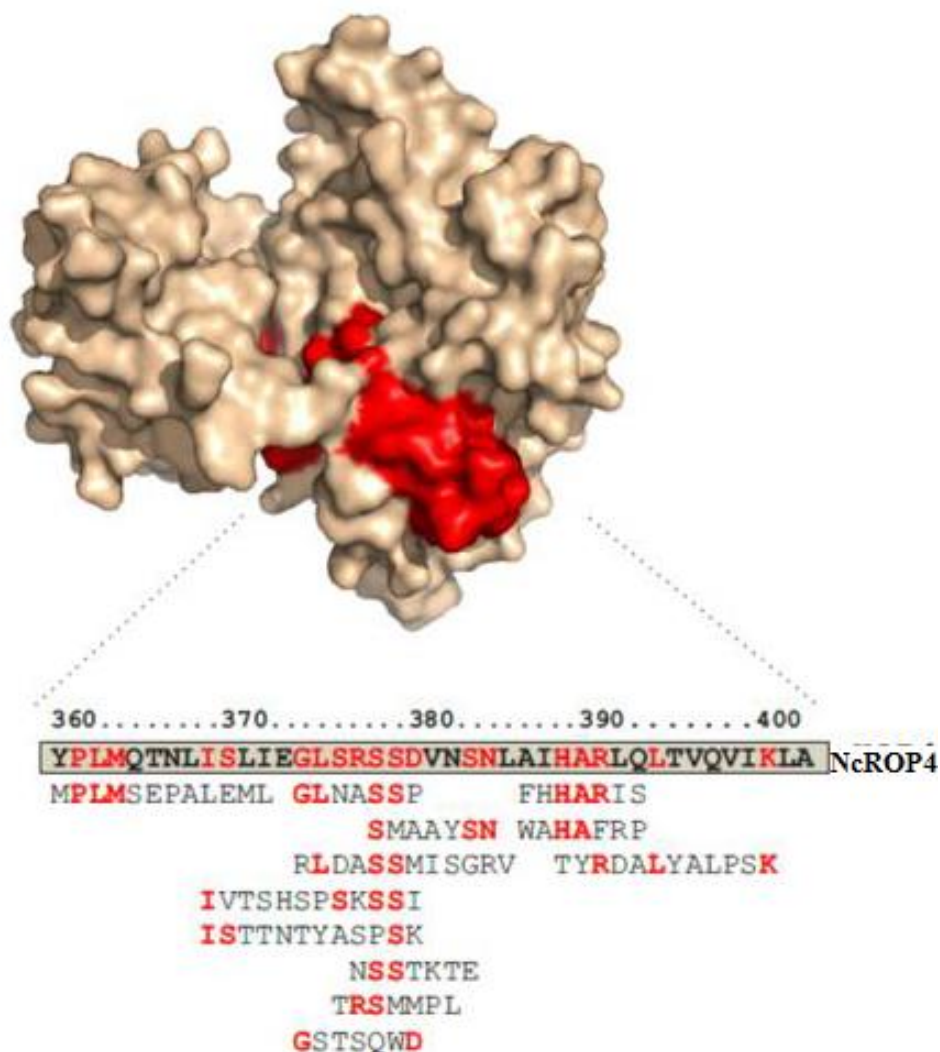


Figura 6 – Análise *in silico* da estrutura tridimensional de NcROP4 e alinhamento da sequência proteica com peptídeos selecionados por *phage display*. Parte superior da figura: estrutura tridimensional de NcROP4 com a região ligante do mAb 20D2 (vermelho). Parte inferior da figura: alinhamento das sequências de aminoácidos de NcROP4 com os peptídeos selecionados pro *phage display*, os aminoácidos coincidentes entre as sequências estão destacados em vermelho.

5.3 Clonagem e purificação de rNcROP4 em modelo procarioto (*E. coli*)

DNA plasmidial de rNcROP4 foi clonado e amplificado em *E. coli* e purificado em cromatografia de afinidade (Ni^{2+}). Para avaliar se o plasmídeo foi inserido em colônias previamente selecionadas, o DNA plasmidial foi extraído, amplificado e analisado em gel de agarose e constatou-se que todas as colônias transformadas apresentavam o DNA plasmidial. Após indução, a expressão de rNcROP4 foi avaliada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% onde observou-se expressão da proteína por *E. coli* (Figura 7).

A purificação de rNcROP4 foi avaliada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, onde observou-se a purificação de uma proteína de 65kDa nos diferentes elutos. Confirmou-se que era a proteína em questão utilizando soro de camundongo infectado com *N. caninum* por *Western blotting* em gel 10% (Figura 8).

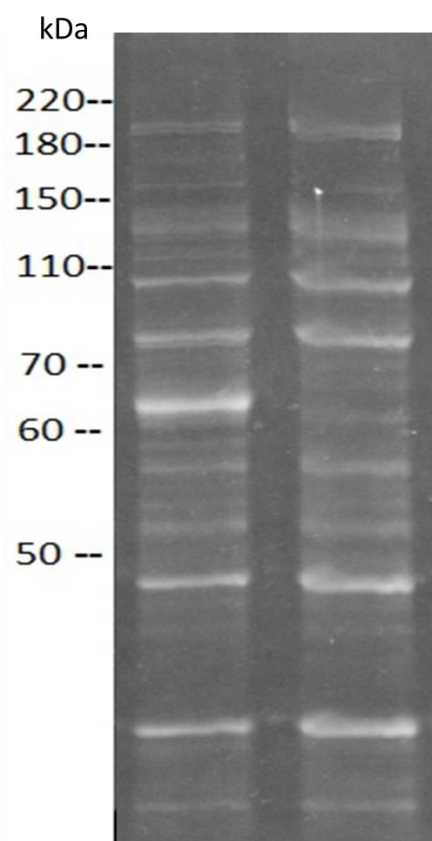


Figura 7 – Expressão de rNcROP4 em *E. coli*. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% constatando a presença da proteína NcROP4 recombinante em colônias de *E. coli* induzidas e não induzidas por IPTG. Primeira raia: lisado de *E. coli* previamente induzida. Segunda raia: lisado de *E. coli* não induzida. Peso molecular da proteína: 65 kDa.

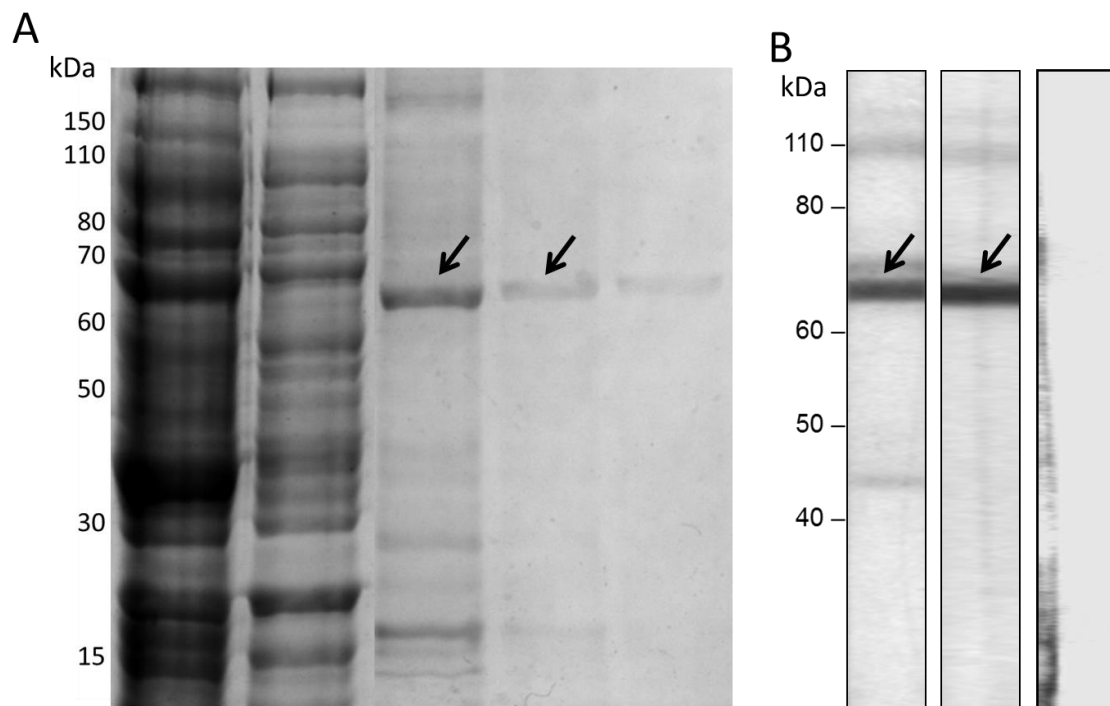


Figura 8 – Purificação e reconhecimento de rNcROP4. (A) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% da purificação de rNcROP4 em coluna de afinidade. Raia 1– Lisado solúvel de *E. coli*, “aplicado”. Raia 2 – Não ligado “void”. Raias 3 a 5 – Proteína recombinante purificada (seta). (B) *Western blotting* do reconhecimento de rNcROP4. Raias 1 e 2 – Setas indicando a ligação de soro de camundongo infectado por *N. caninum* reconhecendo a proteína de 65 kDa. Raia 3 – soro de camundongo negativo para *N. caninum* (rNcROP4).

5.4 Anticorpos IgG específicos contra rNcROP4 são produzidos na fase crônica da infecção em camundongos

A produção de anticorpos IgG anti-NLA foi detectada em camundongos infectados por *N. caninum* após 7 dias, aumentou até 30 dias pós-infecção e manteve-se constantes nos demais momentos da cinética (60 e 90 dias). A sororreatividade à rNcROP4 foi constatada somente após 30 dias de infecção e elevou-se no decorrer do tempo (60 e 90 dias) (Figura 9A).

A fim de avaliar a força de ligação de anticorpos IgG, foi mensurado a avides dos anticorpos anti-NLA e anti-rNcROP4. Os resultados evidenciaram que IgG anti-NLA apresenta média avides no início da infecção (7 dias) e alta nos demais momentos. Já anticorpos IgG anti-rNcROP4 exibem alta avides sempre que detectados – a partir dos 30 dpi (Figura 9B).

Com relação às subclasses de IgG, verificou-se que a detecção de anticorpos IgG1 anti-NLA ocorreu no início da infecção (7 dias), apresentando incremento considerável a partir dos 30 dpi, mantendo-se constante no decorrer da infecção. Anticorpos IgG1 anti-rNcROP4 foram detectados de forma limítrofe inicialmente com 15 dias de infecção. Todavia, a sororreatividade estabeleceu-se efetivamente com 30 dias de infecção e manteve-se constante no decorrer da cinética analisada (Figura 10A).

A detecção de anticorpos IgG2a anti-NLA demonstrou um perfil cinético semelhante ao observado para os anticorpos IgG específicos, no qual a reatividade ocorreu desde início e aumentou no decorrer da infecção. Já a detecção de anticorpos IgG2a anti-rNcROP4 foi observada 30 dias após a infecção, aumentando sua concentração e mantendo níveis constantes durante toda a cinética (Figura 10B). A razão IgG2a:IgG1 permitiu constatar que IgG anti-NLA apresentaram diferença

significante na produção das subclasses de IgG com 0, 7 e 15 dias de infecção e nos demais momentos avaliados (30, 60 e 90 dias) tal diferença não foi observada. Já para rNcROP4 não houve distinção entre as subclasses em nenhum momento da cinética (Figura 10C).

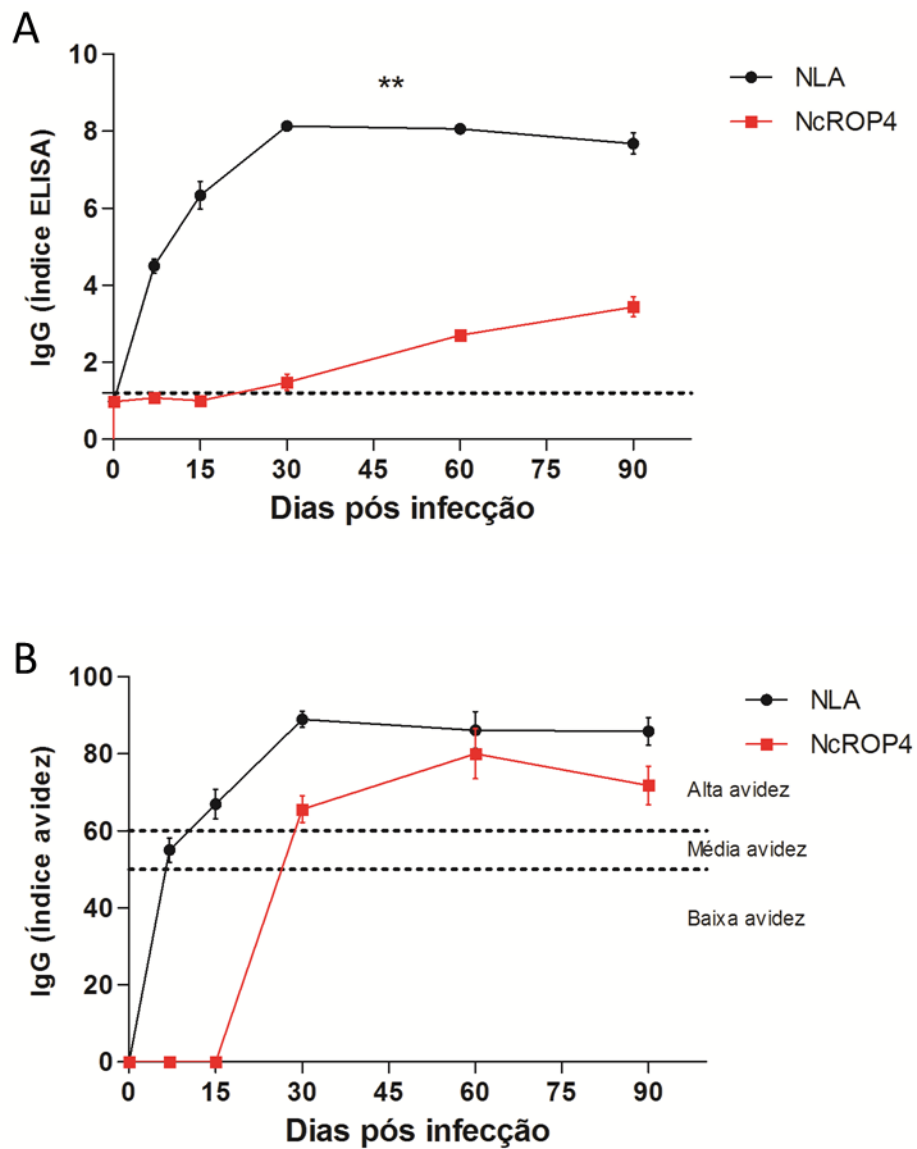


Figura 9 – Perfil de reconhecimento de a NLA e rNcROP4 de camundongos experimentalmente infectados por *N. caninum*. (A) Sororreatividade de IgG total, (B) Índice Avidez de anticorpos IgG anti-NLA e anti-rNcROP4. A linha pontilhada horizontal em A representa o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2).

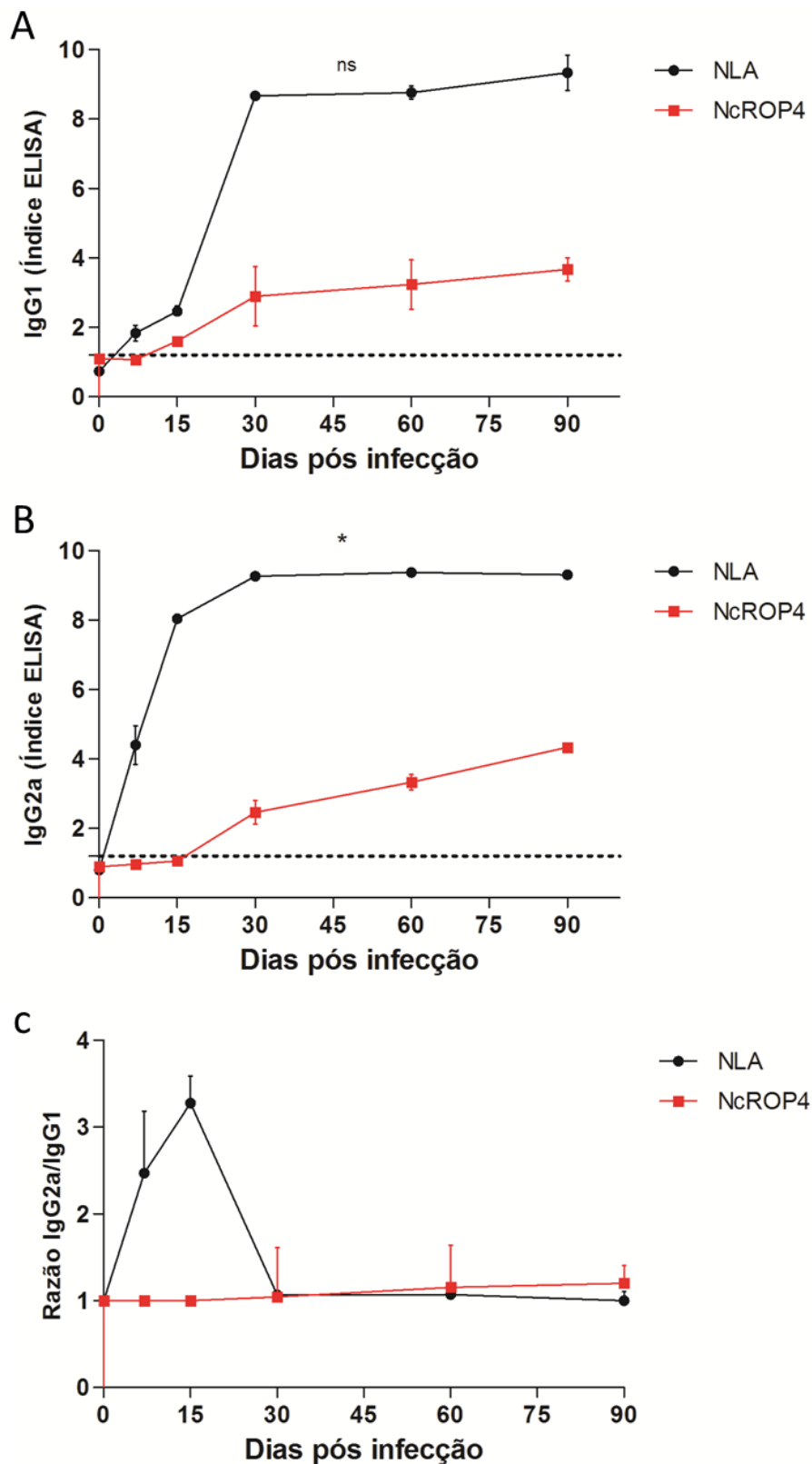


Figura 10 – Perfil de reconhecimento de IgG1 e IgG2a a NLA e rNcROP4 de camundongos experimentalmente infectados por *N. caninum*. Sororreatividade de (A) IgG1 e (B) IgG2a. (C) Razão entre IgG1:IgG2a. As linhas pontilhadas horizontais dos gráficos A e B representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2).

5.5 Anticorpos IgG de bovinos reconhecem NcROP4 na fase crônica da infecção e reexposição ao parasito

A produção de anticorpos IgG anti-NLA e anti-NcROP4 por bovinos infectados experimentalmente foi determinada por ELISA indireto e ELISA reverso. De modo geral, a soroconversão para NLA foi observada após 15 dias de infecção. Os níveis séricos de IgG aos antígenos solúveis de *N. caninum* perdurou até cerca de 160 dias, momento em que ocorreu uma diminuição na detecção desses anticorpos a níveis basais até o momento da reinfecção (276 dias), que demonstrou pico na produção de IgG contra NLA. Através do ELISA indireto utilizando rNcROP4, constatou-se que a sororreatividade ocorreu após 44 dias de infecção, que permaneceu constante até a reinfecção, momento em que semelhantemente a NLA ocorreu um pico de reconhecimento. Contudo, anticorpos IgG anti-NcROP4 detectados pelo ELISA reverso foram moderadamente observados durante a infecção precoce (15 dias) e manteve níveis basais até o momento da reinfecção. Semelhantemente à detecção de IgG anti-NLA e anti-rNcROP4, a detecção de IgG contra NcROP4 nativa foi consideravelmente maior na reinfecção, estabelecendo um pico de detecção após 300 dias da primeira infecção, determinando sororreatividade somente neste momento (Figura 11).

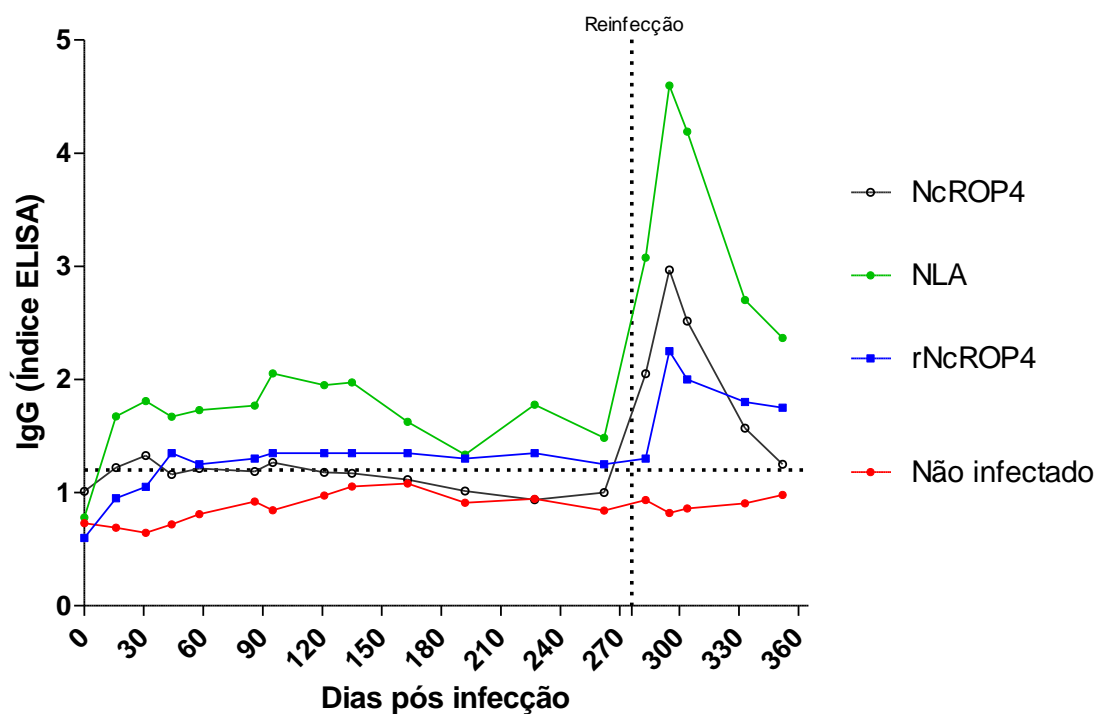


Figura 10 – Cinética de sororreatividade a NLA e NcROP4 por bovinos experimentalmente infectados com *N. caninum*. Soro de bovinos infectados foram testados para NcROP4 nativa (linha preta), NLA (linha verde) e rNcROP4 (linha azul). Com controle utilizou-se soro de animais não infectados (linha vermelha). A linha pontilhada vertical evidencia o momento de reinfecção (276 dias). A linha pontilhada horizontal representa o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2).

5.6 Anticorpos IgG de animais naturalmente infectados por *N. caninum* exibem sororeatividade a NLA, a rNcROP4 e a NcROP4 nativa

ELISA indireto e ELISA reverso foram utilizados para detectar IgG anti-NLA, anti-rNcROP4 e anti-NcROP4 em soro de bovinos e caninos infectados naturalmente. Como esperado, todas as 27 (100%) amostras do grupo contendo bovinos positivos foram soropositivos para NLA, enquanto 22 (81%) foram soropositivas para rNcROP4 e nove (30%) foram soropositivos para NcROP4. Nenhuma amostra do grupo de bovinos negativos demonstrou sororeatividade a NLA, rNcROP4 e NcROP4 (Figura 11).

No grupo de caninos positivos todas as 21 (100%) amostras foram sororreativas para NLA, 18 (86%) soropositivas para rNcROP4 e nove (43%) para NcROP4. No grupo de caninos negativos não houve sororeatividade para os diferentes antígenos testados (Figura 12).

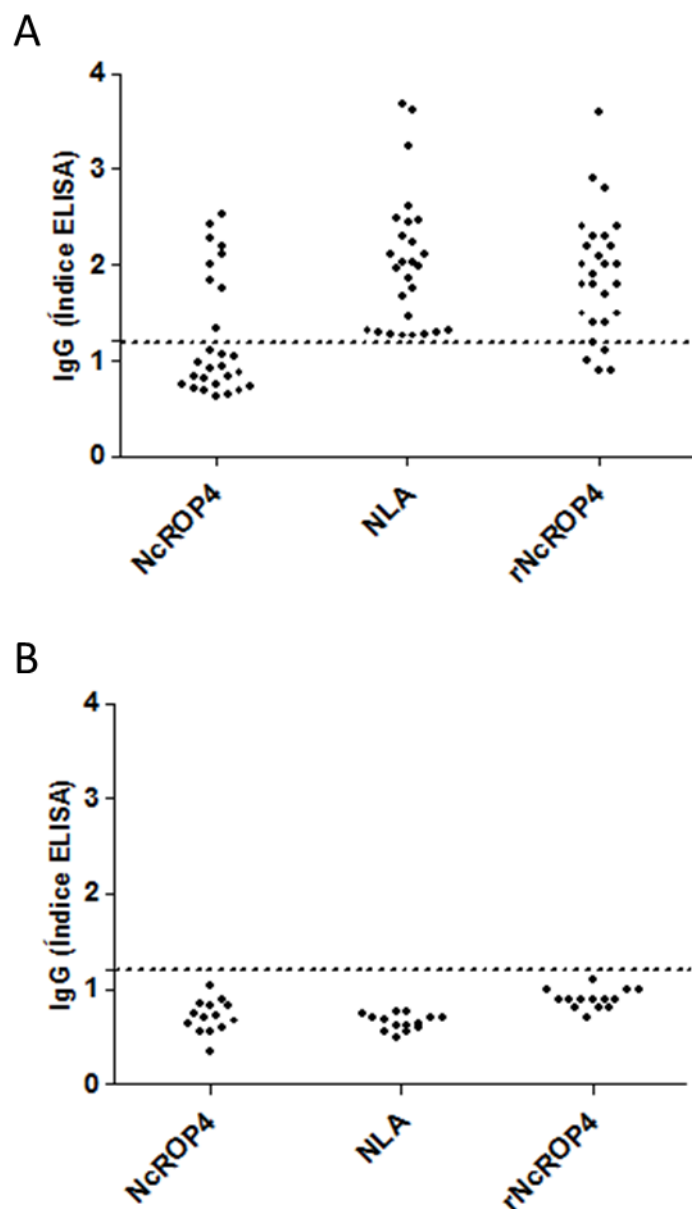


Figura 11 – Sororreatividade de IgG de bovinos a NcROP4, NLA e rNcROP4 em amostras de soro previamente triadas por RIFI e ELISA. (A) Amostras de soro de bovinos positivos para *N. caninum*. (B) Amostras de soro de bovinos negativos para *N. caninum*. As linhas pontilhadas horizontais representam o limiar de reatividade para cada reação ($IE > 1,2$).

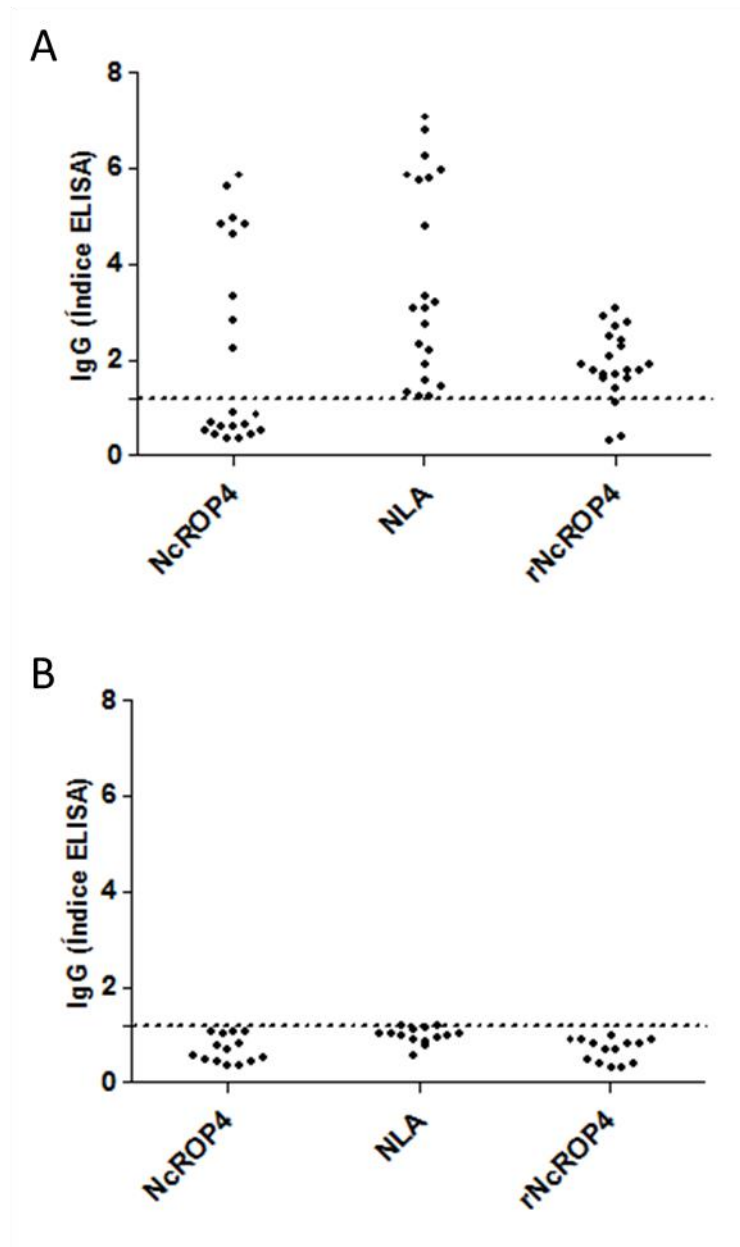


Figura 12 – Sororreatividade de IgG de caninos a NcROP4, NLA e rNcROP4 em amostras de soro previamente triadas por RIFI e ELISA. (A) Amostras de soro de caninos positivos para *N. caninum*. (B) Amostras de soro de caninos negativos para *N. caninum*. As linhas pontilhadas horizontais representam o limiar de reatividade para cada reação (IE>1,2).



6. Discussão

O estudo de componentes secretório de parasitos do filo Apicomplexa é importante para compreender a imunogenicidade, avaliar fatores de virulência e desenvolver métodos diagnósticos efetivos para doenças infecciosas. Já havia sido demonstrado a imunogenicidade de NcROP4 de *N. caninum* através do desenvolvimento do anticorpo monoclonal 20D2 (SOHN et al., 2011). No presente estudo, esse anticorpo foi utilizado como ferramenta para avaliar expressão e localização dessa proteína e no incremento de um possível teste diagnóstico da infecção por *N. caninum*.

Acerca da presença de NcROP4 foi observado que a proteína é presente durante todo o curso da infecção em células HeLa, de maneira crescente, apresentando altos níveis de expressão com 6 e 18 horas de infecção. Sabe-se que as proteínas de roptrias são extremamente importantes para a invasão e estabelecimento do parasito por participarem da formação e manutenção do vacúolo parasitóforo e recrutarem organelas celulares como mitocôndria para próximo do compartimento parasitado (BECKERS et al., 1994; CARRUTHERS et al., 1999; NAKAAR et al., 2003; CAREY et al., 2004; BINDER e KIM, 2004; KESSLER et al., 2008). Com relação à localização do parasito, observou-se que no início da infecção (3 horas) NcROP4 encontrava-se no vacúolo parasitóforo, após esse tempo, a proteína localizava-se no citoplasma celular (6 e 18 horas). Semelhante a NcROP4, ROP4 de *T. gondii* é secretada no interior do vacúolo parasitóforo (VP) aonde torna-se fosforilada (CAREY et al., 2004), já ROP2, ROP5 e ROP18 acoplam-se à membrana do VP e ROP5 e ROP18 passam a apresentar atividade pseudoquinase e quinase, respectivamente, entretanto, essa capacidade não é confirmada em *N. caninum* sendo um fator chave na diferença da virulência entre os dois parasitos (HANKS e HUNTER, 1995; NAKAAR et al., 2003; EL-HAJJ et al., 2006; SAEIJ et al., 2006; TAYLOR et al., 2006; EL-HAJJ et al., 2007; LEI et al., 2014). Após replicação,

N. caninum por apresentar ciclo lítico, rompe a célula, permitindo que o conteúdo citoplasmático extravase para o espaço extracelular (DUBEY e LINDSAY, 1996). Desse modo, as proteínas dos parasitos presentes no citoplasma celular podem ser reconhecidas pelo sistema imune e consequentemente gerar resposta humoral com produção de anticorpos epítomos-específicos podendo auxiliar no desenvolvimento de uma ferramenta adicional no sorodiagnóstico da neosporose.

Sabe-se que o diagnóstico de tal doença é realizado por diversos testes sorológicos incluindo imunofluorescência indireta (RIFI) com taquizoítas, immunoblotting (IB) com diversas frações antigênicas, teste de aglutinação direta (DAT) e uma variedade de ELISA (PACKHAM, et al., 1998; ATKINSON et al., 2000; DUBEY, 2003; DUBEY et al., 2007). A RIFI é considerada padrão ouro no sorodiagnóstico, contudo tal teste detecta apenas a presença de anticorpos IgG contra o patógeno, constatando soropositividade ou soronegatividade (DUBEY, 2003; DUBEY e SCHARES, 2006; GHALMI et al., 2012) e não considera o momento exato da infecção. Desse modo, a utilização de antígenos específico do parasito no sorodiagnóstico pode indicar a fase de infecção do hospedeiro.

Um modo de verificar se um antígeno pode ser utilizado no diagnóstico de uma doença infecciosa é por meio de análises de bioinformática e de *phage display* que visam avaliar as regiões de proteínas preditas como epítomos de célula B. No presente estudo tais técnicas foram empregadas para determinar os possíveis epítomos de NcROP4 e a região ligante do mAb 20D2. O *phage display* consiste em uma tecnologia baseada em DNA recombinante que resulta na expressão de vários peptídeos clonados em bacteriófagos. Por meio de seleção, peptídeos de alta afinidade se ligam a anticorpos e são denominados mimetomos (GERMASCHEWSKI et al., 1995; SMITH e PETRENKO, 1997; WANG e YU, 2004). Essa técnica é utilizada na determinação de

mimetopos utilizados em vacinas e diagnóstico de diversas doenças parasitárias como malária (DEMANGEL et al., 1996; GREENWOOD et al., 2001), doença de Chagas (PITCOVSKY et al., 2001) e toxoplasmose (BEGHETTO et al., 2003a; CUNHA-JÚNIOR et al., 2010). Através de tais análises foi possível constatar que NcROP4 apresenta 23 possíveis epítomos de célula B e o mAb 20D2 liga-se ao resíduo de 360 a 400 aminoácido da proteína. Esses dados foram importantes no desenvolvimento de sorodiagnóstico baseado em ELISA indireto e reverso com o mAb 20D2.

O ELISA reverso se baseia na captura da proteína antigênica por um mAb que, por consequência bloqueia o epítopo ao qual se liga durante tal captura (CARVALHO et al., 2008). Através disso, a proteína NcROP4 com o epítopo ligante de 20D2 bloqueado foi utilizada para avaliar seu potencial marcador de fase de infecção e pôde-se observar que a proteína pode ser utilizada como marcador de reinfeção. Carvalho e colaboradores (2008) utilizaram esta técnica com mAb's contra SAG1, SAG2A e p97 de *T. gondii* para avaliar a detecção de anticorpos de diferentes isotipos no diagnóstico da toxoplasmose em humanos e revelaram maior sensibilidade e especificidade do que no ELISA indireto utilizando antígenos solúveis do parasito.

Para avaliar o potencial sorodiagnóstico da proteína por ELISA indireto, NcROP4 recombinante, apresentando epítopo ligante de 20D2 livre, foi expressa em modelo procarioto. Diferentemente do ELISA reverso, tal proteína foi reconhecida por IgG de camundongos e bovinos cronicamente infectados, diferentemente do antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA) que foi detectado durante todas as fases de infecção tanto em modelo bovino e murino quanto em animais infectados naturalmente. Esses dados constataam que o epítopo ligante de 20D2 bloqueia a ligação de anticorpos marcadores de fase crônica durante o ELISA reverso e os demais epítomos determinam a reinfeção.

Aguado-Martínez e colaboradores (2008) utilizaram a proteína de superfície NcSAG4 e de grânulo denso NcGRA7 recombinantes para avaliar potencial marcador de fase de infecção em bovinos e constataram que rNcGRA7 pode ser utilizada como marcador de fase aguda (primo-infecção, reinfecção ou recrudescência) e rNcSAG4 como marcador de fase crônica da infecção. Hiasa e colaboradores (2012) utilizaram rNcGRA7 e rNcSAG1 e certificaram que as proteínas indicam ativação da infecção, sendo uma ferramenta adicional no diagnóstico de bovinos prenhes. Diversos outros estudos vêm utilizando proteínas nativas ou recombinantes de parasitos para obtenção de um diagnóstico mais sensível e específico e alguns destes visam desenvolver diagnósticos específicos ao estágio de infecção do hospedeiro (KRAUTZ et al., 1995; NISHIKAWA et al., 2001; DANIEL et al., 2002; BEGHETTO et al., 2003b; GHALMI et al., 2009; HOSSEININEJAD et al., 2010; HE et al., 2013; DRAPALA et al., 2014).

Avaliou-se também as subclasses de IgG detectados no ELISA indireto com NLA e rNcROP4. Observou-se que a produção de IgG1 anti-NLA inicia-se na fase aguda com baixos níveis e aumenta na fase crônica, já IgG2a anti-NLA é detectada durante toda a infecção. IgG1 e IgG2a anti-rNcROP4 foram detectadas semelhantemente na fase crônica o que revela que a detecção de subclasses de IgG anti-rNcROP4 não oferece informações adicionais sobre a fase de infecção. Dados confirmados pela análise da razão IgG2a:IgG1. Com relação a avidéz de anticorpos anti-NLA e anti-rNcROP4, também não houveram informações adicionais quanto a fase de infecção, sendo que ambos apresentam alta avidéz durante a fase crônica da infecção.

Por fim, os resultados apresentados sugerem que NcROP4 recombinante é um marcador de fase crônica de infecção por *N. caninum* durante o sorodiagnóstico por ELISA indireto e por meio do ELISA reverso com o mAb 20D2, NcROP4 é um marcador de reinfecção.



7. Conclusões

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- NcROP4 é presente progressivamente durante a infecção por *N. caninum* em células HeLa sendo exportada para o citoplasma da célula hospedeira no decorrer da infecção.
- NcROP4 apresenta 23 regiões preditas epítomos de células B em análises de bioinformática.
- O mAb 20D2 se liga à região entre os aminoácidos 360 e 400 de NcROP4.
- Camundongos infectados experimentalmente por *N. caninum* produzem anticorpos IgG de altas avides e as subclasses IgG1 e IgG2a anti-rNcROP4 após 30 dias de infecção.
- Anticorpos IgG de bovinos anti-NcROP4 é detectado após reinfecção no ELISA reverso e durante a fase crônica no ELISA indireto com rNcROP4.
- Anticorpos de bovinos e caninos infectados naturalmente por *N. caninum* reconhecem parcialmente NcROP4, evidenciando a fase crônica ou reinfecção da doença.
- NcROP4 pode ser utilizada como marcador de fase crônica da infecção por *N. caninum*, sendo uma estratégia adicional no sorodiagnóstico da neosporose.

8. Referências

- AGUADO-MARTINEZ, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ARNAIZ-, SECO, I.; REBORDOSA-TRIQUEROS, X.; NAVARRO-LOZANO, V.; ORTEGA-MORA, L.M. Usefulness of rNcGRA7-and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.182–195, 2008.
- ALAEDDINE, F.; HEMPHILL, A.; DEBACHE, K.; GUIONAUD, C. Molecular cloning and characterization of NcROP2Fam-1, a member of the ROP2 family of rhoptry proteins in *Neospora caninum* that is targeted by antibodies neutralizing host cell invasion in vitro. **Parasitology**, v. 140, p. 1033-1050, 2013.
- ANDRIANARIVO, A.G., ANDERSON, M.L., ROWE, J.D., GARDNER, I.A., REYNOLDS, J.P., CHOROMANSKI, L., CONRAD, P.A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, v. 96, p. 24–31, 2005.
- ASHBURN, D.; DAVIDSON, M.M.; JOSS, A.W.L.; PENNINGTON, T.H.; HO-YEN, D.O. Improved diagnosis of reactivated toxoplasmosis. **Journal of Clinic Pathology**, v. 51, p. 105–109, 1998.
- ATKINSON, R.; HARPER, P.A.; RYCE, C.; MORRISON, D.A.; ELLIS, J.T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 363-370, 1999.
- ATKINSON, R.; HARPER, P.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infection of cattle. **Parasitology Today**, v. 16, p. 110-114, 2000.
- BARR, B. C., J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY, J. P. REYNOLDS, AND S. J. WELLS. Neosporosis, its prevalence and economic impact. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary, v.20, n.9, p.1-16, 1991.
- BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; KIENAST, M.; UNZAGA, J.M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 299-303, 2005.
- BECKERS, C. J. M.; DUBREMETZ, J. F.; MERCEREAU-PAIJALON, O.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. **Journal of Cell Biology**, v. 127, p. 947-961, 1994.
- BEGHETTO, E.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; DEL-PEZZO, M.; CRISTINA, M.; MINENKOVA, O.; PETERSEN, E.; FELICI, F.; GARGANO, N. Use of an Immunoglobulin G Avidity Assay Based on Recombinant Antigens for Diagnosis of Primary *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 12, p. 5414-5418, 2003a.

BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BUFFOLANO, W.; DEL PEZZO, M.; MINENKOVA, O.; PAVONI, E.; PUCCI, A.; CORTESE, R.; FELICI, F.; GARGANO, N. Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 163-173, 2003b.

BEHNKE, M.S.; KHAN, A.; WOOTTON, J.C.; DUBEY, J.P.; TANG, K.; SIBLEY, L.D. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p. 9631–9636, 2011.

BERTOZZI, L.C.; SUZUKI, L.A.; ROSSI, C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p.175-177, 1999.

BILLKER, O.; LOURIDO, S.; SIBLEY, L.D. Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. **Cell Host Microbe**, v. 5, p. 612–622, 2009.

BINDER, E.M.; KIM, K. Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of *Toxoplasma* and *Plasmodium*. **Traffic**, v. 5, p. 914-924, 2004.

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

BJORKMAN, C.; NASLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S.W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, 11, 41–44, 2009.

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.

BUTCHER, B.A.; FOX, B.A.; ROMMEREIM, L.M.; KIM, S.G.; MAURER, K.J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D.R.; BZIK, D.J.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. **PLoS Pathogens**, v.7, p.1-16, 2011.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L.C.; KASPER, L.H. Mucosal differences against orally acquired protozoan parasite, emphasis on *Toxoplasma gondii* infection. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 535-544, 2006.

CAREY, K. L.; JONGCO, A. M.; KIM, K.; WARD, G. E. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 1320-1330, 2004.

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

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BELA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies against SAG1 - Related Sequence, SAG2A, and p97 Antigens from *Toxoplasma gondii* To Detect Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA Antibodies in Human Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 1265-1271, 2008.

CESBRON-DELAUW, M. F.; GENDRIN, C.; TRAVIER, L.; RUFFIOT, P.; MERCIER, C. Apicomplexa in Mammalian Cells: Trafficking to the Parasitophorous Vacuole. **Traffic**, v. 9, p. 657-664, 2008.

CHAHAN, B.; GATURAGA, I.; HUANG, X.; LIAO, M.; FUKUMOTO, S.; HIRATA, H.; NISHIKAWA, Y.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; XUAN, X. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1 **Veterinary Parasitology**, v.118, p. 177-185, 2003.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ANÁIS-SECO, I.; BURGOS, B.M.; RODRIGUES-BERTOS, A.; ADDURIZ, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesion between epidemic and endemic bovine abortion cases. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 187-191, 2006.

COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZÊDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; ARAÚJO, F.R.; McALLISTER, M.M.; GONDIM, F.L.P. Chickens (*Gallus domesticus*) are naturally intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 157-159, 2008.

COZON, G.J.; FERRANDIZ, J.; NEBHI, H.; WALLON, M.; PEYRON, F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, 32-36, 1998.

CUNHA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, D.A.; SILVA, N.M.; SOUZA, M.A.; SOUZA, G.R.; PRUDENCIO, C.R.; PIROVANI, C.P.; CEZAR, M.; CASCARDO, J.; BARBOSA, B.F.; GOULART, L.R.; MINEO, J.R. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. **Immunobiology**, v. 215, p. 26-37, 2010.

DANIEL, K.; TANG, K.; PATRICIA, A.; CONRAD, K.S.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, 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, p. 611-615, 2002.

- DAHER, W.; SOLDATI-FAVRE, D. Mechanisms controlling glideosome function in apicomplexans. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 408-414, 2009.
- DEMANGEL, C.; LAFAYE, P.; MAZIE, J. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. **Molecular Immunology**, v. 33, p. 909-916, 1996.
- DRAPALA, D.; HOLEC-GĄSIOR, L.; KUR, J.; FERRA, B.; HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; LAUTENBACH, D. A new human IgG avidity test, using mixtures of recombinant antigens (rROP1, rSAG2, rGRA6), for the diagnosis of difficult-to-identify phases of toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 342-6, 2014.
- DUBEY, J.P. CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.
- 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, 1988b.
- DUBEY, J.P.; JANOVITZ, E.B.; SKOWRONEK, A.J. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. **Veterinary Parasitology**, v. 43, p. 137-141, 1992.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 1-59, 1996.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367, 1999.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.C.; 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**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *N. caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1-34, 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.

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

DUBREMETZ, J.F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 841-848, 2007.

EASTICK, F.A.; ELSHEIKHA, H.M. Stress-driven stage transformation of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1009-1014, 2010.

EL-HAJJ, H.; DEMEY, E.; PONCET, J.; LEBRUN, M.; WU, B.; GALEOTTI, N.; FOURMAUX, M.N.; MERCEREAU-PUJALON, O.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J.F. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. **Proteomics**, v. 6, p. 5773-5784, 2006.

EL-HAJJ, H.; LEBRUN, M.; AROLD, S.T.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J.F. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. e14, 2007.

FLEIGE, T.; SOLDATI-FAVRE, D. Targeting the transcriptional and translational machinery of the endosymbiotic organelle in apicomplexans. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 948-956, 2008.

GERMASCHESKI, V.; MURRAY, K. Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within PreS1 of hepatitis B virus. **Journal of Medical Virology**, v. 45, p. 300-305, 1995.

GHALMI, F.; CHINA, B.; KAIDI, R.; LOSSON, B. Evaluation of a SRS2 sandwich commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine and canine sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 108–111, 2009.

GHALMI, F.; CHINA, B.; GHALMI, A.; HAMMITOUCHE, D.; LOSSON, B. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 655-661, 2012.

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

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

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

GREENWOOD, J.; WILLIS, A.; PERHAM, R. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. **Journal of Molecular Biology**, v. 220, p. 821-827, 2001.

HANKS, S.K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **Faseb Journal**, v. 9, p. 576-596, 1995.

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, p. 2117-2120, 2013.

HECKER, Y. P. VENTURINI, M.C.; CAMPERO, C.M.; ODEÓN, A.C.; MOORE, D.P. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, 2012.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPALA, I.; MAKELA, O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **Journal of Infectious Diseases**, 159, 736–739, 1989.

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

HIASA, J.; KOHARA, J.; NISHIMURA, M.; XUAN, X.; TOKIMITSU, H.; NISHIKAWA, Y. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 379–385, 2012.

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, p. 337–342, 2010.

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, p. 611-615, 2002.

INNES, E.A.; PANTON, W.R.M.; MARKS, J.; TREES, A.J; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D. Interferon- gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of h-3 uracil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, p. 95-100, 1995.

INNES, E.A.; WRIGHT, S.E.; MALEY, S. RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON C.; CAREY, I.M.; BUXTON, D. Protection against

vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1523–1534, 2001.

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**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

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

INNES, E. A.; MATTSSON, J.G. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.23 n.2, p.43-44, 2007.

IQBAL, J.; KHALID, N. Detection of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by IgG avidity and PCR analysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1495-1499, 2007.

JEWETT, T.J.; SIBLEY, L.D. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. **Molecular Cell**, v. 11, p. 885-894, 2003.

JOINER, K.A.; ROOS, D.S. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Biology**, v. 13, p. 557-563, 2002.

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

KHAN, I.A.; SCHWARTZMAN, J.D.; FONSEKA, S.; KASPER L.H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 24-34, 1997.

KIM, K.; SOLDATI, D.; BOOTHROYD J. C. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. **Science**, v. 262, p. 911-914. 1993.

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

KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A.K.; MOLDAL, T.; BJORKMAN, C.; OLSEN I. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 329–339, 2007.

KRAUTZ, G. M.; GALVÃO, L. M.; CANÇADO, J. R.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; OUAISSI, A.; KRETTLI, A.U. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant

protein to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 2086-2090, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-855, 1970.

LEFEVRE-PETTAZZONI, M.; LE CAM, S.; WALLON, M.; PEYRON, F. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 25, p. 687-693, 2006.

LEI, T.; WANG, H.; LIU, J.; NAN, H.; LIU, Q. ROP18 Is a Key Factor Responsible for Virulence Difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **PLoS One**, v. 9, p. e99744, 2014.

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

LOUIE, K., SVERLOW, K. W., BARR, B. C., ANDERSON, M. L., CONRAD, P. A.. Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 692-699, 1997.

LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 198-201, 2002.

LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SEGUNDO, G. R. S.; 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 and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 84-89, 2006.

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

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.; BJORKMAN, 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, p. 881-887, 2000.

- MILLER, C.M.D.; QUINN, H.E.; WINDSOR, P.A.; ELLIS, J.T. Characterization of first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 620-625, 2002.
- MINEO, T.W.P.; BENEVIDES, L.; SILVA, N.M.; SILVA, J.S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, 2009.
- MINEO, T.W.P.; OLIVEIRA, C.J.F.; GUTIERREZ, F.R.S.; SILVA, J.S. Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 825-833, 2010.
- NAKAAR, V.; NGO, H. M.; AARONSON, E. P.; COPPENS, I.; STEDMAN T. T.; JOINER, K. A. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 2311-2320, 2003.
- NAM, H.; KANG, S.; CHOI, W. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.
- NISHIKAWA, Y., KOUSAKA, Y., TRAGOOLPUA, K., XUAN, X., MAKALA, L., FUJISAKI, K., MIKAMI, T., NAGASAWA, H. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3987-3991, 2001.
- NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 175-184, 2003.
- NORRBY, R.; LYCKE, E. Factors enhancing the host-cell penetration of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Bacteriology**, v. 93, p. 53-58, 1967.
- 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, p.415-419, 2002.
- OSSORIO, P. N.; SCHWARTZMAN, J. D.; BOOTHROYD, J. C. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 50, p. 1-15, 1992.
- PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A. LOOMIS, E.F.; ROWE, J.D.; ANDERSON, M.L.; MARSH, A.E.; CRAY, C.; BARR, B.C. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 467-473, 1998.

PEIXOTO, L.; CHEN, F.; HARB, O.S.; DAVIS, P.H.; BEITING, D.P.; BROWNBACK, C.S.; OULOGUEM, D.; ROOS, D.S. Integrative genomics approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. **Cell Host Microbe**, v.8, p.208–218, 2010.

PENG, H.J.; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S. A review: competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 620-628, 2011.

PÉREZ-ZABALLOS, F.J.; ORTEGA-MORA, L.M.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; NAVARRO LOZANO, V.; GARCÍA-VILLADA, L.; COSTAS, E. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 507-510, 2005.

PITCOVSKY, T.A.; MUCCI, J.; ALVAREZ, P.; LEGUIZAMÓN, M.S.; BURRONE, O.; ALZARI, P.M.; CAMPETELLA, O. Epitope mapping of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several cross-reactive determinants. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1869-1875. 2001.

QUINN, H.E.; MILLER, C.M.D.; RYCE, C.; WINDSOR, P.A.; ELLIS, J.T. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 691-696, 2002.

RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J.C. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. **Traffic**, v. 9, p. 647-56, 2008.

REESE, M.L.; ZEINER, G.M.; SAEIJ, J.P.J.; BOOTHROYD, J.C.; BOYLE, J.P. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.9625–9630, 2011.

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

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

RISCO-CASTILLO, V.; FERNANDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA L.M. Comparative analysis of stress agents in a simplified in vitro system of *Neospora caninum* bradyzoite production. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 466-470, 2004.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; MURUGAN-HERNÁNDEZ, V.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; BLANCO-MURCIA, J.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L.M. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 7-16, 2009.

ROSOWSKI, E.E.; LU, D.; JULIEN, L.; RODDA, L.; GAISER, R.A.; JENSEN, K.D.; SAEIJ, J.P. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *Journal of Experimental Medicine*. v. 208, p.195–212, 2011.

ROY, C.R.; SALCEDO, S.P.; GORVEL, J.P.E. Pathogen-endoplasmatic-reticulum interaction: in through the out door. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 136-147, 2006.

SAEIJ, J.P.; BOYLE, J.P.; COLLIER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L.D.; BROOKE-POWELL, E.T.; AJIOKA, J.W.; BOOTHROYD, J.C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v.314, p.1780–1783, 2006.

SAEIJ, J. P. J.; COLLIER, S.; BOYLE, J.P.; JEROME, M.E.; WHITE, M.W.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v.445, p.324-327, 2007.

SAWADA, M.; PARK, C.H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T.; HARITANI, M. Pathological findings of nude mice inoculated with bovine *Neospora*. **Jounal Veterinary Animal Science**, v.59, p.947–948, 1997.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRODER, 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, 293-305, 2002.

SCHOCK, A.; BUXTON, D.; SPENCE, J.A.; LOW, J.C.; BAIRD, A. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. **Veterinary Records**, v. 147, p. 687-688, 2000.

SENSINI, A.; PASCOLI, S.; MARCHETTI, D.; CASTRONARI, D.; MARANGI, M.; SBARAGLIA, G.; CIMMINO, C.; FAVERO, A.; CASTELLETTO, M.; MOTTOLA, A. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, 25–29, 1996.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITAMI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 36, p. 321-327, 1999.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M.K.; MORDUE, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, p. 253-260, 2010.

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

- 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*). **The Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1212-1216, 2005.
- SINAI, A. P.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 154, p. 95-108, 2001.
- SINGH, S.; ALAM, M.M.; PAL-BHOWMICK, I.; BRZOSTOWSKI, J.A.; CHITNIS C.E. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. e1000746, 2010.
- SMITH, P.G.; PETRENKO, V.A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 391-410, 1997.
- SOHN, C.S.; CHENG, T.T.; DRUMMOND, M.L.; PENG, E.D.; VERMONT, S.J.; XIA, D.; CHENG, S.J.; WASTLING, J.M.; BRADLEY, P.J. Identification of Novel Proteins in *Neospora caninum* Using an Organelle Purification and Monoclonal Antibody Approach. **PLoS ONE**, v.6, e18383, 2011.
- STASKA, L.M.; MCGUIRE, T.C.; DAVIES, C.J.; LEWIN, H.A.; BASZLER T.V. *Neospora caninum*- infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3272-3279, 2003.
- TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 183-191, 2000.
- TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S.J.; TANG, K.; BEATTY, W.L.; HAJJ, H.E.; JEROME, M.; BEHNKE, M.S. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**, v.314, p.1776–1780, 2006.
- THILSTED, J.P. DUBEY, J.P. Neosporosis – like abortion in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 1989.
- 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**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEIS, 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. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.21, p. 558-561, 2005.

VONLAUFEN, N.; MULLER, N.; KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; BOHNE, W.; MCALLISTER, M.M.; BJORKMAN, C.; MULLER, E.; CALDELARI, R.; HEMPHILL, A. Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1253-1265, 2002.

VONLAUFEN, N.; GUETG, N.; NAGULESWARAN, A.; MULLER, N.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; VON BLUMROEDER, D.; ELLIS, J.; HEMPHILL, A. In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 576-583, 2004.

WANG, L.F.; YU, M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. **Currents Drug Targets**, v. 5, p. 1-15. 2004.

WEISS, L.M.; MA, Y.F.; HALONEN, S.; McALLISTER, M.M.; ZHANG, Y.W. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1713-1723, 1999.

WILLIAMS, D. J.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R. F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v. 121, p. 347-358, 2000.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; GUY, F.; MCGARRY, J.W.; MCKAY, J.S.; TREES A.J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 1059-1065, 2003.

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