

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Expressão da quimera constituída pela ROP2 de *Neospora caninum* e a Opr1 de *Pseudomonas aeruginosa* para utilização como insumo imunobiológico no controle da neosporose**

**Matheus Costa da Rosa**

Pelotas, 2015

**Matheus Costa da Rosa**

**Expressão da quimera constituída pela ROP2 de *Neospora caninum* e a Opr1 de *Pseudomonas aeruginosa* para utilização como insumo imunobiológico no controle da neosporose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Coorientador: Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2015

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R788e da Rosa, Matheus Costa

Expressão da quimera constituída pela ROP2 de *Neospora caninum* e a Opr1 de *Pseudomonas aeruginosa* para utilização como insumo imunobiológico no controle da neosporose / Matheus Costa da Rosa. – 53f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Sanidade animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2015. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite ; coorientador Rodrigo Casquero Cunha.

1.Veterinária. 2.Neosporose. 3.Vacina. 4.Opr1. 5.ROP2.  
I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Cunha, Rodrigo Casquero.  
III.Título.

CDD: 636.08955

## Matheus Costa da Rosa

Expressão da quimera constituída pela ROP2 de *Neospora caninum* e a Opr1 de *Pseudomonas aeruginosa* para utilização como insumo imunobiológico no controle da neosporose.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador), Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade de Wisconsin - Madison

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha, Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Doutor Leandro Quintana Nizoli, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Farias Costa de Avila, Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho ao Gilnei Gimenes da Rosa, quem me orienta para vida ensinando-me os verdadeiros valores humanos.**

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, por todos os privilégios e oportunidades que tenho em minha vida.

Deixo aqui um agradecimento a minha família, em especial aos meus pais que sempre me incentivaram a buscar a realização dos meus sonhos.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pela excelente orientação prestada e por fazer jus à profissão de professor pesquisador, estando sempre disposto a ensinar.

Agradeço a Jéssica Lopes Borchardt, por todo amor e companheirismo.

Agradeço o grupo de pesquisa do laboratório de Microbiologia e imunologia (lab 4) e ao grupo de pesquisa do laboratório de Parasitologia e imunologia (lab11) por toda ajuda prestada.

Em especial agradeço ao Me. Alceu Gonçalves dos Santos Jr. e ao Dr. Rodrigo Casquero Cunha, peças fundamentais para execução deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) pelos subsídios necessários.

A todos que indiretamente fizeram parte deste projeto e da minha vida acadêmica.

***“Quem não consegue decidir suas próprias escolhas acabará seguindo o caminho determinado por outras pessoas, em vez de trilhar o próprio futuro”.***

**Seitti Arata**

## Resumo

DA ROSA, Matheus Costa. **Expressão da quimera constituída pela ROP2 de *Neospora caninum* e a Oprl de *Pseudomonas aeruginosa* para utilização como insumo imunobiológico no controle da neosporose**. 2015. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

*Neospora caninum*, agente etiológico da neosporose, é um dos principais responsáveis por abortos em rebanhos bovinos, causando prejuízos econômicos para a agropecuária. Sendo assim, métodos de controle e diagnóstico devem ser aplicados para reduzir a disseminação do patógeno em propriedades rurais. A vacinação dos rebanhos seria uma alternativa importante, no entanto a falta de vacinas eficazes impede a aplicação deste método de controle. Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de se obter vacinas mais eficazes. Vacinas recombinantes utilizando proteínas heterólogas são as mais estudadas. As proteínas presentes nas roptrias (ROPs), devido a sua importância na infecção celular, formação do vacúolo parasitóforo e suas características antigênicas e imunogênicas, são excelentes candidatas a antígeno vacinal. A utilização de lipoproteínas bacterianas tem recebido uma atenção especial como molécula adjuvante carreadora devido às suas propriedades imunomoduladoras. A lipoproteína Oprl de *Pseudomonas aeruginosa* possui a capacidade de modular a resposta imune para uma via Th1. Esta capacidade imunomoduladora quando associada a diferentes antígenos pode modular a resposta mista entre as vias Th1 e Th2. O presente estudo teve como objetivo clonar e expressar a região da *NcROP2*, descrita entre os aminoácidos 191 e 359, fusionada a Oprl, resultando na quimera rROP2/Oprl em *Escherichia coli* e caracterizá-la quanto a sua antigenicidade através da técnica de *Western blot*. A proteína recombinante produzida em *Escherichia coli* Rosetta (DE3) PlysS, apresentou um tamanho esperado de 50kDa. Sendo purificada e caracterizada por anticorpos monoclonais anti-histidina e sua antigenicidade reconhecida por soro de animais naturalmente infectados por *N. caninum*. O reconhecimento da quimera rROP2/Oprl por anticorpos anti-*N. caninum*, revela a existência de determinantes antigênicos comuns entre a proteína recombinante e a forma nativa, sugerindo o seu uso para o desenvolvimento de uma vacina recombinante.

**Palavras-chave:** neosporose; vacina; Oprl; ROP2



## Abstract

DA ROSA, Matheus Costa. **Chimera expression constituted by ROP2 of *Neospora caninum* and Opr1 of *Pseudomonas aeruginosa* for use as immunobiological input in the control of neosporosis.** 2015. 53f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

*Neospora caninum*, etiologic agent of neosporosis, is one of the main responsible for abortion in cattle herds, causing economic losses to Cattle-raising. Thus, control methods and diagnosis should be applied to reduce the spread of the pathogen among farms. Vaccination of cattle would be an important alternative; however the lack of effective vaccines prevents the application of this control method. Several studies have been conducted with the aim of develop more effective vaccines. Vaccines using recombinant heterologous proteins are the most studied. The proteins present in rhoptries (ROPs), due to its importance in cell infection, parasitófago vacuole formation and its antigenic and immunogenic characteristics, became excellent candidates for vaccine antigen. The use of bacterial lipoproteins has received particular attention as an adjuvant carrier molecule due to its immunomodulatory properties. The *Pseudomonas aeruginosa* Opr1 lipoprotein has the ability to modulate the immune response into a Th1 pathway. This immunomodulatory capacity when associated with different antigens can modulate the mixed response between Th1 and Th2 pathways. This study aimed to clone and express the region of *NcROP2* described between amino acids 191 and 359, fused Opr1, producing the chimera rROP2/Opr1 in *Escherichia coli* and to characterize it its antigenicity by *Western blot*. Recombinant protein produced in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, showed an expected size of ~50 kDa. The protein was purified and characterized by anti-histidine monoclonal antibodies and their antigenicity recognized by sera from animals naturally infected by *N. caninum*. The chimera rROP2/Opr1 was recognized by antibodies anti-*N. caninum* reviling common antigenic determinants of the recombinant protein and the its native form, suggesting its use for developing a recombinant vaccine.

**Keywords:** neosporosis; vaccine; Opr1; ROP2

## Lista de figuras

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> .....	15
Figura 2	Visão geral das principais vias de sinalização dos TLR.....	22
Figura 3.A	Extração do DNA de taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> .....	32
Figura 3.B	Amplificação do gene <i>NcROP2</i> através da técnica de PCR.....	32
Figura 4.A	Cultivo das bactérias transformadas em meio LB-agar contendo 30 µg/mL do antibiótico canamicina.....	33
Figura 4.B	PCR dos plasmídeos extraídos das colônias transformadas.....	34
Figura 5	Sequência do gene <i>NcROP2</i> .....	35
Figura 6	SDS-PAGE da expressão e purificação da quimera rROP2/Oprl.....	36
Figura 7	Caracterização da quimera rROP2/Oprl através da técnica de <i>Western Blot</i> utilizando soros MAB anti-6xhis.....	37
Figura 8.A.B	Avaliação da antigenicidade da quimera rROP2/Oprl através de <i>Western Blot</i> .....	38

## Lista de tabelas

Tabela 1	Sequências dos oligo iniciadores e sítios de restrição com suas respectivas enzimas de restrição.....	26
----------	---	----

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Agente infeccioso e ciclo reprodutivo.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Medidas de controle referentes a vacinação.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Imunidade do hospedeiro.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1 Imunidade na gestação.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Proteínas de <i>N. caninum</i> como antígenos vacinais.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Propriedades imunogênicas de lipoproteínas bacterianas.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Subunidade Oprl como adjuvante.....</b>	<b>23</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>25</b>
<b>3 Material e Métodos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Construção dos iniciadores.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Extração de DNA de <i>N. caninum</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 PCR e clonagem do inserto.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Condições de cultivo para <i>E. coli</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 Transformação das cepas de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Seleção e confirmação dos clones recombinantes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7 Sequenciamento dos clones recombinantes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8 Expressão da lipoproteína recombinante rROP2/Oprl.....</b>	<b>29</b>
<b>3.9 Preparação das frações de membrana externa.....</b>	<b>29</b>
<b>3.10 Extração do Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).....</b>	<b>29</b>
<b>3.11 Purificação por cromatografia de afinidade.....</b>	<b>30</b>
<b>3.12 SDS-PAGE da expressão e purificação da quimera rROP2/Oprl.....</b>	<b>30</b>
<b>3.13 Caracterização da rROP2/Oprl por <i>Western Blot</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>4 Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Extração do DNA e amplificação do fragmento ROP2.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Seleção dos clones recombinantes.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Sequenciamento de DNA dos clones recombinantes.....</b>	<b>34</b>

<b>4.4 Expressão e purificação da rROP2/Oprl.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Caracterização da rROP2/Oprl por <i>Western Blot</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>5 Discussão.....</b>	<b>39</b>
<b>6 Conclusão Geral.....</b>	<b>43</b>
<b>Referências.....</b>	<b>44</b>

## 1 Introdução

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil mantém o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com um plantel de aproximadamente de 200 milhões de animais. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto do total de carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (MAPA, 2014).

Apesar dos dados satisfatórios, o Brasil ainda possui perdas econômicas relacionadas a doenças infecto contagiosas que atingem os rebanhos que prejudicam o ganho de peso, produção de leite, índices reprodutivos, e até mesmo ocasionar a perda dos animais. Dentre as doenças que afetam os bovinos, a neosporose, parasitose causada pelo protozoário *Neospora caninum*, é responsável por grandes perdas econômicas, (DUBEY et al., 2007). Além dos prejuízos causados pelos abortos, a neosporose gera grandes prejuízos na produção de leite (HERNANDEZ et al., 2001) e perdas de peso e qualidade de carne em bovinos de corte (REICHEL et al., 2013).

A soropositividade relacionada com as taxas de aborto em bovinos, no Rio Grande do Sul, demonstra que bovinos soropositivos apresentam de três (3) a sete (7) vezes mais chances de abortarem do que bovinos soronegativos (CORBELLINI et al., 2002; HEIN et al., 2012).

Existem algumas medidas preventivas que podem ser adotadas para auxiliar no controle da neosporose. No entanto, a vacinação ainda é o meio profilático mais racional existente no controle de doenças. As vacinas contra neosporose podem ser vivas, (com taquizoítos naturalmente, quimicamente ou geneticamente atenuados) (MONNEY et al., 2011; HECKER et al., 2012), vacinas de DNA (MONNEY et al., 2011) ou vacinas de subunidades (DEBACHE et al., 2011).

Apesar de muitas pesquisas realizadas nessa área, ainda não há vacinas contra neosporose eficazes ao ponto de controlar a carga

parasitária, evitando os abortos e a transmissão vertical, disponível no comercialmente.

A única vacina comercial já disponível contra neosporose é a Bovilis Neoguard<sup>®</sup>, composta por taquizoítos inativados. Apesar de reduzir as taxas de aborto em níveis acima de 50%, foi retirada do mercado por apresentar possível relação com o aumento no risco de morte embrionária precoce (MONNEY; HEMPHILL, 2014; WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012). Sendo assim, não há vacinas eficazes disponíveis comercialmente contra neosporose, o que demonstra a necessidade de se buscar novas estratégias na produção de vacinas para o controle desta parasitose.

### 1.1 Agente infeccioso e ciclo reprodutivo

*Neospora caninum*, é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, primeiramente identificado no ano de 1984 em doenças neuromusculares em cães (BJERKAS et al., 1984), e posteriormente descrito como uma nova espécie por DUBEY et al. (1988). *Neospora caninum* possui adaptações morfológicas relacionadas ao processo de infecção das células hospedeiras, como o complexo apical, característica que dá nome ao filo, o qual é composto por uma série de filamentos protéicos e organelas secretórias (COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012). O parasito apresenta um ciclo de vida heteroxeno, com hospedeiros intermediários como diversos mamíferos domésticos ou silvestres e os canídeos como hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2007; DUBEY et al., 2011).

Durante seu ciclo, o protozoário pode apresentar-se de três formas infectantes: (1) **taquizoítos**, que apresentam forma ovóide-lunares, sendo esta responsável pela rápida multiplicação nos tecidos do hospedeiro; (2) **bradizoítos**, forma de multiplicação lenta nos tecidos, presentes em cistos teciduais; e (3) **oocistos** esporulados contendo esporozoítos, cada oocisto apresenta dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos em seu interior (LINDSAY et al., 1996; DUBEY, 1999).

O ciclo biológico de *N. caninum* foi primeiramente descrito quando oocistos foram encontrados nas fezes de cães após estes terem ingerido tecidos de camundongos infectados experimentalmente, caracterizando os cães como hospedeiros definitivos (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999).

A Figura 1 demonstra uma representação esquemática do ciclo de vida heteroxeno de *N. caninum*. Existem dois modos distintos de reprodução no parasito (MCALLISTER et al., 1998): reprodução sexuada, que ocorre apenas em canídeos (hospedeiro definitivo), tais como o cão (*Canis familiaris* Lupus), coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), lobo cinzento (*Canis Lupus*) (DUBEY et al., 2011) e dingo (*Canis Lupus dingo*) (KING et al., 2010); e reprodução assexuada, que ocorre nos hospedeiros intermediários, tais como os bovinos.

Oocistos não esporulados são eliminados junto com as fezes de canídeos infectados (REICHEL et al., 2007), contaminando o ambiente. Estes são muito resistentes às condições ambientais, permitindo que os esporozoítos sobrevivam em um ambiente externo por longos períodos de tempo (REICHEL et al., 2014). Hospedeiros intermediários, como bovinos, ingerem oocistos esporulados que se encontram contaminando o ambiente, por meio de pastagens e fontes de água. Após a ingestão dos oocistos, os esporozoítos são liberados no intestino do hospedeiro, que, por sua vez, invadem a parede do intestino e se transformam em taquizoítos, (McALLISTER et al., 1998, DUBEY, 1999). Os taquizoítos que residem em compartimentos intracelulares únicos, chamados vacúolos parasitóforos, replicam-se rapidamente por reprodução assexuada (DUBEY et al., 1990). Os taquizoítos podem invadir e infectar diferentes tipos de células do hospedeiro incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, musculares e hepatócitos (BARR et al., 1993; DUBEY et al., 2002).

O ciclo de vida torna-se completo quando os cistos teciduais são ingeridos por uma espécie canina onde ocorre a reprodução sexuada e a eliminação dos oocistos não esporulados para o meio ambiente. Após os oocistos contendo esporozoítos são formados e o ciclo de vida começa novamente, (MCALLISTER et al., 1998).

A transmissão vertical pode ocorrer de duas formas: **transplacentária exógena**, em que a fêmea é infectada durante a gestação após ingerir oocistos, que se diferenciam em esporozoítos e então em taquizoítos, os quais se difundem para o útero via circulação, utilizando células do sistema mononuclear fagocítico, posteriormente atravessando a placenta e por fim acabam infectando o feto; e a **transplacentária endógena**, em que as fêmeas anteriormente a prenhez já estavam infectadas, ocorrendo a reativação de bradizoítos (cistos teciduais de *N. caninum*



que apresentam reprodução lenta) em taquizoítos, que se disseminam através da placenta até o feto (WILLIAMS et al., 2009; REICHEL et al., 2014).

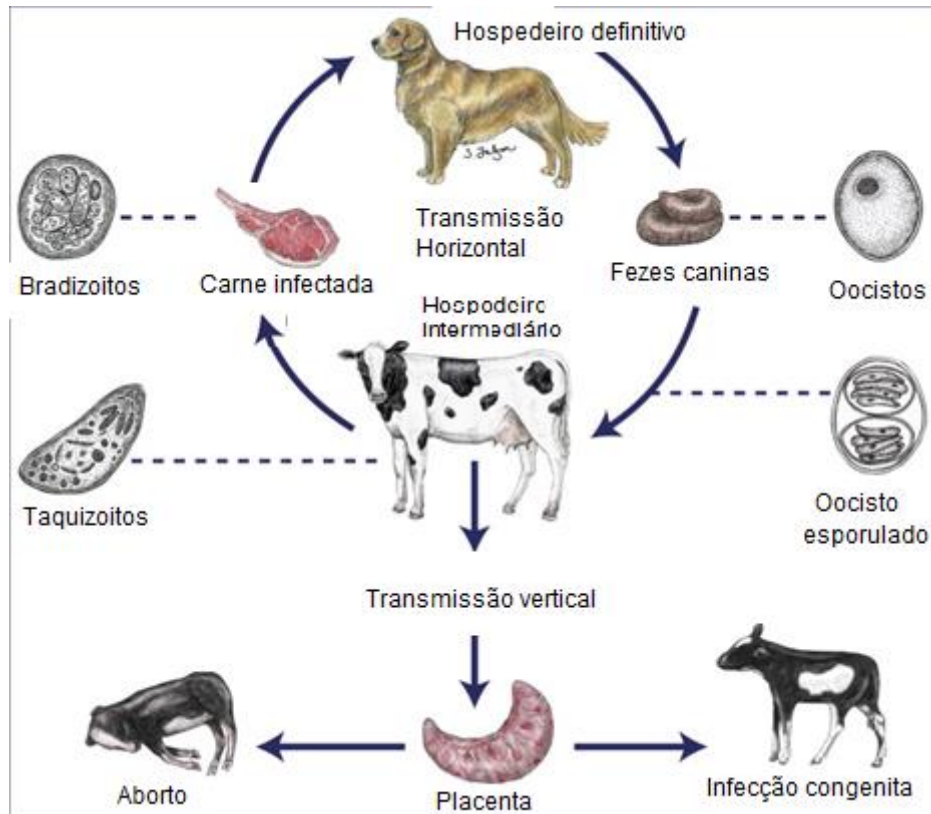


Figura 1. Adaptado de GOODSWEN, S. J. et al., 2013. Ciclo de vida heteroxeno de *Neospora caninum*.

## 1.2 Medidas de controle referentes a vacinação

Existem diversas medidas profiláticas que podem auxiliar no controle da neosporose, dentre as quais se destacam: os cães não devem ser alimentados com carne crua ou vísceras de hospedeiros intermediários; deve-se manter o controle populacional de cães dentro e ao redor das fazendas para evitar a contaminação do ambiente (McALLISTER et al., 1998); bovinos soropositivos precisam ser retirados da reprodução e encaminhados para o abate, com objetivo impedir a transmissão vertical (WILLIAMS; TREES, 2006).

Para evitar perdas de animais com valor zootécnico elevado é possível adotar técnicas reprodutivas, como a transferência de embrião, onde são coletados embriões de uma fêmea positiva para neosporose, fecundá-los e implantá-los em

fêmeas soronegativas. Dessa maneira é possível manter as fêmeas positiva no rebanho, e produzir uma progênie livre de *N. caninum* (BAILLARGEON et al., 2001; LANDAMNN et al., 2002; MOSKWA et al., 2008).

No entanto, a medida profilática mais racional é a imunoprevenção através das vacinações. Contudo, não há vacinas disponíveis no comércio e devido a isso diferentes estudos vêm sendo realizados com o intuito de se obter uma vacina mais eficaz, com uma resposta imune protetora e duradoura contra *N. caninum* (HECKER et al., 2012, WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012, MONNEY; HEMPHILL, 2014), capaz de estimular de forma correta um balanço entre as vias Th1 e Th2, (MONNEY, 2014).

Uma vacina considerada eficiente é dependente de alguns requisitos, tais como, (1) prevenir a proliferação de taquizoítos e sua disseminação no rebanho durante a gestação, (2) prevenir e reduzir a excreção de oocistos pelos hospedeiros definitivos (canídeos) e (3) impedir a formação de cistos teciduais em hospedeiros intermediários, (MONNEY et al., 2011). Apesar da dificuldade de se obter uma vacina com esta eficácia, autores descrevem que isto pode ser possível se a vacina for capaz de estimular respostas imunes celulares protetoras, bem como respostas mediadas por anticorpos (EPERON et al., 1999, HEMPHILL et al., 2006).

Diferentes vacinas contra neosporose, com diferentes antígenos e adjuvantes, já foram testadas, tanto em modelos experimentais quanto em bovinos, tais como: vacinas inativadas (HECKER et al., 2012, WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012), vivas atenuadas (HECKER et al., 2012), de subunidade (HECKER et al., 2012, MONNEY; HEMPHILL, 2014), de DNA, em vetores virais e bacterianos (HECKER et al., 2012), e com diferentes adjuvantes (INNES et al., 2002, MONNEY; DEBACHE; HEMPHILL, 2011). No entanto, nenhuma delas atingiu resultados satisfatórios ao ponto de se tornarem vacinas eficazes e disponíveis comercialmente.

A vacina comercial Bovilis Neoguard™ composta por taquizoítos inativados (BARLING et al., 2003) exibiu proteção moderada em ensaios de campo, com a redução das taxas de aborto em até 50% (ROMERO et al., 2004). No entanto, um recente estudo revela grandes diferenças de eficácias e sugeriram que esta vacina pode aumentar o risco de morte precoce embrionária, (WESTON et al. 2011). Sendo assim, a vacina foi retirada do mercado. Até o momento, há evidências que sugerem que a abordagem mais promissora para a prevenção da infecção por *N.a caninum* é

através de uma vacina viva, atenuada, da cepa NC-Nowra (WILLIAMS et al., 2007). Um estudo recente confirmou a eficácia da vacina na redução da transmissão vertical após o desafio com um isolado virulento (WEBER et al., 2013). Segundo Monney et al., (2014) a vacinação mostrou-se segura, embora tenha sido observada uma redução da taxa de prenhez após a inseminação artificial em grupos de vacas vacinadas em comparação com controles não-vacinadas.

### **1.3 Imunidade do hospedeiro**

A primeira linha de defesa contra agentes infecciosos é mediada pela resposta imune inata, através de células apresentadoras de antígeno e por células *Natural Killer* (NK) (KLEVAR et al., 2007). As Células NK de bovinos possuem a capacidade de lisar os fibroblastos infectados por *N. caninum* e sintetizar interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fornecendo um ambiente de citocinas necessárias para a ativação do sistema imune adaptativo por meio de uma resposta pró-inflamatória (KLEVAR et al., 2007). De fato, estudos demonstram que bovinos infectados iniciam uma resposta de tipo Th1 associada com a ativação da via Th2 e a expressão de IFN- $\gamma$  (WILLIAMS et al., 2000, MALEY et al., 2006 e ROSBOTTOM et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a produção de IFN- $\gamma$  durante o terço médio e final da prenhez pode ser eficaz na prevenção de aborto em bovinos naturalmente infectados (ALMERIA et al., 2009 e LOPEZ-GATIUS et al., 2007).

A morte das células infectadas através da resposta imune promovida pela atividade de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a inibição da multiplicação de parasitos através das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e o bloqueio da infecção do parasito por meio de anticorpos são os principais eventos imunológicos capazes de controlar a infecção e de evitar a conversão de taquizoítos para bradizoítos, (INNES, 2007).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados por macrófagos infectados também expressam citocina 17 (IL-17), que pode atuar em conjunto com interferon gama IFN- $\gamma$ , como segunda principal citocina pró-inflamatória (FLYNN E MARSHALL, 2011). Estas citocinas são, no entanto, altamente ativas e, em parte, responsáveis pelos danos á placenta, e a sua expressão tem sido considerada como uma possível causa de aborto no início da gestação (MALEY et al., 2006; QUINN et al., 2002; ROSBOTTOM et al., 2008).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias pode ser modulada por citocina 10 (IL-10), citocina 4 (IL-4) e fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Estas citocinas são altamente expressas na interface materno-fetal para evitar a rejeição fetal, no entanto, permitem a proliferação e a transmissão vertical do parasito (ENTRICAN, 2002; INNES et al., 2000; INNES, 2007). De fato, a ativação de ambas as vias Th1 e Th2 são necessárias para manter a gestação evitando o aborto e a infecção congênita do *N. caninum* (ALMERIA et al., 2003 e ROSBOTTOM et al., 2011).

### 1.3.1 Imunidade na gestação

A transmissão transplacentária é a principal fonte de infecção por *N. caninum* em bovinos (INNES et al. 2002). O autor também relata que a carga parasitária durante a gestação, a eficiência da resposta imune materna e a capacidade do feto de montar uma resposta imune eficaz são fatores que influenciam a infecção congênita durante a gestação (INNES et al. 2002).

A resposta imunológica via Th1, baseada na resposta imune celular, é considerada eficaz, por atuar reduzindo a multiplicação do protozoário no hospedeiro (ALMERIA et al., 2003). A produção de citocinas, tais como IL-12 e IFN- $\gamma$  e a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, são características da infecção por *N. caninum* (KHAN et al., 1997, WILLIAMS et al., 2000). Contudo, a produção de elevados níveis de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico, decorrentes da infecção, no início da gestação podem ocasionar rejeição ou aborto do feto (INNES et al., 2002; QUINN et al., 2002; ALMERIA et al., 2003). Na infecção, *N. caninum* invade as células do útero gestante, multiplica-se e causa destruição local dos tecidos materno e fetal, resultando em uma resposta inflamatória na interface materno-fetal. Esta lesão acarreta na infecção do feto e conseqüentemente lesão em diversos órgãos do mesmo (BUXTON, 2002).

A resposta imune do feto também desempenha um papel crucial para o resultado da infecção. Resposta de anticorpos do feto específicos contra *N. caninum* foi encontrada a partir das 14 semanas de gestação (BARTLEY et al., 2012). Observou-se que a infecção no início da gestação foi associada à disseminação do parasito e às lesões necróticas dos tecidos fetais supostamente ocasionadas por *N. caninum*, mas não foram detectadas reações inflamatórias (GIBNEY et al., 2008 e MACALDOWIE et al., 2004), enquanto que a infecção no terço médio da gestação,

resulta em menor número de lesões e redução da disseminação do parasito (GIBNEY et al., 2008 e MALEY et al., 2003).

A partir dos 150 dias de gestação ocorre aumento na produção de progesterona, a qual induz a modulação para uma resposta Th2, havendo a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10. Estas, no entanto, garantem o desenvolvimento do feto, porém não são adequadas para o controle da infecção parasitária, levando, por conseguinte, a uma grande carga parasitária na genitora, aumentando os riscos da transmissão congênita (QUINN et al., 2002).

Portanto, em infecções que ocorrem no primeiro trimestre de gestação, quando os níveis hormonais de progesterona são baixos, os riscos de aborto são relativamente altos, entretanto a transmissão do parasito para o feto é baixa. Caso a infecção ocorra durante o terceiro trimestre de gestação, quando há altos níveis de progesterona, inicia-se a modulação da resposta imune para uma via Th2, torna os riscos de aborto mais baixos, entretanto, o risco para a transmissão congênita torna-se mais alto (QUINN et al., 2002).

#### **1.4 Proteínas de *N. caninum* como antígenos vacinais**

Os adventos da biologia molecular permitiram o estudo de diferentes tipos de proteínas presentes em *N. caninum*, de forma isolada ou em associações, determinando a importância que cada uma desempenha na interação parasito/hospedeiro durante a infecção. Muitos antígenos foram isolados e avaliados quanto a sua especificidade, antigenicidade e imunogenicidade para utilização em diagnóstico e vacinas (MONNEY & HEMPHILL, 2014).

Existem quatro principais classes de proteínas que estão sendo estudadas quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade. Sendo estas: antígenos imunodominantes de superfície de *N. caninum*, especialmente *NcSAG1* e *NcSRS2* (HALDORSON et al., 2005); proteínas presentes nas roptrias, *NcROP2*, que são organelas secretoras localizadas no complexo apical responsáveis pela infecção do parasito na célula hospedeira (DUBREMETZ, 2007; MARTIN et al., 2007); proteínas presentes nos micronemas, organelas que possuem propriedades semelhantes às roptrias, *NcMIC1* (ALAEDDINE et al., 2005), *NcMIC3* (CANNAS et al., 2003), *NcMIC4* (SRINIVASAN et al., 2007); e proteínas de grânulos densos, organelas secretórias envolvidas no processo de invasão e captação de nutrientes,

destacando-se a *NcGRA7* (JENKINS et al., 2004). Quanto às roptrias, estas são organelas secretoras, presentes em grande número, localizadas no complexo apical que atuam na junção com a célula do hospedeiro, sendo responsáveis pela penetração e formação do vacúolo parasitóforo nas células infectadas (MARTIN et al., 2007).

Este complexo de proteínas é responsável por localizar pontos estratégicos para formação e ancoragem estável da “junção motora” durante a invasão da célula hospedeira, que ocorre a partir da interação com componentes do citoesqueleto da célula e, ainda, impedir a destruição lisossomal do vacúolo parasitóforo (BECK et al., 2014).

A primeira descrição da utilização da proteína recombinante *NcROP2* como vacina foi feita por Debache et al. (2008) em estudo com modelos murinos, onde obtiveram proteção contra a infecção cerebral. Este estudo observou que a proteína r*NcROP2* em associações com diferentes adjuvantes produziu resultados significativos quanto a resposta imune, sendo eficazes na proteção, indicando principalmente a modulação para uma resposta celular, e baixos níveis de uma resposta humoral.

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa avaliou a proteína recombinante *NcROP2* em associação com proteínas presentes nas micronemas (MIC1 e MIC3) e observaram que em grupos vacinados com r*NcROP2* 50% dos animais (camundongos) sobreviveram ao desafio e, quando associada com MIC1 e MIC3, apenas 35% sobreviveram (DEBACHE et al., 2009).

Monney et al. (2011), com o auxílio de bioinformática, identificaram sequências mais imunogênicas da proteína *NcROP2* (região entre os aminoácidos 191 ao 359). O mesmo estudo foi realizado com as proteínas de MIC1 e MIC3, sendo as regiões caracterizadas nas três proteínas, fusionadas e sua imunogenicidade testada em modelos murinos. A quimera foi reconhecida como antigênica e gerou 100% de proteção nos camundongos desafiados.

Em continuação a esses estudos, Monney et al. (2011) buscaram avaliar o padrão de resposta imune que os antígenos quiméricos proporcionaram em modelos murinos desafiados durante a gestação. Os animais foram vacinados com o antígeno quimérico contendo parte da proteína recombinante *NcROP2* (r*NcMIC3-1-R*), o que produziu resultados diferentes em grupo de gestantes e não gestantes

(MONNEY et al., 2011). Enquanto a quimera (rNcMIC3-1-R) apresentou elevado nível de proteção associada a uma resposta tipo Th1/Th2 mista em camundongos não prenhes, o mesmo nível de proteção não foi observada para fêmeas prenhes, a qual foi associada a baixos níveis de IgG total e citocinas. Monney et al. (2011) sugerem que a imunomodulação que ocorre durante a gestação é crucial para a avaliação de vacinas contra a neosporose.

Pelo fato da *NcROP2* possuir um papel fundamental na infecção das células hospedeiras e na formação de vacúolo parasitóforo e possuir características antigênicas e imunogênicas, como demonstrado por diferentes autores, sugere-se o seu potencial na utilização como antígeno vacinal contra neosporose.

### **1.5 Propriedades imunogênicas de lipoproteínas bacterianas**

A utilização de lipoproteínas bacterianas tem recebido uma atenção especial nos últimos tempos devido às suas propriedades imunomoduladoras, particularmente na capacidade que estas biomoléculas apresentam de ativar macrófagos e células dendríticas contribuindo para o perfil da resposta imune do hospedeiro (REVETS et al., 2005; BASTOS et al., 2014).

A exploração da ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) para imunomodulação é, atualmente, uma estratégia promissora para desenvolver novas vacinas contra doenças infecciosas (COFFMAN et al., 2010, ISHII E AKIRA, 2007, VAN DUIN et al., 2006 e WARSHAKOON et al., 2009). Esta imunomodulação ocorre devido ao fato das células envolvidas na resposta imune expressarem uma variedade de PRRs, sendo os mais estudados os Toll-like-receptors (TLR), que reconhecem e se ligam a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) desencadeando uma cascata de respostas que iniciam o processo inflamatório, Fig. 2; (VAN DUIN, 2006).

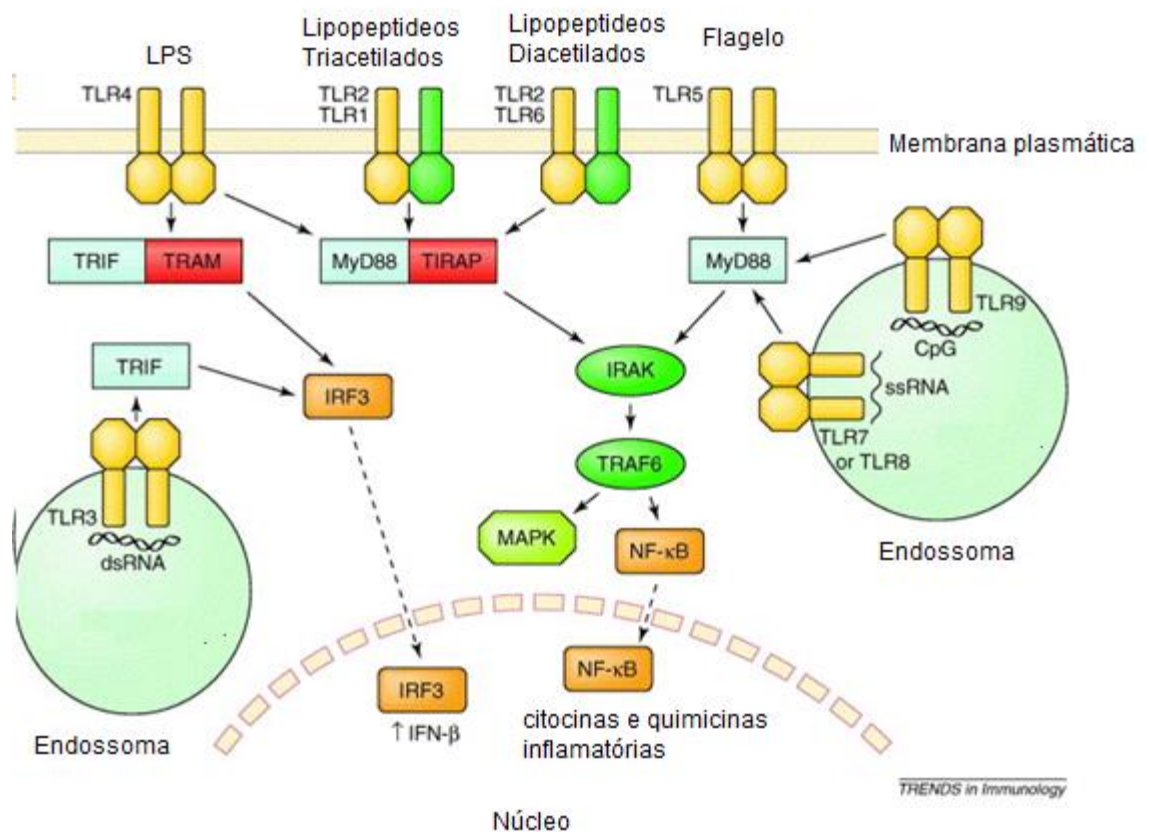


Figura 2. Adaptado de David Van Duin, 2006. Visão geral das principais vias de sinalização TLR.

A possibilidade de anexar, covalentemente, agonistas lipoprotéicos aos antígenos e estimular o reconhecimento dos mesmos pelos receptores TLR2 oferecem propriedades interessantes para o desenvolvimento de vacinas, (Bastos & Leitão, 2014). O estudo realizado por Zhu et al. (2004), em modelos murinos, demonstra que as estruturas nativas das lipoproteínas bacterianas promovem a internalização e a maturação de células dendríticas através de TLR2, desencadeando imunidade protetora dependente da via Th1. Sendo assim, as lipoproteínas bacterianas apresentam propriedades adjuvantes intrínsecas, que são atribuídas aos seus componentes lipídicos (AGUILAR & RODRÍGUEZ 2007; AKIRA, 2003).

Esta estratégia apresenta vantagens em relação ao uso de adjuvantes tradicionais, como os sais de alumínio, além do fato destas vacinas, baseadas em lipopeptídeos, poderem ser administradas por via oral ou nasal, estimulando a imunidade de mucosas, e promovendo uma resposta imune celular específica (MOYLE & TOTH, 2008).



## 1.6 Subunidade Oprl como adjuvante

A lipoproteína Oprl é uma das proteínas mais abundantes da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* e foi descrita pela primeira vez por Myzuno & Kageyama (1978). A Oprl é uma lipoproteína ancorada na membrana externa e que apresenta um peso molecular de ~8 kDa, sendo codificada pelo gene *oprl*. Seu RNA mensageiro codifica para uma proteína precursora de 83 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal composto por 19 aminoácidos. Após a sua transcrição a proteína precursora sofre um processo de maturação (De Vos, 1998) que inclui, primeiramente, uma modificação do resíduo de cisteína pela ligação de uma molécula de glicerol e, posteriormente, a remoção do peptídeo sinal pela enzima peptidase sinal II. É assim formada uma apolipoproteína que é subsequentemente modificada por ligação de um resíduo lipídico ao seu resíduo gliceril-cisteína-N-terminal, dando origem a uma lipoproteína madura (De Vos, 1998). A lipoproteína processada apresenta um peso molecular de aproximadamente 14 kDa, sendo de caráter majoritariamente hidrofóbico (CORNELIS et al., 1989, DE VOS et al., 1998).

A Oprl possui a capacidade de modular a resposta imune para uma via com tendência a respostas Th1, possuindo potencial ação adjuvante em vacinas contra doenças que exijam principalmente a imunidade celular e para infecções que exijam uma combinação da imunidade celular e humoral (Th1 e Th2) (PIECADE et al., 2003). Esta lipoproteína é reconhecida pelo sistema imune inato como um padrão molecular associado à patógenos (PAMPs), ativando mecanismos efetores antimicrobianos pela ativação de TLR2 e TLR4 (REVETS et al., 2005). Isto resulta numa resposta prioritariamente do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (GARTNER et al., 2007).

Com base nisto, diferentes protocolos têm utilizado a Oprl como proteína de fusão, uma vez que esta lipoproteína possui a capacidade de estimular TLRs, mais precisamente TLR-2 e TLR-4, modulando a resposta imune.

Resultados têm demonstrado esta capacidade imunomoduladora que a Oprl apresenta. Um estudo utilizando *Leishmania major*, no qual foi utilizado um produto de fusão da lipoproteína Oprl com uma glicoproteína deste protozoário, a gp63, demonstrou a modulação de uma resposta Th1 dependente de TNF- $\alpha$ , conferindo uma resposta protetora (COTE-SIERRA et al., 2002). Outro estudo realizado recentemente por Bastos et al. (2014 a.) demonstrou que a Oprl, utilizada como

proteína de fusão, obteve uma resposta humoral, com indução de diversos isotipos de IgGs específicas, mas também com a produção de IgE. Este perfil também indica que a modulação da resposta obtida apenas pela estimulação Opr1 não é caracterizada por uma polarização típico das vias Th1, Th2 ou Th17, mas sim um perfil com propriedades mistas.

## 2 Objetivos

- Clonar e expressar a região da *NcROP2*, descrita entre os aminoácidos (191 a 359), fusionando-a a lipoproteína *OprI*, produzindo a quimera *rROP2/OprI* em *Escherichia coli*.
- Caracterizar a quimera *rROP2/OprI* quanto a sua antigenicidade pela técnica de *Western blot*.

### 3 Material e Métodos

A construção e caracterização da quimera rROP2/OprI foi realizada no Laboratório de Bacteriologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os protocolos de clonagem foram organizados de acordo com Sambrook & Russell (2001), quando necessário com modificações.

#### 3.1 Construção dos iniciadores

Os iniciadores foram construídos, utilizando as mesmas porções antigênicas descritas por Monney et al., (2011), entretanto, para fusão com a subunidade OprI de *P. aeruginosa*, foram adicionados sítios de restrição enzimática para direcionamento da clonagem (Tab.1).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores e sítios de restrição com suas respectivas enzimas de restrição.

Nome	Sequência nucleotídica e sítios de restrição.	Enzimas de restrição
FOR-RL	3'AC <b>GAATTC</b> CCTGCGACCAGGCCA-5'	<i>EcoRI</i>
REV-RL	3'- CTC <b>ATCCG</b> GCGTGTTAGTCGGG-5'	<i>XhoI</i>

A síntese foi realizada pela empresa SINAPSE Biotecnologia, na concentração de 0,025µmol. A concentração de 100pmol foi utilizada como solução estoque. O mapa da construção da quimera rROP2/OprI em vetor Polt7 a partir dos iniciadores descritos acima, foi desenhado em software Vector NTI Advance™ (Invitrogen).

#### 3.2 Extração de DNA de *N. caninum*

Amostras de taquizoítos de *N. caninum* (NC-1) foram cedidas gentilmente pela professora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Flores, da Universidade Federal de Santa Maria

(UFSM). As mesmas foram submetidas à extração de DNA pelo método de lise mecânica com pérolas de vidro descrito por Sambrook e Russell (2001).

### 3.3 PCR e clonagem do inserto

As concentrações dos reagentes para a PCR, para uma reação de 25µL, foram: 2,5µL de tampão 10x, 0,5µL de dNTP 100mM, 0,01pmol de cada iniciador, 0,5µL (2 U) de Taq<sup>TM</sup> DNA polimerase (Invitrogen), 1µL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 18µL de água Milli-Q e 40 ng de DNA molde. O produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e foto documentado. Posteriormente, foi purificado utilizando kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). O produto de PCR apresentou tamanho esperado aproximado de 522pb. Na sequência, o produto da PCR e o vetor de expressão pOLT7, contendo o gene *OprI* (Polt7-OprI), foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (Biolabs®). A reação foi realizada a 37 °C durante 4h. A digestão foi purificada com NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, analisada em eletroforese em gel de agarose 1%. A ligação entre inserto e vetor foi estabelecida de acordo com protocolo da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), com proporção de 1:3 de vetor e inserto, incubada a 22 °C por 1h. Após a recombinação, a NcROP2 foi expressa fusionada à *OprI*.

### 3.4 Condições de cultivo para *E. coli*

As cepas utilizadas foram *E. coli* Rosetta (DE3) PlysS e *E. coli* TOP10f, ambas em estoque na bacterioteca do laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), UFPel, comercialmente adquiridas da Invitrogen<sup>TM</sup>. As cepas foram cultivadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) sob agitação a 200rpm ou em meio LB acrescido de 1,5 % de ágar-ágar, quando transformadas, o meio foi suplementado com 30 µg/mL de canamicina e quando se utiliza a cepa *E. coli* Rosetta (DE3) PlysS, além de canamicina, deve-se adicionar 34 µg/mL de cloranfenicol.

### 3.5 Transformação das cepas de *E. coli*

A partir de um cultivo em LB ágar incubado durante a noite a 37 °C, foram coletadas duas colônias isoladas de *E. coli* TOP10f, homogeneizadas com 100µL de solução de CaCl<sub>2</sub> 100mM estéril e 3µL do produto da ligação em microtubos de 1,5mL. Após homogeneização, o material foi incubado em banho de gelo por 15min, seguido de choque térmico a 42 °C por 1min, retornando ao gelo por mais 3min. Posterior ao choque térmico, o mesmo foi incubado em agitador orbital a 37 °C, 150rpm, durante 1h para restabelecimentos de suas condições celulares. As células transformadas foram cultivadas em placa com LB sólido suplementado com 30 µg/mL de canamicina a 37 °C por 24h.

### 3.6 Seleção e confirmação dos clones recombinantes

Colônias bacterianas que cresceram isoladas na placa foram submetidas a um processo de triagem por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio, pelo método de seleção (SAMBROOK E RUSSELL, 2001). Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem apresentaram na eletroforese, em gel de agarose 1%, tamanho superior quando comparados ao plasmídeo sem inserto.

Os clones recombinantes foram cultivados por 24h em meio LB suplementado com 30 µg/mL de canamicina. Neste cultivo, realizou-se uma extração do DNA plasmídeo pelo kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Os plasmídeos extraídos foram confirmados por restrição enzimática, utilizando as endonucleases *EcoRI* e *XhoI*, para separar o vetor do inserto. Os clones recombinantes foram selecionados e confirmados por PCR das colônias transformadas. A PCR foi realizada com as mesmas condições e ciclagens conforme descrito na seção 3.2.#

### 3.7 Sequenciamento dos clones recombinantes

Plasmídeos selecionados como possíveis recombinantes foram submetidos a sequenciamento pela empresa Ludwig Biotec (ACTGene análises moleculares) utilizando o sequenciador ABIprism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **3.8 Expressão da lipoproteína recombinante rROP2/OprI**

A cepa de expressão *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) foi utilizada para a produção da lipoproteína recombinante. Células transformadas foram cultivadas durante a noite a 37 °C a 200 rpm em meio LB suplementado com 30µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol. As culturas foram então diluídas 1:20 (v/v) em meio LB suplementado com antibióticos e incubadas a 37 °C, à 200 rpm, até atingir a densidade óptica de 0,8-1,0 a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ). A expressão da proteína foi realizada pela indução com 1 mM de isopropil-β-d-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubação durante 3 horas a 37 °C, à 200 rpm. As células foram colhidas por centrifugação a 5.500 x g durante 20 minutos a 4 °C e armazenadas a -20 °C.

### **3.9 Preparação das frações de membrana externa**

Os sedimentos celulares a partir de 1L de culturas foram diluídos em 35 mL de tampão de lise (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de glucose e 10 mM de EDTA), com 2,5 mg/ml de lisozima (BASTOS et al., 2012). Após 30 min de incubação sobre gelo e solubilização com um volume igual de 2% (v/v) de sarcosil, o lisado celular foi ultrasonicado e centrifugado a 40.000 x g durante 4h a 4 °C para se obter o sedimento de membrana externa, insolúvel em sarcosil.

### **3.10 Extração do Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)**

O sedimento obtido foi diluído em 10mL de tampão salina fosfato (PBS), e aquecido a 65 °C. Igual volume de Fenol pH 7,4 (Sigma) também foi pré-aquecido a 65 °C por 15 min. Após aquecidas, as amostras foram misturadas e agitadas intermitentemente durante 15 minutos, seguido de centrifugação a 13.400 x g, 4 °C, durante 15 minutos.

A fase superior aquosa contendo o LPS foi descartada. A fase fenólica foi adicionada de 5 mL de água destilada pré aquecida a 65 °C e submetida a centrifugação, nas mesmas condições anteriores, por duas vezes. A fase fenólica final foi transferida para novos tubos e 5 volumes de acetato de amônia 0,1 M em

metanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram adicionados. Após a homogeneização, o produto foi centrifugado novamente a  $13.400 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Os sedimentos foram lavados uma vez com acetato de amônia 0,1 M em metanol, uma vez com etanol a 100% e uma vez com acetona a 0,1 M, todos pré-refrigerados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e submetido a centrifugação ( $13.400 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 15 min). Após, o produto sedimentado foi seco em cabine de fluxo laminar.

### 3.11 Purificação por cromatografia de afinidade

O sedimento de membrana externa tratada com fenol foi diluído em 10 mL de tampão de ligação (20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5M de NaCl, 20mM de imidazol, 6M de cloridrato de guanidina, 2% (v/v) de Triton X-100, 20mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e inibidor de protease (PMSF), pH 7,4 isento de EDTA), à temperatura ambiente, durante a noite, em agitação. As amostras foram centrifugadas a  $20.000 \times g$  durante 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, o pH ajustado para 7,4, os sobrenadantes foram incubados com 750  $\mu\text{L}$  de resina de  $\text{Ni}^+$  NTA Agarose (Invitrogen), durante 2 h à temperatura ambiente. Depois de transferir para uma coluna PD10 (GE Healthcare), as resinas foram lavadas com 20 volumes do primeiro tampão de lavagem, (tampão 1 - 20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl, 20 mM de imidazol, 8 M ureia e 2% de Triton X-100, pH 7,4). O detergente foi removido das colunas com 20 volumes do segundo tampão de lavagem (tampão 2 - 20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl e 8 M de ureia, pH 7,4) e as proteínas ligadas foram eluídas com tampão de eluição em condições ácidas (20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 M de NaCl e 8 M de ureia, pH 4,5). Os eluídos foram dialisados contra PBS, aliquotados em microtubos de 1,5 mL (LoBind protein<sup>TM</sup>, Eppendorf) e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização.

### 3.12 SDS-PAGE da expressão e purificação da quimera rROP2/OprI

Durante a expressão e purificação da proteína rROP2/OprI, alíquotas de cada processo foram coletadas para serem submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15%. Para preparação das amostras, utilizou-se 80 $\mu\text{L}$  da alíquota adicionados de 20% do volume de tampão SDS 5X. Após, as amostras foram desnaturadas a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos no termociclador. Ao fim do processo de desnaturação, 20 $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionadas ao gel de



poliacrilamida 15% e a eletroforese foi realizada durante 90 minutos a uma voltagem de 100 V. O SDS-PAGE foi realizado em duplicata, um dos géis foi corado com Comassie-Blue e o outro gel foi submetido à técnica de *Western Blot*.

### **3.13 Caracterização da rROP2/OpI por *Western Blot***

A técnica de *Western blot* foi utilizada para a caracterização da antigenicidade da rROP2/OpI. As amostras foram eletrotransferidas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) a 50 V, 90 mA, por 2 horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite em pó 5%, diluído em PBS-T (0,05% de Tween 20 em PBS). Para a detecção dos aminoácidos de histidina presente na proteína recombinante, foi utilizado anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis 1:5.000 em PBS-T, por 1 hora, a 37 °C sob agitação. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-mouse IgG, Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase, na mesma diluição. Para a revelação da reação foi utilizado 0,006mg de DAB (3,3' - Diaminobenzidina, Sigma-Aldrich) em solução contendo Tris HCl 50mM, 0,3% de Sulfato de Níquel e 10 µl de peróxido de hidrogênio.

Na verificação da antigenicidade da proteína recombinante produzida, através da técnica de *Western blot*, foi utilizado soro bovino e ovino de animais naturalmente infectados por *N. caninum*. Ambos os soros primários foram diluídos a uma concentração de 1:100 em PBS-T. O anticorpo secundário, anti-IgG bovino (Sigma-Aldrich), foi utilizado a uma diluição de 1:5000 em PBS-T. O anticorpo secundário ovino, anti-IgG ovino (Sigma-Aldrich), foi utilizado a uma diluição de 1:10.000. Para revelação da reação foi utilizada a solução de revelação contendo, Tris HCl 50 mM, Sulfato de Níquel 0,3% e 10 µl peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), adicionados de 0,006mg de DAB (3,3' - Diaminobenzidina).

## 4 Resultados

### 4.1 Extração do DNA e amplificação do fragmento ROP2

A extração de DNA total de taquizoítos de *N. caninum* utilizando a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001) foi efetiva, como pode ser observado na Figura 3.A. A PCR do DNA extraído amplificou a região codificadora do gene referente aos aminoácidos 191 a 359 da proteína *NcROP2*, fragmento com cerca de 522 pb, condizente com o tamanho esperado (Fig. 3-B).

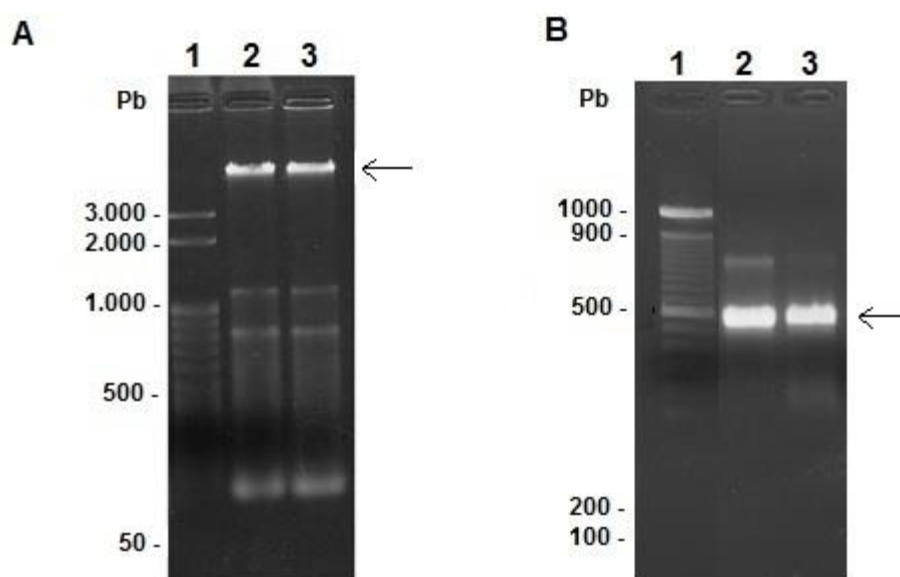


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1%. **A.** Extração de DNA de taquizoítos de *N. caninum*. 1) Marcador Sigma 50pb; 2) e 3) Amostras de DNA extraído de taquizoítos de *N.caninum*. **B.** Amplificação do gene *NcROP2* através da técnica de PCR. 1) Marcador Sigma 100pb; 2 e 3) Produto amplificado do gene *NcRop2*.

## 4.2 Seleção dos clones recombinantes

As colônias de *E. coli* TOP 10f que obtiveram crescimento sugerem que tenham sido transformadas com o plasmídeo recombinante uma vez que, cresceram em um meio seletivo. (Fig.4.A). No entanto as mesmas foram submetidas a PCR para identificação do gene *NcROP2* confirmando a presença do plasmídeo clonado na *E.coli* TOP10f transformada (Fig.4.B).



Figura 4.A. Cultivo de bactérias transformadas em meio LB ágar contendo 35 µg/mL de antibiótico canamicina. As colônias que obtiveram crescimento em meio contendo antibiótico sugerem que tenham sido transformadas com o plasmídeo clonado.

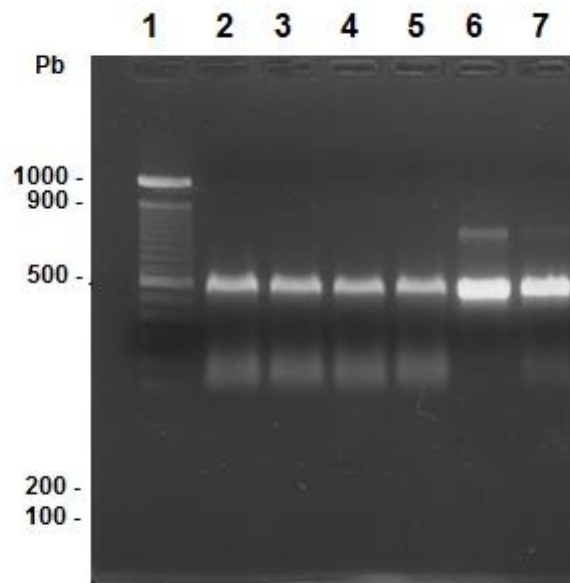


Figura 4.B. Eletroforese do produto de PCR das colônias transformadas cultivadas em meio seletivo. 1) Marcador de 100pb; 2, 3, 4 e 5) Vetor pOLT7 clonado com o gene *NcROP2*; 6) Vetor Topo clonado com o gene *NcROP2* .7) DNA de *N. caninum* (controle positivo).

#### 4.3 Sequenciamento de DNA dos clones recombinantes

Através dos resultados obtidos pelo sequenciamento, foi possível constatar 100% de similaridade com os dados presentes no GenBank, como demonstra o mapa da sequência da proteína *NcROP2*, que está apresentado na Fig. 5. Sendo assim o resultado obtido pelo sequenciamento do plasmídeo pOLT7 clonado com o gene *NcROP2*, reafirma o resultado da PCR demonstrada na seção 4.2 e na fig.4.B.

TACGTATGTATTTAACCTCTGAATATTTGTGTTTTGTTGGTGACGGTTTTCCACCATGGAACAG  
TCTGCGTCTGTGCGACCGTCTGCTCTTGTCCGGCTAGCTGGGGCATTGCTTGTCTTGGCAC  
TTTGCCACGCACAGCGAGGGCGCTGGCATTCTGCTGCCTCAGTCCTGGGATGACTCGGAAGCAG  
CTTTGAGTGTCCAGTCCCGTGGGAGGTCTCATGGGTGAACATCGCACCGCTTCTGCTGAGCAAGC  
CAACTTTGTGCGCAGAGGAGCAAGTGGAGGACAAGCGTGGGGGTTTCATGGTTGCAGCAAGAAGA  
GGTTCGAGCAAGTGCCATCCGAAGCACAAAACCAGACCGACGCAGAGCCCGGGACCCAGTCCCTC  
CACACGTTTCGGAAGGTTACTCGCGCGCCTGCGTTGGCGAGGAAGGGGGAGAGGGGGATCAG  
CTGGTGCGGCACAAGAGCAGCAGAGGGCGTCGAGTTCCTCTACGTACGAGGCTGCTTCAGCACT  
TGAAGCGTGGAGTAAGATTTCTCCGACACGACATACCGGCTGCCGCTGCACGATTGTACAGGCG  
**ACTGCGACCAGGCCA**GCCACGTCTGTTCCAGTTGACGAGGTGCCTCGGATGTAGAGACGAAT  
CCTATGTATTATCATGGCAGAGATAGCGGAGACGTCATACTTGAGGAACTGTTTAAACGTATTCC  
GGAAGCGGGGCAGCCAATCATCTACAGGGAAGCCTCGGCATACGATGATTTGGTCTCCAGGAT  
GTTGTGGCGTAATCAGAAGCACTTAGCGTCTCGGAACTAGGCGAGCCTTCACGGACGCTG  
ATAAGAGGGCGAATGCTCGGCAAAGTCCATCGGCTATCGTGTGTTGAAGCCACAGACCGAGAG  
ACGGGAGAAACGCTCGCTGTGAGTGTCCATATTTACGGAGAAACCGTCTGCCATGGATATTG  
AAGGGCTGCGCGACGAGGTAAGTGTGCATCAACTGTTTCCAAACATCAAAAACCCAAAGCAAGC  
TCAGACGTACATGAGATTGCTGTTCCACCGATATAGTAGGG**CCGACTAACACGCC**TGTCG  
CGCCGGGGCCTCGTAGGGCAGAGTCGCATTTGGATCGTGAACCGATACTTTTTGTATCCCCTGA  
TGCAAATAATCTTATCTCGTTATAGAGGGCTTGTGAGATCATCTGATGTAACAGCAACCTC  
GCGATCCATGCTCGGCTGCAGCTCACTGTTTCAGGTCATAAACTGGCGGCCAGCCTGCACCAC  
CACGGTGTGTCATGGAATTTGCAAATGAGTAGTATCTTCATACAGAAGAACGGAGCCGTGTT  
CTTGGGTAAGTTGAGGTATATGGTGAAGAAGGTGAATATTCGGAATTTACCTTCGGTTCGAGGAT  
TTGAGCCACCGGAAACCACTGACCCGTCAAGACAGGGCCGTTCTTATGATCCAAGGAAGCACAA  
GAGATATGCATTTGATGCATGGGCAGTGGGTTTGGCGATACACTGGATCTGGTGCAGGACCTT  
CCTGATACCGAGTCGGCGCCTTTGGGCGGCACCGAATGGATTTTTAAACGCTGCAGAAACATTG  
AATTGTCGGAGCCAGTGAATTTCTGCTGGAGGGTTCTACGACACGATCCGGAAGACCGCCT  
TCTTCTCTCCAAGCGACAGAGACTCCGCGAGTTCGAAAACATCAAAGAAATGATTTCTCTGTGT  
TGAATCAATACGACCAACAAGGTGAACCGAACTATGGGGAAAGGGTGATTTGCCAACTTCGGG  
AACGACTCAAGGCGACGACGGCGTAGATGAAACGGAGGACACGAGGCTATAGGATCTCCGAGG  
GGAGGTTACCGCAGATTTTGAATCGCCGGCGTCCGTTTTGCCGAAACACCGTTTTTTCGTAT  
GTGTTTTGAAACAGTGAATGTATTTCTGGCTGAGGCGATGCTGCAGACATAGTAGCAGTTGGC  
AGACGTGTTGAGAGGAGATGCGCGTGATCGCCTGCAATGCTGCAGCTGCAGTCTTGTGGTC  
AGCCGTCTTTCCAGTGTGTGTAGCTTCGTCGACGGCGCAGTTGGAGGGGGGAAGGGGAGAT  
CGGAGGTTCTTTGGGCACATCAGCGCCGTGCGTGGCCGAGGTCGGCTTCGCTCTGTGTAG  
TTTCCACATGAGTGGCATTACGAATGTGATTCTGAACGCGTGCCACGCCGCTGCCCTCTG  
GCGGTGCAGCCCCTAACACTGATTGATGCTTTTTGGGGACACAC

Figura 5. Sequência do gene *NcROP2* obtido a partir do número de acesso [HM587954](#) no GenBank. Os iniciadores estão destacados em vermelho flanqueando a sequência da *NcROP2* que corresponde a 522pb.

#### 4.4 Expressão e purificação da rROP2/OprI

A *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS foi transformada com o plasmídeo que codifica para a expressão da quimera rROP2/OprI, na qual, sob condições ideais e utilização do indutor IPTG, expressou a proteína recombinante de aproximadamente 50 kDa, massa molecular estimada quando comparada com o marcador molecular (Amersham Low Molecular Weight Calibration-GE Healthcare), em uma concentração de ~583µg/mL. Através do protocolo de preparação da membrana externa e extração do LPS utilizado neste estudo, foi possível a purificação da proteína recombinante

através de cromatografia de afinidade, utilizando resina de Ni<sup>+</sup>, como é observado na figura 6.

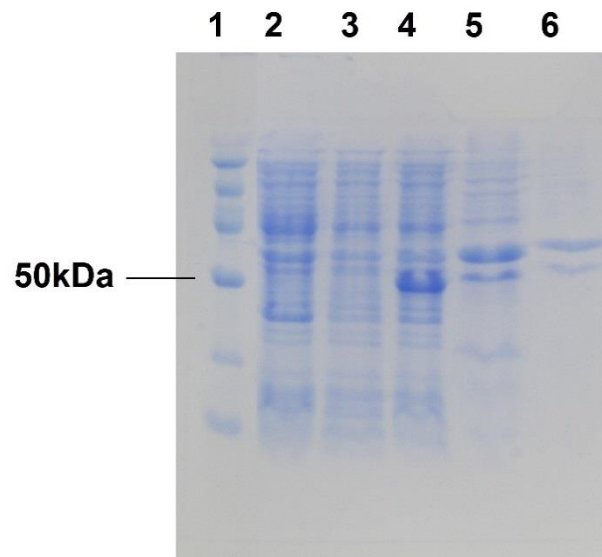


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do produto da expressão da quimera rROP2/OprI. 1) Marcador (Amersham Low Molecular Weight Calibration - GE Healthcare); 2) Cepa *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS; 3) Cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformada não induzida; 4) Cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformada induzida com IPTG; 5) Amostra após a etapa de preparação da membrana externa e extração do LPS; 6) Amostra após a cromatografia de afinidade.

#### 4.5 Caracterização da rROP2/OprI por *Western Blot*

A caracterização da quimera rROP2/OprI foi realizada através da técnica de *Western Blot*, utilizando MAb anti-6xhis. A reação com anticorpos anti-histidina foi evidentemente positiva, demonstrando uma banda de aproximadamente 50kDa, comprovando a presença de histidina na porção N-terminal da quimera constituída pela fusão da NcROP2 com a OprI (fig.7).

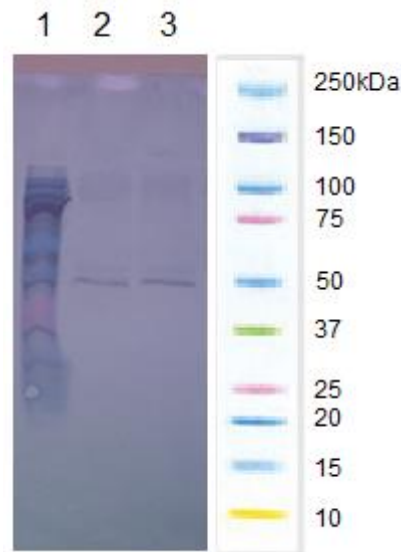


Figura 7. *Western Blot* da proteína quimérica rROP2/OpI, realizado com MAb anti-6xhis. 1. Marcador (Precision Plus Protein™, dual core. Bio Rad); 2 e 3. Amostras da quimera rROP2/OpI.

A antigenicidade da proteína rROP2/OpI, foi avaliada com soros de diferentes espécies naturalmente infectadas por *N. caninum*, sendo estas espécies bovina e ovina.

Através da técnica de *Western Blot* pode-se observar as características antigênicas que a proteína rROP2/OpI possui, uma vez que os anticorpos presentes nos soros de ambas as espécies bovina e ovina reagiram com a quimera (fig. 8) o que demonstra que a proteína recombinante rROP2/OpI possui determinantes antigênicos em comum a proteína nativa *NcROP2*.

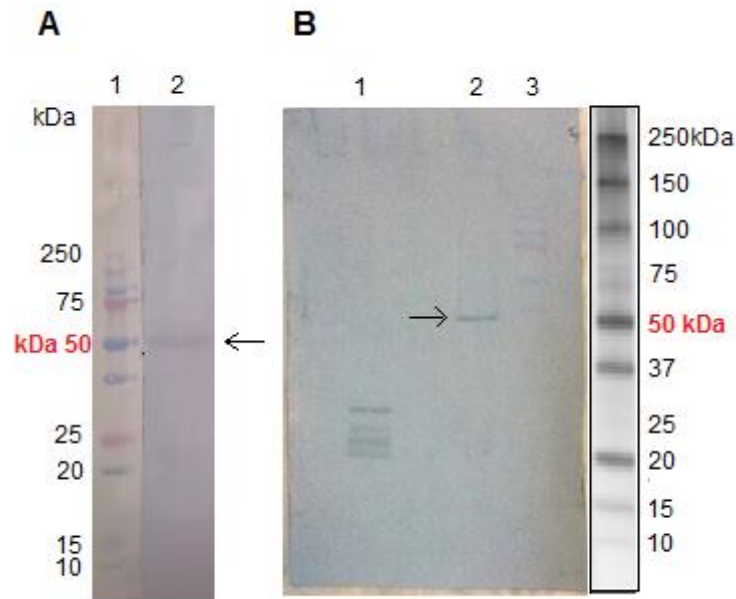


Figura 8. Avaliação da antigenicidade da rROP2/OprI pela técnica de *Western Blot*. **A)** *Western Blot* realizado com soro de ovino naturalmente infectado com *N. caninum*, 1. Marcador Precision Plus Protein<sup>TM</sup>, dual core. Bio Rad; 2. Reação do soro ovino positivo para *N. caninum* com a proteína rROP2/OprI. **B)** *Western Blot* realizado com soro de bovino naturalmente infectado com *N. caninum*, 1; Controle + (rROP2/LTB); 2. Reação do soro bovino positivo para *N. caninum* com a proteína rROP2/OprI; 3. Marcador Precision Plus Protein<sup>TM</sup>.



## 5 Discussão

No presente estudo foi possível expressar a quimera recombinante rROP2/OprI, composta pela porção mais imunogênica da proteína NcROP2 de *N. caninum* (MONNEY et al., 2011) e a lipoproteína OprI presente na membrana externa de *P. aeruginosa* (MYZUNO & KAGEYAMA 1978). Através do sistema de expressão heteróloga, utilizando a Cepa *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS e o vetor de expressão pOLT7, foi possível expressar a quimera rROP2/OprI em concentrações de ~583 µg/mL da proteína de interesse. O vetor de expressão pOLT7 utilizado, adiciona seis aminoácidos histidina na porção N terminal da proteína de interesse, conhecido como calda de histidina, permitindo a purificação por cromatografia de afinidade, bem como a identificação da proteína recombinante em *Western blot* com MAb anti-6xHis.

A obtenção da região codificadora, que compreende o amino ácido 191 a 359, do gene responsável pela proteína NcROP2 a partir da PCR, utilizando o DNA de taquizoítos de *N. caninum*, (fig.3.A e 3.B.) e a ligação deste inserto, utilizando a enzima T4 DNA ligase, no vetor de expressão pOLT7, que já possui o gene *OprI*, pode ser demonstrado pela confirmação por PCR através das colônias transformadas (fig. 5.A e 5.B). Estes resultados indicam que o método utilizado para fusão dos genes foi eficiente. Monney et al. (2011) utilizaram para construção de uma quimera, compostas por ROP2, MIC1 e MIC3, o Kit comercial InFusion™ Advantage PCR Cloning, e também obtiveram sucesso, porém o método apresenta custo elevado e número limitado de reações.

O protocolo estabelecido neste estudo para expressão de proteína quimérica rROP2/OprI, foi baseado no estudo realizado por Bastos et al. (2012), o qual ao avaliar duas diferentes cepas de expressão, *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS e *E. coli* BL21(DE3), e diferentes métodos de indução de proteína, durante a noite (entre 16 e 18h) e durante 3h de indução com ou sem IPTG,

observou que a cepa Rosetta (DE3) pLysS possui a melhor capacidade em manter os níveis de expressão do que a cepa BL21(DE3). Uma vez que a cepa BL21(DE3) expressou proteínas em ambos os períodos avaliados mesmo sem a adição do indutor IPTG.

Sendo assim, a cepa Rosseta (DE3) pLysS foi a escolhida para realização deste estudo, cepa a qual permitiu a expressão da proteína rROP2/OprI em uma concentração de ~583 µg/mL, com peso molecular estimado em 50kDa quando comparada ao marcador (Amersham Low Molecular Weight Calibration - GE Healthcare), (fig. 6).

Quanto a purificação e extração de LPS, o protocolo estabelecido anteriormente para a purificação da OprI recombinante, consistiu na preparação de frações de membrana externa bacteriana, seguido por cromatografia de afinidade com níquel. Foi possível demonstrar que a etapa de deslipidificação da membrana externa por tratamento com fenol antes da cromatografia foi essencial para separar OprI de outros componentes da membrana, obtendo assim a proteína sem a presença de LPS (fig.6). Estes resultados corroboram com os obtidos por Bastos et al. (2014 b.) que ao utilizarem protocolos de preparação de membrana externa e fenol pré-aquecido para extração do LPS, obtiveram a purificação de lipoproteínas de fusão recombinantes com baixa contaminação por LPS após cromatografia de afinidade.

A lipoproteína OprI de *P. aeruginosa* possui a capacidade de modular a resposta imune para uma via Th1, possuindo assim potencial adjuvante em vacinas contra doenças que exigem uma imunidade celular e/ou para infecções que exigem uma combinação da imunidade celular e humoral (Th1 e Th2) (PIE DADE et al., 2003). Esta lipoproteína é reconhecida pelo sistema imune inato como um PAMP, ativando mecanismos efetores antimicrobianos pela ativação de TLR2 e de TLR4, quando avaliado em modelos murinos (REVETS et al., 2005). Isto resulta em uma resposta prioritariamente do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (GARTNER et al., 2007).

Devido a estas características, diversos estudos vêm utilizando esta lipoproteína de fusão em constituições quiméricas na tentativa de produzir insumos imunobiológicos, que possam ser utilizados como antígenos para produção de vacinas mais eficazes.

Esta capacidade imunomoduladora apresentada pela Oprl pôde ser observada por Cote-Sirra et al. (2002) que utilizaram a glicoproteína Gp63, de *Leishmania major*, fusionada a Oprl. Foi possível demonstrar naquele estudo que houve a modulação de uma resposta Th1 dependente de TNF- $\alpha$ , conferindo uma resposta protetora. Resultado interessante por se tratar de protozoário intracelular dependente, assim como o *N. caninum* que necessita de uma resposta Th1 caracterizada pela produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (GARTNER et al., 2007). No entanto, quando se trata de bovinos apenas uma resposta Th1 não é suficiente em um organismo gestante. O que torna a lipoproteína Oprl um o imunomodulador ideal, uma vez que esta proteína de fusão possui a capacidade de desencadear uma resposta mista Th1/Th2 (PIEIDADE et al., 2003).

A característica que o vetor de expressão pOLT7 possui de adicionar à proteína de interesse seis aminoácidos de histidina (6xHis) na porção N-terminal da proteína recombinante nos permitiu confirmar sua expressão através da técnica de *Western Blot*. Os resultados obtidos na caracterização da proteína quimérica rROP2/Oprl, representado na figura 7, demonstra a reação de anticorpos contra 6xHis presente na proteína quimérica rROP2/Oprl. A identificação da calda de Histidina por anticorpos monoclonais confirma a presença da proteína recombinante de interesse.

A técnica de *Western Blot* também nos permitiu avaliar as características antigênicas da quimera rROP2/Oprl, através de soros positivos contra *N. caninum* de animais naturalmente infectados. A figura 8, demonstra a reação de soros bovinos e ovinos positivos contra *N. caninum* destacando as características antigênicas que a rROP2/Oprl possui. Estes resultados demonstram que nas características da proteína recombinante rROP2/Oprl, existem determinantes antigênicos similares aos determinantes presentes na proteína NcROP2 nativa, o que sugere que esta proteína pode-se tornar uma candidata a um antígeno vacinal. A quimera produzida neste estudo representa a porção mais imunogênica da proteína rNcROP2, como descrito primeiramente por Monney et al. (2011), fusionada a lipoproteína Oprl que é uma das proteínas mais abundantes da membrana externa de *P. aeruginosa* (Myzuno & Kageyama 1978).

O fato da proteína rNcROP2 ser conhecida pelas suas características antigênicas e imunogênicas, com capacidade de desencadear respostas imunes

tanto Th1 quanto Th2 (Debache et al. 2008), somados as características da lipoproteína Oprl de possuir a capacidade de modular a resposta imune, possuindo potencial adjuvante em vacinas contra doenças que exigem principalmente uma combinação da imunidade celular e humoral (Th1 e Th2) (PIE DADE et al., 2003), nos leva a crer que a quimera rROP2/Oprl produzida neste estudo pode-se tornar uma candidata com grande potencial para ser utilizada como antígeno vacinal contra neosporose.

## 6 Conclusão Geral

- Foi possível amplificar a região codificadora que compreende o amino ácido 191 a 359 da proteína *NcROP2* e inseri-la no vetor de expressão pOLT7, produzindo assim, um plasmídeo recombinante responsável pela expressão da proteína quimérica rROP2/OprI.
- Foi possível expressar em *E. coli* Rosetta (DE3) PlysS, purificar e caracterizar a proteína rROP2/OprI, em concentrações de 583 ug/mL.
- A proteína recombinante rROP2/OprI, possui determinantes antigênicos em comum com a proteína *NcROP2* nativa, sugerindo seu potencial como antígeno vacinal contra neosporose.

## Referências

- ALAEDDINE, F.; KELLER, N.; LEEPIN, A.; HEMPHILL, A. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in C57BL/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NcMIC. **Journal of Parasitology**, v.91, n.3, p. 657- 665, 2005.
- ALMÉRIA, S.; MAREZ, T.; DAWSON, H.; ARAUJO, R.; DUBEY, J. P.; GASBARRE, L. C. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. **Parasite Immunology**, v.25, p.383-392, 2003.
- ALMERIA, S. NOGAREDA, C. SANTOLARIA, P. GARCIA-ISPIERTO, I. YANIZ, J.L. LOPEZ-GATIUS F. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v.130, p. 35–42, 2009.
- AKIRA, S. Mammalian Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**. v. 15. p. 5-11. 2003.
- BASTOS, A.P. ADENES, M.B ALMEIDA, S.C.P. MARTINS, C. DUARTE, A. SANTOS, D.M. LEITÃO A. Immune response profile elicited by the model antigen ovalbumin expressed in fusion with the bacterial OprI lipoprotein **Molecular Immunology**. v 64. p. 36–45, 2014 a.
- BASTOS, A.P. MORAES, J. MARCELINO, E. LEITÃO, A. SANTOS, D.M. Na efficient depyrogenation method for recombinant bacterial outer membrane lipoproteins. **Protein Expression and Purification**. v. 98. p. 10-17. 2014 b.
- BASTOS, A.P. PIEDADE, J. RAMALHO, R. ALVES, S. SOARES, H. CORNELIS, P. MARTINS, C. LEITÃO A. A new cloning system based on the OprI lipoprotein for the production of recombinant bacterial cell wall-derived immunogenic formulations. **Journal Biotechnology**. v.157, p. 50–63, 2012.
- BARLING, K.S. LUNT, D.K. GRAHAM, S.L. CHOROMANSKI L.J. Evaluation of an inactivated *Neospora caninum* vaccine in beef feedlot steers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.222, p. 624–627, 2003.

BARTLEY, P.M. WRIGHT, S.E. MALEY, S.W. MACALDOWIE, C.N. NATH, M. HAMILTON, C.M. KATZER, F. BUXTON, D. INNES E.A. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. **Veterinary Research**. v. 43, p. 38, 2012.

BARR, B.C. CONRAD, P.A. BREITMEYER, R. SVERLOW, K. ANDERSON, M.L. REYNOLDS, J. CHAUVET, A.E. DUBEY, J.P. ARDANS A.A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990–1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, p.113–117, 1993.

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, p.1803-1806, 2001.

BECK, J. R. et al. RON5 is critical for organization and function of the Toxoplasma moving junction complex. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, 2014.

BJERKAS, I. et al. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**. v. 70, p. 271-274. 1984.

BUXTON, D. MCALLISTER, M. M. DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**. v.18, n.12, p.125-131, 2002.

CANNAS, A. NAGULESWARAN A. MÜLLER N. EPERON S. GOTTSTEIN B. HEMPHILL A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**. v. 126, n. 4, p. 303–312. 2003.

COFFMAN, R. L., SHER, A. & SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**. v.33, n.4, p. 492-503. 2010.

CORBELLINI, L. G. DRIEMEIER, D. CRUZ, C. F. E. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 103, p. 195–202, 2002.

CORNELIS, P. BOUIA, A. BELARBI, A. GUYONVARCH. A. KAMMERER, B. HANNAERT, V. & HUBERT, J. C. Cloning and analysis of the gene for the major

outer membrane lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**. v.3, p. 421-428. 1989.

COTE-SIERRA, J. BREDAN, A. TOLDOS, C. M. STIJLEMANS, B. BRYNS, L. CORNELIS, P. SEGOVIA, M. DE BAETSELIER, P. REVETS, H. Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against *Leishmania major*. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 240-248. 2002.

COWPER, B.; MATTHEWS, S.; TOMLEY, F. Molecular & Biochemical Parasitology The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 186, n. 1, p. 1–10, 2012.

DEBACHE, K. ALAEDDINE, F. GUIONAUD, C. MONNEY, T. MULLER, J. STROHBUSCH, M. LEIB, S. L. GRANDGIRARD, D. HEMPHILL, A. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**. v.39, p. 1373–1384, 2009.

DEBACHE, K. et al. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 1455–1463, 2008.

DEBACHE, K. KROPF, C. SCHÜTZ, C. A. HARWOOD, L. J. KÄUPER, P. MONNEY, T. Vaccination of mice with chitosan nanogel associated recombinant NcPDI against challenge infection with *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasite Immunology**. v.33, p.81–94, 2011.

DE VOS, D. BOUTON, C. SARGUINET, A., DE VOS, P., VAUTERIN, M. & CORNELIS, P. Sequence Diversity of the *oprI* Gene, Coding for Major Outer Membrane Lipoprotein I, among rRNA Group I Pseudomonads. **Journal of Bacteriology**. v.180, n. 24, p. 6551-6556. 1998.

DUBEY, J.P. KOESTNER, A. PIPER R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.197, p. 857–860, 1990.

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.G. MCALLISTER, M.M. MODRY, D. OMATA, Y. SIBLEY, L.D. SPEER, C.A. TREES, A.J. UGGLA, A. UPTON, WILLIAMS, S.J. LINDSAY D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal of Parasitology**. v. 32, p. 929–946. 2002.

DUBEY, J. P. HATTEL A.L. LINDSAY D.S. TOPPER M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.15, p. 1259-1263. 1988.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.84, p.349-367, 1999.

DUBEY, J. P. BUXTON, D. WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**. v. 134, n. 4, p. 267–289. 2007.

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

ENTRICAN G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **Journal of Comparative Pathology**. v.126, p. 79–94, 2002.

EPERON, S. BRÖNNIMANN, K. HEMPHILL, A. GOTTSTEIN B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**. v.21, p. 225–236. 1999.

FLYNN, R.J. MARSHALL E.S. Parasite limiting macrophages promote IL-17 secretion in naive bovine CD4 (+) T-cells during *Neospora caninum* infection. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v.144, p. 423–429. 2011.

GARTNER, T., BAETEN, M., OTIENO, S., REVETS, H., DE BAETSELIER, P. HUYGEN, K. Mucosal prime-boost vaccination for tuberculosis based on TLR triggering Oprl lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa* fused to mycolyl-transferase Ag85A. **Immunology Letters**, v.111, n. 1, p. 26-35. 2007.

GIBNEY, E.H. KIPAR, A. ROSBOTTOM, A. GUY, C.S. SMITH, R.F. HETZEL, U. TREES, A.J. WILLIAMS D.J. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**. v.38, p. 579–588, 2008.

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.

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

HALDORSON, G. J. MATHISON, B. A. WENBERG, K. CONRAD, P. A. DUBEY, J. P. TREES, A. J. YAMANE, I. BASZLER, T. V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. **International Journal for Parasitology**. v.35, p.1407- 1415, 2005.

HECKER, Y. P. et al. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. **Revista Argentina de Microbiología**. p. 216–230, 2012.

HEIN, H. E. MACHADO G. MIRANDA I.C.S. COSTA E.F. PELLEGRINI D.C.P. DRIEMEIER D. CORBELLINI L.G. Bovine neosporosis: evaluation of vertical transmission and population etiological fraction of abortion in a bovine population in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32. 2012.

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

HERNANDEZ, J. RISCO C. DONAVAN A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of The American Veterinary Medical Association**. v. 219, n.5, p. 632-635. 2001.

INNES, E.A. BUXTON, D. MALEY, S. WRIGHT, S. MARKS, J. ESTEBAN, I. RAE, A. SCHOCK, A. WASTLING J. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.916, p. 93–101. 2000.

INNES, E. A. A.G. BJÖRKMAN C. WILLIAMS D.J.L. 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. WRIGHT, S. BARTLEY, P. MALEY, S. MACALDOWIE, C. ESTEBAN-REDONDO, I. BUXTON D. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v.108, p. 29–36. 2005.

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

ISHII, K. J. & AKIRA, S. Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. **Journal of Clinical Immunology**. 27(4), 363-371. 2007.

JENKINS, M.; PARKER, C.; TUO, W.; VINYARD, B.; DUBEY, J. P. Inclusion of CpG adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis. **Infection and Immunity**. v.72, p.1817–1819, 2004.

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.

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.

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.

LANDMANN, J. K.; JILLELLA, D.; O'DONOGHUE, P. J.; MCGOWAN, M. R. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. **Australian Veterinary Journal**. v.80, p.502-503, 2002.

LOPEZ-GATIUS, F. ALMERIA, S. DONOFRIO, G. NOGAREDA, C. GARCIA-ISPIERTO, I. BECH-SABAT, G. SANTOLARIA, P. YANIZ, J.L. PABON, M. DE SOUSA, N.M. BECKERS J.F. Protection against abortion linked to gamma interferon

production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Theriogenology**. v.68, p. 1067–1073, 2007.

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

MALEY, S.W. BUXTON, D. MACALDOWIE, C.N. ANDERSON, I.E. WRIGHT, S.E. BARTLEY, P.M. ESTEBAN-REDONDO, I. HAMILTON, C.M. STORSET, A.K. INNES E.A. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. **Journal of Comparative Pathology**. v.135, p. 130–141. 2006.

MALEY, S.W. BUXTON, D. RAE, A.G. WRIGHT, S.E. SCHOCK, A. BARTLEY, P.M. ESTEBAN-REDONDO, I. SWALES, C. HAMILTON, C.M. SALES, J. INNES E.A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation **Journal of Comparative Pathology**. v.129, p. 186–195, 2003.

MACALDOWIE, C. MALEY, S.W. WRIGHT, S. BARTLEY, P. ESTEBAN-REDONDO, I. BUXTON, D. INNES E.A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy **Journal of Comparative Pathology**. v.131, p. 142–156, 2004.

MAPA- Ministério da Agricultura pecuária e desenvolvimento, disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)> Acesso em: 14 Jan. 2015.

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

MONNEY, T. RÜTTI D, SCHORER M, DEBACHE K, GRANDGIRARD D, LEIB SL, HEMPHILL A. Recombinant NcMIC3-1-R is a microneme- and rhoptry based chimeric antigen that protects against acute neosporosis and limits cerebral parasite load in the mouse model for *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v. 29, n. 40, p. 6967–75, 16 set. 2011.

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

MONNEY, T. HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental parasitology**, v. 140, p. 52–70, 2014.

MOYLE, P. M. TOTH, I. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, n.5, p. 506-516. 2008.

MARTIN, A. M.; LIU, T.; LYNN, B. C.; SINAI, A. P.; The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.54, p.25–28, 2007.

NISHIKAWA, Y.; MIKAMI, T.; NAGASAWA, H. Vaccine Development against *Neospora caninum* Infection. **The Journal of Veterinary Medical Science**. p. 1–5, 2002.

MOSKWA, B.; GOZDZIK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. Studies on *Neospora caninum* DNA detection in the oocytes and embryos collected from infected cows. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.370-375, 2008.

MIZUNO, T. & KAGEYAMA, M. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biochemistry**. v.84, n.1, p. 179-191. 1978.

PIEADADE, J. Expressão em *Escherichia coli* da proteína Nef do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (VIH-1) como produto de fusão com a lipoproteína OprI da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* e indução de imunidade humoral anti-Nef em modelo animal. Tese de Doutorado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2003.

QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C.; *Neospora caninum*: a cause of immune mediated failure of pregnancy? **Trends Parasitology**, v.18, p.391-394, 2002.

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

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**. v. 43, n. 2, p. 133–42. 2013.

REICHEL, M. P. Control options for *Neospora caninum* is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**. v. 141, n. 11, p. 1455–70. 2014.

REVETS, H., PYNAERT, G., GROOTEN, J. DE BAETSELIER, P. Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. **Journal of Immunology**. v. 174, n. 2, p. 1097-1103. 2005.

ROMERO, J. J. PÉREZ, E. FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**. v.123, p.149-159, 2004.

ROSBOTTOM, A. GUY, C.S. GIBNEY, E.H. SMITH, R.F. VALARCHER, J.F. TAYLOR, G. WILLIAMS D.J. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection **Parasite Immunology**. v.29, p. 219–228, 2007.

ROSBOTTOM, A. GIBNEY, E.H. GUY, C.S. KIPAR, A. SMITH, R.F. KAISER, P. TREES, A.J. WILLIAMS D.J. Up regulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**. v.76, p. 2352–2361, 2008.

ROSBOTTOM, A. GIBNEY, H. KAISER, P. HARTLEY, C. SMITH, R.F. ROBINSON, R. KIPAR, A. WILLIAMS D.J. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS ONE**, v.6, p. 157-199, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, Ed., 2001.

SRINIVASAN S.; MÜLLER J.; SUANA A.; HEMPHILL A.; Vaccination with microneme protein NcMIC4 increases mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**, v.92, p.1235–43, 2007.

VAN DUIN, D., MEDZHITOV, R. & SHAW, A. C. Triggering TLR signaling in vaccination. **Trends in Immunology**. v. 27, n.1, p. 49-55. 2006.

WARSHAKOON, H. J., HOOD, J. D., KIMBRELL, M. R., MALLADI, S., WU, W. Y., SHUKLA, N. M., AGNIHOTRI, G., SIL, D. & DAVID, S. A. Potential adjuvant properties of innate immune stimuli. **Human Vaccines**, v.5, p. 381-394. 2009.

WEBER, F.H. JACKSON, J.A. SOBECKI, B. CHOROMANSKI, L. OLSEN, M. MEINERT, T. FRANK, R. REICHEL, M.P. ELLIS J.T. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-

associated fetal loss in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.20, p. 99–105. 2013.

WESTON, J.F. HEUER, C. WILLIAMSON N.B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**. v.103, p. 136–144, 2011.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 103, n. 2-3, p. 136–144, 2012.

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. TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopa-thy in *Neospora caninum* infected cattle. **Parasite Immunology**. v.28, n.3, p.61–67, 2006.

WILLIAMS D.J. GUY. C.S. SMITH R.F. ELLIS. J. BJORKMAN. C. REICHEL M.P. TREES A.J. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infection and Immunity**. v. 75. p. 1343–1348. 2007.

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.

ZHU, X., RAMOS, T. V., GRAS-MASSE, H., KAPLAN, B. E. BENMOHAMED, L. Lipopeptide epitopes extended by an Nepsilon-palmitoyl-lysine moiety increase uptake and maturation of dendritic cells through a Toll-like receptor-2 pathway and trigger a Th1-dependent protective immunity. **European Journal of Immunology**. v. 34, n.11, p. 3102-3114. 2004.