

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



Tese

**Avaliação de ROP2 recombinante de *Neospora caninum* como  
imunobiológico**

**Alceu Gonçalves dos Santos Junior**

Pelotas, 2017

**Alceu Gonçalves dos Santos Junior**

**Avaliação de ROP2 recombinante de *Neospora caninum* como  
imunobiológico**

Tese 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 Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: PhD. Prof. Fábio Pereira Leivas Leite

Co-orientador: Dr. Leandro Quintana Nizoli

Pelotas, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237a Santos Junior, Alceu Gonçalves dos.

Avaliação de ROP2 recombinante de *Neospora caninum* como imunobiológico / Alceu Gonçalves dos Santos Junior ; Orientação Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite ; Co-orientação Dr. Leandro Quintana Nizoli – Pelotas, RS : UFPel/FV/PPGV, 2017.

57 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Veterinária.

1. Saúde dos animais. 2. Neosporose. 3. Bovinos.  
4. Protozoários. I. Leivas Leite, Fábio Pereira, orient. II. Nizoli, Leandro Quintana, co-orient. III. Título.

CDU 2. ed.: 614.9

Alceu Gonçalves dos Santos Junior

Avaliação de ROP2 recombinante de *Neospora caninum* como imunobiológico

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04/04/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)  
Doutor em Veterinary Sciences University of Wisconsin – Madison - EUA

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elizabeth Aires Berne  
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Farias da Costa Ávila  
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

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

*Ao amor de minha vida e minha família,  
por compartilhar comigo esta vida...*

## **Agradecimentos**

A minha família pela colaboração e estímulo, pelo suporte nas horas difíceis, por depositar sua confiança.

A uma pessoa muito especial em minha vida, Tatiana, por seu carinho, companheirismo e paciência durante esta etapa. Obrigado por dividir comigo a tua companhia!

A um grande orientador e amigo, sem palavras para expressar reconhecimento a esse distinto professor: Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, meu muito obrigado!

Aos amigos que passaram, e os que hoje compartilham os agradáveis momentos no Laboratório 4, obrigado pela ajuda e paciência.

Aos colegas do Laboratório 11, obrigado pela disposição em sempre ajudar.

Aos colegas de trabalho do centro de Biotecnologia e seus laboratórios, em especial ao Professor Odir Antônio Dellagostin pela ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério central da UFPel, pela amizade e colaboração na realização do experimento.

Professores do PPGV, pela ajuda na formação durante esta etapa.  
Muito obrigado!

*“...No son las pérdidas ni las caídas lo que pueden hacer fracassar nuestra vida, sinó la falta de coraje para levantarnos y seguir adelante...”*

*S.A.W.*

## Resumo

SANTOS JUNIOR, Alceu Gonçalves. **Avaliação de ROP2 recombinante de *Neospora caninum* como imunobiológico.** 2017. 57f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

*Neospora caninum* é um parasito intracelular, apicomplexa, uma das principais causas de aborto em bovinos levando a perdas econômicas significativas. A busca pelo controle da neosporose tem motivado amplos estudos, utilizando como alvos, proteínas recombinantes derivadas de organelas do protozoário, em modelos animais. A inoculação de vacinas de subunidade tem demonstrado que respostas imunes Th1 e Th1/Th2 são protetoras ao desafio, entretanto, ineficientes no bloqueio a infecção fetal. Os objetivos deste estudo foram a expressão de rNcROP2 e sua fusão com LTB, resultando rNcROP2 e rLTB/NcROP2 em *Escherichia coli*, avaliação a antigenicidade das proteínas produzidas frente a soros de bovinos naturalmente infectados, e identificação da indução de citocinas produzida quando utilizada como vacina de subunidade em camundongos BALB/c. As proteínas rNcROP2 e rLTB/NcROP2 foram expressas de forma insolúvel, solubilizadas apenas em ureia a 8 M, apresentando um rendimento de aproximadamente 125 mg/L e 25 mg/L, respectivamente. A conformação adotada pelas duas construções permitiu o reconhecimento de epítomos antigênicos. A proteína rNcROP2 usada como diagnóstico em bovinos apresentou sensibilidade e especificidade de 100% com ponto de corte  $>0,044$ . Como imunógenos vacinais, as duas proteínas em doses de 25  $\mu$ g foram imunogênicas, uma vez que estimularam a produção de anticorpos IgG após a segunda dose mantendo-se até 60 dias após inoculação, principalmente do isotipo IgG1. Na expressão de citocinas utilizando rLTB/NcROP2 observou-se uma reduzida estimulação de citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ , a inoculação não trouxe aumento significativo de IL-10 e IFN- $\gamma$ . No entanto a indução de IL-12 e IL-17 teve aumento significativo após a inoculação. As respostas à inoculação de rNcROP2 e rLTB/NcROP2 em nosso estudo sugerem que os alvos são capazes de produzir uma resposta Th1/Th17. Os resultados reportam uma indução significativa de IL-17 por vacinas de subunidade com ROP2, esse efeito sugere ser promissor em estudos de proteção contra *N. caninum*.

**Palavras-chave:** protozoário; bovinos; proteínas; expressão; imunógeno



## Abstract

SANTOS JUNIOR, Alceu Gonçalves. **Evaluation of recombinant ROP2 of *N. caninum* as vaccine antigen.** 2017. 57f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

*Neospora caninum* is an intracellular apicomplex parasite, a major cause of miscarriage in cattle leading to significant economic losses. The search for the control of neosporosis has motivated extensive studies, using as targets, recombinant proteins derived from protozoan organelles, in animal models. Inoculation of subunit vaccines has demonstrated that Th1 and Th1/Th2 immune responses are protective to the challenge, however ineffective in blocking fetal infection. The objectives of this study were the expression of rNcROP2 and its fusion with LTB, resulting in rNcROP2 and rLTB/NcROP2 in *Escherichia coli*, evaluation of the antigenicity of proteins produced against naturally infected bovine sera, and identification of cytokine induction produced when used as a vaccine of subunit in BALB/c mice. The rNcROP2 and rLTB/NcROP2 proteins were expressed in an insoluble form, solubilized in only 8 M urea, yielding approximately 125 mg/L and 25 mg/L, respectively. The conformation adopted by the two constructs permitted the recognition of antigenic epitopes. The rNcROP2 protein used as a diagnostic in cattle showed sensitivity and specificity of 100 % with cutoff >0.044. As immunogenic vaccines, the two proteins at doses of 25 µg were immunogenic, since they stimulated the production of IgG antibodies after the second dose being maintained up to 60 days after inoculation, mainly of the IgG1 isotype. In the expression of cytokines using rLTB/NcROP2 a reduced stimulation of cytokines IL-10 and IFN-γ it was observed, the inoculation did not bring significant increase of IL-10 and IFN- γ. However, IL-12 e IL-17 induction had a significant increase after inoculation. Responses to rNcROP2 and rLTB/NcROP2 inoculation in our study suggest that the targets are capable of producing a Th1/Th17 response. The results report a significant increase induction of IL-17 by subunit vaccines with ROP2, this effect suggests to be promising in studies of protection against *N. caninum*.

**Keywords:** protozoan; cattle; proteins; expression; immunogen

## Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo de vida do <i>Neospora caninum</i> .....	14
<b>Artigo 1</b>		
Figura 1	Silico analysis.....	23
Figura 2	Characterization of rROP2.....	24
Figura 3	IgG dynamics. The data represent the mean ELISA values ( $\pm$ standard error) of total serum IgG from mice inoculated with rROP2....	24
Figura 4	Receiver operating characteristic (ROC) of ELISA-rROP2 using 5 positive and 5 negative sera.....	24
<b>Artigo 2</b>		
Figura 1	Western blotting.....	31
Figura 2	ROC analysis on the ELISA-NcSRS2.....	31
<b>Artigo 3</b>		
Figura 1	Precipitações de rBm86-CG por acetona e metanol.....	37
Figura 2	SDS-PAGE 15% para análise da obtenção da proteína rBm86-CG (79 kDa) precipitada por acetona e etanol.....	37
Figura 3	SDS-PAGE 15% para análise da obtenção da proteína rBm86-CG (79 kDa) precipitada com sulfato de amônio.....	37
Figura 4	Western Blot da reatividade de rBm86-CG (79 kDa) com anticorpos de bovinos após obtenção das precipitações.....	38

## Lista de Siglas

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
CEEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
His	Histidina
IFAT	Teste de Imunofluorescência Indireta
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LTB	Subunidade B da Enterotoxina Termolábil de <i>Escherichia coli</i>
CT	Toxina Colérica do <i>Vibrio cholerae</i>
Nc-1	Isolado número 1 de <i>Neospora caninum</i>
NcROP2	Proteína ROP2 de <i>Neospora caninum</i>
OPD	o-Phenylenediamine Dihydrochloride
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS-T	Tampão Fosfato Salino com 5% de Tween
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de Operação do Receptor)
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
Th1	Linfócito T Diferenciado em Tipo 1
Th2	Linfócito T Diferenciado em Tipo 2
Th17	Linfócito T Diferenciado em Tipo 17

## Lista de Símbolos

kDa	Kilo Daltons
mL	Mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{m}$	Micrometro
L	Litro
mg/L	Miligramo por litro

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Agente etiológico.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Ciclo biológico.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Resposta imune.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5</b>	<b>Antígeno.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Hipótese.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivo Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Artigos.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo 1 - Cloning and expression of <i>Neospora caninum</i> rhoptry 2 and its potential as an immunobiological for neosporosis control.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Artigo 2 - The development of an indirect ELISA Test using the recombinant protein NcSRS2 to detect anti-<i>Neospora Caninum</i> antibodies in humans.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Artigo 3 - Avaliação de métodos para obtenção de proteínas recombinantes.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Patente.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Título.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>Resumo.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Reinvindicações.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Considerações Finais.....</b>	<b>44</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>45</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>55</b>

## 1 Introdução

O setor agropecuário brasileiro é relevante para o mercado mundial. Dentre suas especialidades, a carne bovina, ocupa lugar de destaque devido sua alta produção e qualidade, além de cumprir com todos requisitos sanitários e éticos exigidos para exportação. Dessa forma, seus produtos são comercializados em diversos lugares do mercado mundial.

A demanda por produtos de qualidade tem sido uma oportunidade para expansão do mercado da carne bovina brasileira, por outro lado, para suprir estas demandas nacionais e internacionais os produtores necessitam estar constantemente qualificando-se e trabalhando rigorosamente no controle sanitário de seus rebanhos, tornando o país livre de muitas doenças infecciosas importantes.

A busca por melhores índices de produtividade dentro dos rebanhos, implica diretamente em aperfeiçoar e reduzir, ao mínimo, problemas sanitários. Neste sentido, se faz necessário a pesquisa de enfermidades que possam provocar transtornos reprodutivos no rebanho. Dentre estas enfermidades a Neosporose, causada pelo protozoário apicomplexa, *N. caninum*, tem sido reportada como a maior causadora de aborto em bovinos no mundo, produzindo, anualmente, prejuízos bilionários ao setor (REICHEL *et al.*, 2013).

### 1.1 Agente etiológico

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, estreitamente relacionado ao parasito *Toxoplasma gondii* (DUBEY *et al.*, 1988a). O parasito foi descrito pela primeira vez por Bjerkas *et al.* em 1984, na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos, paralisia dos membros posteriores, soronegativos para *T. gondii* (GOODSWEN *et al.*, 2013). Em 1988, *N. caninum* foi reconhecido como nova espécie e gênero ao se analisar cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva para toxoplasmose. Após a sua descrição, *N. caninum* foi isolado em cultura celular a partir de cistos teciduais de cães com infecção congênita

(DUBEY *et al.*, 1988b) e identificado em bovinos como causa de aborto (THILSTED e DUBEY, 1989).

## 1.2 Ciclo biológico

*Neospora caninum* apresenta ciclo biológico heteroxeno, desenvolve-se em hospedeiros distintos, subdivididos em fases sexuada e assexuada. A reprodução sexuada ocorre em canídeos (cão, coiote, dingó australiano, lobo) que são considerados hospedeiros definitivos (McALLISTER *et al.*, 1999; GONDIM *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2010; DUBEY *et al.*, 2011), enquanto que a reprodução assexuada ocorre em vários hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, galinhas, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (MINEO *et al.*, 2011; GOODSWEN *et al.*, 2013).

O ciclo de vida envolve três formas infecciosas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos) (Figura 1), sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito (GOODSWEN *et al.*, 2013; DONAHOE *et al.*, 2015).

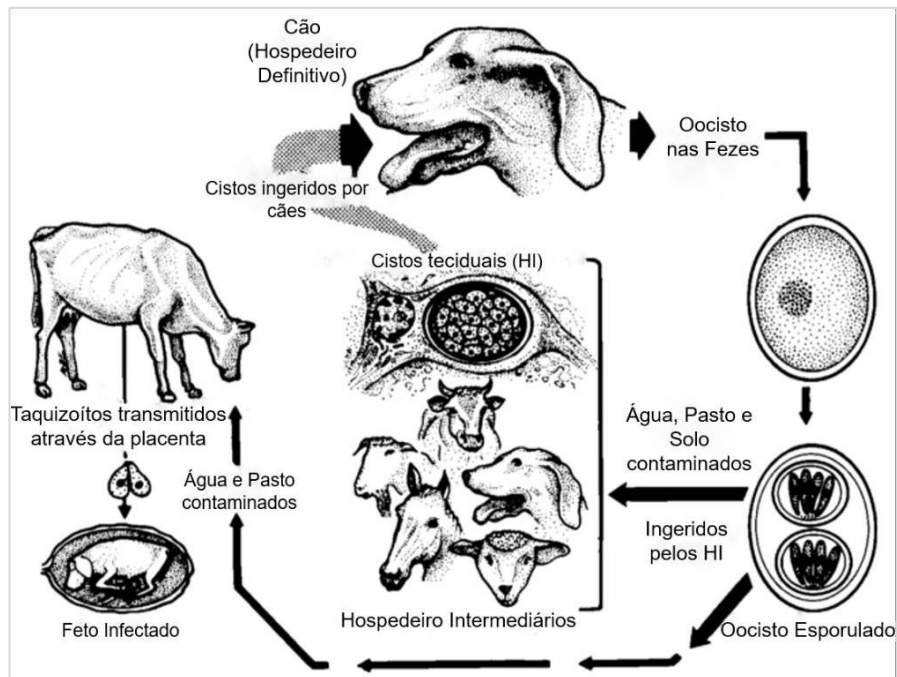


Figura 1 - Ciclo de vida do *Neospora caninum*. (adaptado Dubey *et al.*, 2007)

### 1.3 Diagnóstico

Existem vários testes sorológicos utilizados na detecção de anticorpos para *N. caninum*, incluindo a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (DUBEY *et al.*, 1988); o teste de aglutinação direta (NAT) (ROMAND *et al.*, 1998); vários ensaios imunoenzimático (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (DUBEY and LINDSAY, 1996) e Western-Blotting (BJERKAS *et al.*, 1984). Todas estas técnicas são baseadas em antígenos de taquizoítos. RIFI e NAT utilizam taquizoítos de *N. caninum* fixados.

Em bovinos vivos, a infecção por *N. caninum* é primariamente diagnosticada por sorologia, com a detecção de anticorpos específicos no soro, plasma ou leite (ALVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013). Técnicas alternativas, como a detecção de DNA parasita por PCR no sangue ou sêmen (SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007; OKEOMA *et al.*, 2004), e a avaliação de citocinas pró-inflamatórias como marcadores de exposição ao parasita (ROJO-MONTEJO *et al.*, 2013), também poderiam ser aplicadas. Entretanto, sendo indicadores transitórios de infecção, sua utilização está confinada ao campo de pesquisa.

O ensaio de ELISA baseado na utilização da proteína recombinantes de *N. caninum* estão em desenvolvimento, e já apresenta resultados importantes. A NcGRA7 foi útil na detecção de anticorpos em abortar vacas versus aqueles partos normalmente (HUANG *et al.*, 2007). Borsuk *et al.*, (2011) utilizando a proteína NcSRS2 frente a soro de bovinos obteve 95 % de especificidade e 95 % de sensibilidade.

Testes sorológicos são utilizados para diagnosticar *N. caninum* como possível causa de abortamento, na seleção de bovinos para compra e venda, para prevenir a introdução de novos animais infectados no rebanho e na verificação da prevalência de determinada região (WILLIAMS *et al.*, 2000; BAILLARGEON *et al.*, 2001). Provas soropositivas para *N. caninum*, indicam somente a exposição ao agente (WILLIAMS *et al.*, 2000).

### 1.4 Resposta imune

A resposta imune do hospedeiro induzida pela infecção por *N. caninum* tem sido estudada utilizando principalmente modelos experimentais, sendo os murinos as espécies de predileção (HEMPHILL *et al.*, 2016). A imunidade é similar a outros



parasitos intracelulares, cujo a imunidade mediada por células desempenha um papel crucial no hospedeiro, por meio da redução da replicação de *N. caninum* (INNÉS *et al.*, 2002). Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos deficientes para a interleucina 12 (IL-12) ou interferon gama (IFN- $\gamma$ ) são incapazes de resistir à infecção com *N. caninum* (INNÉS *et al.*, 2002). Dessa forma, em concordância com o observado para outros patógenos intracelulares, os dados indicam que a imunidade protetora do hospedeiro induzida pela infecção por *N. caninum* é tipicamente mediada por um padrão de resposta imune do tipo Th1, que envolve a produção de IFN-  $\gamma$ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com a produção de óxido nítrico (NO) (DONAHOE *et al.*, 2015; HECKER *et al.*, 2015).

### 1.5 Antígeno

O controle da neosporose exige práticas rigorosas e que apresentam custos elevados, uma alternativa a ser considerada, pelos produtores, como eficiente estratégia de intervenção é a vacinação dos rebanhos (HEMPHILL *et al.*, 2015). Na tentativa de atingir esse objetivo, foi disponibilizada no mercado uma vacina formulada a partir de taquizoítos inativados, no entanto, a vacina produziu resultados contraditórios nos países em que foi testada (ROMERO *et al.*, 2004). Além disso seu efeito foi associado ao aumento do risco de morte embrionária, motivo pelo qual foi retirada do mercado (WESTON *et al.*, 2012).

A proteção ideal desejada para bovinos contra neosporose só foi conseguida com vacinas vivas até o momento, mas sua produção industrial é dispendiosa e não desperta interesse para fabricação, por outro lado, as vacinas de subunidade vem largamente ganhado espaço, e sendo estudadas ao longo dos anos, principalmente em camundongos (HEMPHILL *et al.*, 2015). A produção dos antígenos recombinantes com o uso de ferramentas de bioinformática, dentro da vacinologia reversa, tornam possível a predição de regiões que contenham epítomos preferencias de linfócitos B e T, montando assim uma lista de potenciais candidatos a compor vacinas (HEMPHILL, 2016).

Neste contexto, encontra-se a proteína roptria 2 (NcROP2), que já foi reportada como sendo capaz de induzir uma resposta imune protetora em camundongos desafiados (DEBACHE *et al.*, 2008), sendo utilizada em difetentes

formulações, associações e vias de administração sempre mantendo resultados promissores de proteção e modulação da resposta imune com tendência a Th2 (DEBACHE *et al.*, 2010, 2008).

Monney *et al.* (2011), com estudo de bioinformática, selecionou regiões de NcROP2 que continham epítomos lineares preferenciais aos linfócitos B, construiu quimeras, quando analisadas como vacinas de subunidade mantiveram bons resultados de proteção, semelhantes a encontrado por Debache *et al.* (2008) quando usou NcROP2 inteira. Em seguida, Monney *et al.* (2012), avaliou a proteção conferida por suas quimeras na infecção congênita, e obteve uma proteção muito inferior a obtida anteriormente. A proteção a infecção congênita em modelos de fêmeas prenhes passou a ser adotado por uma grande parte de pesquisadores (HEMPHILL *et al.*, 2015).

A partir desse ponto os alvos promissores passaram a enfrentar problemas e serem descredenciados, pois não conseguiram manter seus resultados de proteção devido à modulação fisiológica produzida durante a gestação (MONNEY *et al.*, 2012). Para corrigir essa deficiência o uso de adjuvantes pode ser uma alternativa promissora a potencializar a ação de vacinas de subunidade (MONNEY *et al.*, 2013).

Uma das moléculas de relevância para compor vacinas de subunidade (coadministrada ou fusionada) com função adjuvante é a enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB). Por meio da subunidade B é capaz de apresentar antígenos fusionados e sua estimulação produz uma resposta imune voltada mista Th1 e Th2 (DA HORA *et al.*, 2010).

Portanto, tendo em vista a necessidade de uma vacina contra *N. caninum*, sendo NcROP2 uma proteína com importantes resultados, e a possibilidade de realizar a fusão com moléculas adjuvantes como LTB, tornam promissores os resultados destas moléculas, obtendo sua expressão em *E. coli*, a sua inoculação em modelos animais e avaliação da modulação da resposta imune produzida.

## **2 Hipótese**

As proteínas NcROP2 e LTB/NcROP2 recombinantes de *N. caninum* expressas no sistema procarioto *E. coli* são capazes de conservar características antigênicas e induzir uma resposta imune em modelos murinos.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resposta imune das proteínas rNcROP2 e rLTB/NcROP2 de *Neospora caninum*, expressas em *Escherichia coli*, como imunobiológico.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Síntese da sequência gênica e clonagem;
- Expressar as proteínas em *E. coli*;
- Comprovar a antigenicidade das proteínas rNcROP2 e rLTB-NcROP2;
- Avaliar a resposta imune humoral gerada pela inoculação de rNcROP2 e rLTB-NcROP2 em camundongos;
- Avaliar a resposta imune celular através da transcrição de genes de citocinas.

## 4 Artigos

### 4.1 Artigo 1

#### **Cloning and expression of *Neospora caninum* rhoptry 2 and its potential as an immunobiological for neosporosis control**

Alceu G. dos Santos Junior<sup>2</sup>, Neida Lucia Conrad<sup>2</sup>, Renan Eugênio A. Piraine<sup>2</sup>,  
Rodrigo C. Cunha<sup>2</sup>, Renato Andreotti<sup>3</sup> and Fábio P. L. Leite<sup>2\*</sup>

Será submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

## Cloning and expression of *Neospora caninum* rhoptry 2 and its potential as an immunobiological for neosporosis control<sup>1</sup>

Alceu G. dos Santos Junior<sup>2</sup>, Neida Lucia Conrad<sup>2</sup>, Renan Eugênio A. Piraine<sup>2</sup>, Rodrigo C. Cunha<sup>2</sup>, Renato Andreotti<sup>3</sup> and Fábio P. L. Leite<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**- dos Santos A.G.Jr., Conrad N.L., Piraine R.E.A., Cunha R.C., Andreotti R. & Leite F.P.L. 2021. **Cloning and expression of *Neospora caninum* rhoptry 2 and its potential as an immunobiological for neosporosis control.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 41:e06814, 2021. Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: fleivasleite@gmail.com

The protozoan *Neospora caninum* is known worldwide as one of the main causes of abortion in cattle. During infection, rhoptry proteins present in the apical complex of the parasite play important roles in adhesion and parasitophorous vacuole formation. The use of *N. caninum* ROP2 in experimental vaccines has shown promising protective results. In our study we performed cloning and expression in *Escherichia coli* of an antigenic portion of *N. caninum* ROP2. The recombinant protein (rROP2) was obtained in insoluble form, and the purified protein showed a size of approximately 18kDa. Even being a small truncate NcROP2 region, it was possible to conserve the antigenic epitopes which were recognized by bovine serum naturally infected with *N. caninum*. Vaccination with rROP2 on aluminum hydroxide adjuvant induced high levels of rROP2-specific IgG antibodies capable of recognizing native protein in tachyzoite lysates. In conclusion, our approaches were effective in obtaining the rROP2 protein, which induced specific mouse immune response and was also recognized by sera from *N. caninum* naturally infected cattle. These results suggest that it is a promising antigen for the development of neosporosis subunit vaccines as well as a suitable antigen for use in immunodiagnosis.

**INDEX TERMS:** Cloning, *Neospora caninum*, rhoptry 2, immunobiology, neosporosis, protozoa, abortion, vaccine, diagnosis

**RESUMO.**- [Clonagem e expressão de rhoptry 2 *Neospora caninum* e seu potencial como um imunobiológico para o controle de neosporose.] O protozoário *Neospora caninum* é conhecido mundialmente como uma das principais causas de aborto em bovinos. Durante a infecção, as proteínas rhoptry presentes no complexo apical do parasita desempenham papel importante na adesão e formação de vacúolos parasitóforos. O uso de ROP2 de *N. caninum* em vacinas experimentais tem mostrado resultados de proteção promissores. Em nosso estudo, realizamos a clonagem e expressão em *Escherichia coli* de uma porção antigênica de *N. caninum* ROP2. A proteína recombinante (rROP2)

foi obtida na forma insolúvel, e a proteína purificada apresentou tamanho aproximado de 18kDa. Mesmo sendo uma pequena região truncada de NcROP2, foi possível conservar os epítomos antigênicos que foram reconhecidos pelo soro de bovinos naturalmente infectados com *N. caninum*. A vacinação com rROP2 adsorvida no adjuvante de hidróxido de alumínio induziu altos níveis de anticorpos IgG anti-rROP2, capazes de reconhecer a proteína nativa em lisados de taquizoítos. Em conclusão, nossas abordagens foram eficazes na obtenção da proteína rROP2, que induziu resposta imune específica em camundongos e também foi reconhecida por soros de bovinos naturalmente uso em imunodiagnóstico.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Clonagem, rhoptry 2, *Neospora caninum*, imunobiologia, neosporose, protozoa, aborto, vacina, diagnóstico.

<sup>1</sup> Received on January 7, 2021. Accepted for publication on February 16, 2021.

<sup>2</sup> Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Capão do Leão, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. \*Corresponding author: fleivasleite@gmail.com, fabio\_leite@ufpel.edu.br

<sup>3</sup> Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia 830, Vila Popular, Campo Grande, MS 79106-550, Brazil.

## INTRODUCTION

Neosporosis is described worldwide as the principal parasitic disease in cattle, and it is estimated to be responsible for economic losses in cattle industries worldwide (Reichel et al. 2013). *Neospora caninum*, the responsible agent, is an obligate intracellular protozoan parasite belonging to the phylum Apicomplexa (Dubey & Schares 2011). The main clinical manifestation of bovine neosporosis is abortion, which is caused by the transplacental transmission of *N. caninum* to the fetus (Qian et al. 2017). Effective control methods that could prevent parasite spread are necessary. Vaccination is the most promising prophylactic measure for the prevention and control of infectious diseases. Analyses of different control strategies carried out so far indicate that vaccination as the most cost-effective approach to manage *N. caninum* infection (Reichel & Ellis 2006). Vaccination with attenuated *N. caninum* tachyzoites were able to protect mice and cattle against neosporosis (Williams et al. 2007, Bartley et al. 2008). Nevertheless, despite the effectiveness, vaccination with live attenuated strains has considerable drawbacks due to possible regression to a virulent status (Reichel & Ellis 2006) as well as shelf-life and logistical issues (Weber et al. 2013). A vaccine, based on lysated whole parasite, was evaluated and some studies observed mice protection from *N. caninum* infection or vertical transmission (Liddell et al. 1999, Ribeiro et al. 2009). However, other studies showed that this immunization technique conferred insufficient protection or even exacerbated the infection in murine model (Lundén et al. 2002, Teixeira et al. 2005) and failed to

prevent vertical transmission in cattle (Andrianarivo et al. 2000). The use of organelle proteins, such as micronemes, rhoptries, and dense granules, whose contents are involved in tachyzoite-host cell interactions (Weber et al. 2013), has been the great focus of recent *N. caninum* research (Debache et al. 2008, Tahmoorespoor et al. 2013). The potential vaccinal antigens are selected based on their immunogenic capacity, implications in the process of adhesion/invasion and their ability to protect against experimental challenge (Debache et al. 2009, Monney et al. 2011). Some recombinant *N. caninum* proteins have been tested as potential vaccinal candidates with promising although variable efficacy (Monney et al. 2012, Pastor-Fernández et al. 2015, Ferreira et al. 2014). The protein ROP2 of *N. caninum* is a rhoptry protein located in the apical complex and is present in all parasitic developmental stages, it actively participates in the invasion of the host cell and in formation of parasitophorous vacuoles (Dubremetz 2007, Talevich & Kannan 2013). Vaccines based on NcROP2 have shown promising results in challenge studies (Debache et al. 2008, Pastor-Fernández et al. 2015) when used in association with other proteins (Debache et al. 2009, 2010). Chimeras produced were able to protect mice against challenge, however, inducing an insufficient immune response against vertical transmission (Monney et al. 2011). In this study we aimed to clone and express a *N. caninum* rhoptry 2 to be used as an immunobiological tool for neosporosis control.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of recombinant proteins and structure perdition.

The nucleotide sequence of the NcROP2 gene used in the construction of the protein was based on the sequence deposited on GenBank under the number HM587954 (Monney et al. 2011). Specific primers were constructed for amplification of a part of the truncate NcROP2 nucleotide (tROP2) sequence referring to amino acids 172 to 340 and cloning into the pAE vector (Ramos et al. 2004). The PCR products were inserted into the restriction sites of the XhoI and EcoRI enzymes so that the frame allowed expression of the products with a 6-histidine tag (Fig.1). The cloning products were also sequenced (ACTGene Analysis). The *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Invitrogen) was used for expression of the recombinant proteins. Induction was performed with 1mM IPTG for 4 h at 37°C. Bacteria were recovered by centrifugation, sonicated, and eluted in 8M urea. Solubilized recombinant proteins were purified using the

ÄKTA Primer (GE Healthcare) system. Desalting of the samples was carried out in a Desalting 5mL HiTrap column (GE Healthcare), and concentration using dialysis membranes (cut-off 14 kDa, INLAB). Subsequently the proteins were analyzed using SDS-PAGE. The concentration of the purified protein was determined using the commercial BCA Protein Assay kit (GE Healthcare). Purified protein aliquots were stored at -70°C until use. I-TASSER software was used to generate the 3D predicted model from amino acid sequences (Roy et al. 2010).

**Western blot.** The purified proteins were subjected to SDS-PAGE and electro-transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membrane was incubated with blocking solution (PBS-T with 5% milk powder) for 1 h at 37°C. Afterwards, the membrane was cropped and each strip was incubated separately for 1 h at 37°C with one of the following primary antibodies: anti-histidine (1:5.000) or bovine serum positive for

neosporosis (1:400) previously confirmed by indirect immunofluorescence reaction (IFAT). They were then used at the same dilution (1:5.000), as secondary: anti-mouse and anti-bovine antibodies respectively. The reactions were revealed with a solution containing DAB (0.6mg diaminobenzidine, 0.03% nickel sulfate, 50mM Tris-HCl pH 8.0 and 15µl hydrogen peroxide). The *E. coli* BL21 (DE3), a non-transformed strain, was used as the negative control.

**Vaccination.** A total of 18 Balb/c isogenic female mice, 28 days old and weighing 16-21g, were randomly divided into two groups of 9 animals. Mice in Group 1 were inoculated with a vaccine formulated with 25µg of

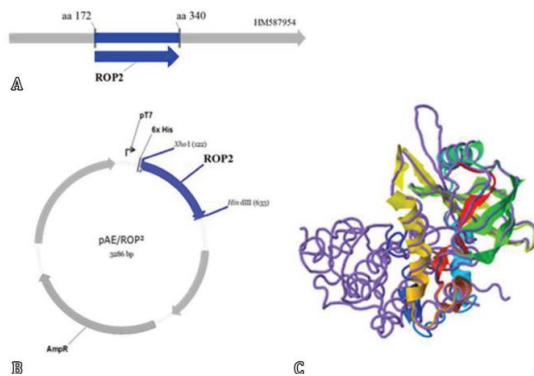


Fig.1. Silico analysis. (A) The amino acid sequences for Rop2 (168 amino acids) are indicated (blue line), (B) schematic representation of the pAE/ROP2 vector expression (from Vector NTI Advance 10), (C) 3D predicted model from amino acid sequences using I-TASSER software.

protein/dose adsorbed in 10% aluminum hydroxide [ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ; Sigma Aldrich] as adjuvant and Group 2 were inoculated with 0.9% saline solution plus 10% aluminum hydroxide. The mice were inoculated by intramuscular injection (0.2ml) on day 0 and received a booster on day 14 of the experiment. Blood samples were collected by the submandibular puncture on days 0, 7, 14, 28, 35, 42 and 60. After collection, serum was separated, labeled and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. All protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA No. 9651) of the “Universidade Federal de Pelotas” (UFPEL). The UFPEL-CEEA agreement is approved by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). Indirect enzyme-linked immunosorbent assays. Total serum IgG antibodies against rROP2 were quantified by carbonate-bicarbonate at pH an indirect enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) following Dummer et al. (2014), with modifications. Briefly, the plates (Polysorp Surface, Nunc, Sigma-Aldrich) were coated with 100µl of a suspension containing 0.1mg/ml-1 of rROP2, or a *Neospora caninum* tachyzoites ( $1 \times 10^6$ ) suspension lysed, both diluted in 9.6 at  $4^\circ\text{C}$  for 18 h.

The plates were washed three times with phosphate buffer solution at pH 7.6 (PBS) containing 0.5% Tween 20 (PBS-T). Sera diluted in PBS-T (1:100) were added to the wells in duplicate (100µl/well) and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min. The plates were then washed three times with PBS-T. Then, 50µl of peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Dakopatts A/S), or anti-mouse IgG1 or IgG2 isotype (Sigma-Aldrich), diluted 1:4,000 in PBS-T was added to each well, and the plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min. Immediately afterward, the plates were washed five times with PBS-T, and then 50µl of o-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) chromogenic substrate was added, and the mixture was allowed to react in the dark for 15 min at room temperature, then a 100µl stop solution (sulfuric acid 3%) was added. Absorbance readings were conducted using a microplate reader MR 700 (Dynatech Microplate Reader) at 492nm, and the results were expressed as the total IgG increase. To check if rROP2 is recognized by neosporosis positive serum, an ELISA was performed. Bovine sera were tested, 5 positive and 5 negatives for *N. caninum*, previously characterized by IFAT and provided by Embrapa beef cattle (Campo Grande, Brazil) diluted 1:200 in PBS-T. The secondary antibody peroxidase-conjugated antbovine IgG (Sigma-Aldrich) was diluted 1:5.000 in PBS-T. This assay was performed following protocol described above. To accurately assess the sensitivity and specificity of the diagnostic test, the results of 10 samples previously confirmed as positive and negative by IFAT, defined as the cut-off point, using the method previously described (Pare et al. 1995) were analyzed for Receiver Operating Characteristic (ROC) using the MedCalc software (version 16.4.3)<sup>4</sup>.

## RESULTS

PCR amplification of the NcROP2 gene partial sequence, yielded a fragment of the expected size (522 bp), encoding the expression cassette of 179 amino acids, including fusion with the 6xHis tag (Fig.1A and B). The sequence was cloned successfully and the transformation of the pAE/ROP2 vector in the *Escherichia coli* strain TOP10F resulted in several clones. Next, cloned vectors were sent to sequencing in order to confirm the insertion of the NcROP2 gene. The sequencing result was subjected to the BLAST tool (Zhang et al. 2000), revealing sequences identical to those reported (GenBank accession number: HM587954). The rROP2 protein structural model prediction, using I-TASSER software, has demonstrated that the recombinant structure has kept a similar conformation to the native protein (Fig.1C).

<sup>4</sup> Available at <<http://www.medcalc.org>>

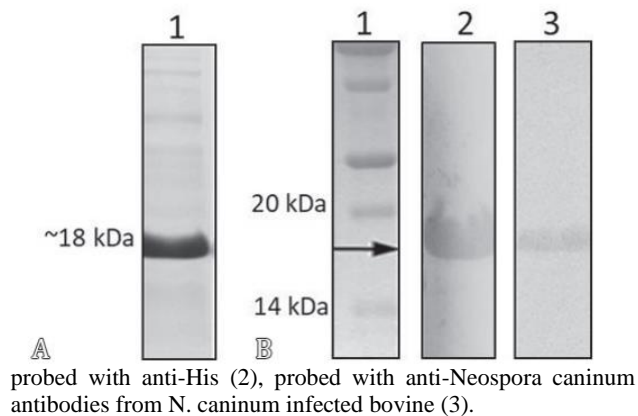


The ROP2 recombinant protein, expressed by *E. coli* BL21 (DE3) strain, was detected in insoluble form (Fig.2A). This expression process yielding  $\sim 125\mu\text{g/L}$  of culture. The rROP2 expression was confirmed by Western blot using a monoclonal anti-His antibody which recognized the recombinant protein, showing a band of 18kDa size and rROP2 protein was also detected by positive serum from *Neospora caninum* infected bovine (Fig.2B). Mice immunized with rROP2 adsorbed in 10% aluminum hydroxide presented anti-rROP2 antibodies ( $P < 0.05$ ) at 14 days post inoculation (PI). The boost induced a significant ( $P < 0.05$ ) increase of total IgG, being stable until the day 60 PI (Fig.3A). The rROP2 humoral response presented a significant higher ( $P < 0.05$ ) IgG1 production compared with IgG2a (Fig.3B). Sera from rROP2 immunized mice also recognized the native protein, ROP2, in the tachyzoite lysates, since 21 days post inoculation (Fig.3C). The ELISA showed that rROP2 protein was recognized by *N. caninum* positive sera and was not recognized by negative sera (Fig.4A), resulting in a specificity of 100% and a sensitivity of 100% (Fig.4B).

## DISCUSSION

In this study we select a *Neospora caninum* rhoptry 2 protein (ROP2) to be used as antigen to develop an experimental neosporosis vaccine. The amplification of the NcROP2 gene result in a fragment of 522pb, the same size was estimated in silico by Software Vector NTI® Advance 10, indicating that the expression occurred for the whole cassette. A small ROP2 protein *Escherichia coli* expressed portion (18kD), as described in this study methodology, did not compromise the main antigenic epitopes present in the native protein, since it was recognized by positive serum from *N. caninum* infected bovine (Fig.2B), thus confirming epitope prediction analysis (Monney et al. 2011).

Fig.2. Characterization of rROP2. (A) SDS-PAGE, purified rROP2 (1). (B) Western blot, molecular weight marker (1),



To induce specific and effective antibody production against a pathogen, recombinant vaccine antigens need to preserve epitopes with identity similar to the native protein. The loss of original conformation among *N. caninum* epitopes has been reported as a possible cause of low protection in murine challenge models (Srinivasan et al. 2007). The ROP2 recombinant protein was able to induce IgG specific to rROP2 which also recognized the native protein, ROP2, in the tachyzoite lysates (Fig.3C), confirming that the construct maintained epitopes similar to those of the native proteins in vaccinated mice. The rROP2 immunogenic potential agrees with the observed by Debache et al. (2008) using a rROP portion of 43kDa. Besides the reduction in the amino acid number of the protein expressed in this study, it has kept the high immunogenicity, in vaccinated mice, yielding high titers of antibodies until day 60 PI. The predominant of IgG1 response in the mouse is indicative of a Th2-like response. Aluminum hydroxide as adjuvant in the vaccine polarize to a Th2 response by inhibiting IL-12

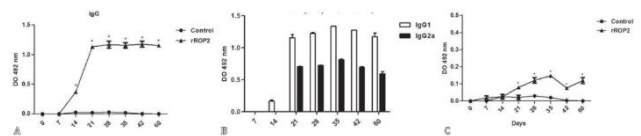


Fig.3. IgG dynamics. The data represent the mean ELISA values ( $\pm$  standard error) of total serum IgG from mice inoculated with rROP2. (A) Total IgG dynamic against rROP2. (B) IgG1 e IgG2a dynamics. (C) Total IgG dynamic against lysed *Neospora caninum* antigen. The statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. Asterisks (\*) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the mice inoculation with rROP2 (inoculated days 0 and 14) and the control groups ( $P < 0.001$ ) on days 14, 28, 35, 42 and 60.

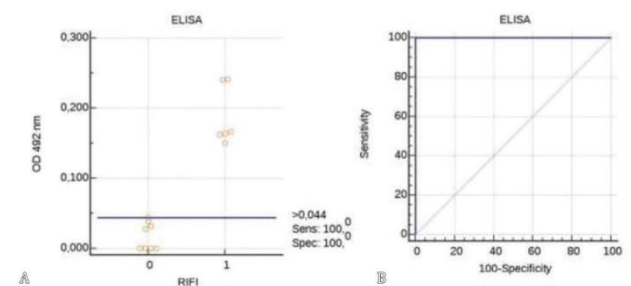


Fig.4. Receiver operating characteristic (ROC) of ELISA-rROP2 using 5 positive and 5 negative sera. (A) Distribution frequency of the absorbance results for positive (1) and negative (0) sera. The absorbance value (0.044) obtained in ELISA was established as the cutoff point. (B) ROC curve. Area under the curve = 1.000; 95% confidence interval between 0.768 and 1.000.

neosporosis diagnosis. The use of recombinant antigen can increase the specificity of the diagnostic test, when compared to commercial ELISA and IFAT, where crude antigen is present, and leads to decreases in specificity due to false positive results through cross-reactions with other Apicomplexa (Higa et al. 2000). The use of IFAT as a diagnostic standard test for *N. caninum* is both expensive and subjective, which limits its use in large-scale investigations (Dubey & Schares 2006, Borsuk et al. 2011). The availability of a serological test, using the rROP2 as antigen described here, could be of easy implementation, contributing to neosporosis epidemiological studies.

### CONCLUSIONS

The results obtained in this study demonstrate that the rROP2 fraction and the methodology used allows to obtain an optimum protein yield and a product with a similar conformation to native protein, being capable of high immunogenicity and antigenic. Our approaches were effective to express a truncated rROP2, suggesting that it is a promising antigen for use as an immunobiological, as a vaccine antigen, or for immunodiagnosis in the control of neosporosis. Acknowledgements.- We would also thank to “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) - Brazil - Finance Code 001 and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) for scholarships. Alceu G. Santos Junior and Neida Lucia Conrad contributed equally to this work.

**Conflict of Interest.-** The authors declare that they have no conflict of interest.

### REFERENCES

- Andrianarivo A.G., Rowe J.D., Barr B.C., Anderson M.L., Packham A.E., Sverlow K.W., Choromanski L., Loui C., Grace A. & Conrad P.A. 2000. A POLYGEN adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent fetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int. J. Parasitol.* 30(9):985-990. <[https://dx.doi.org/10.1016/s00207519\(00\)00088-6](https://dx.doi.org/10.1016/s00207519(00)00088-6)> <PMid:10980287>
- Bartley P.M., Wright S., Chianini F., Buxton D. & Innes E.A. 2008. Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. *Parasitology* 135(Pt 1):13-21. <<https://dx.doi.org/10.1017/S0031182007003526>> <PMid:17767798>
- Borsuk S., Andreotti R., Leite F.P.L., Pinto L. da S., Simionatto S., Hartleben C.P., Goetze M., Oshiro L.M., Matos M.F.C. & Berne M.E.A. 2011. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Vet. Parasitol.* 77(1/2):33-38. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.026>> <PMid:21168278>
- Cannas A., Naguleswaran A., Müller N., Gottstein B. & Hemphill A. 2003. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. *J. Parasitol.* 89(1):44-50. <[https://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0044:RCIONC\]2.0.CO;2](https://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0044:RCIONC]2.0.CO;2)> <PMid:12659301>
- Coffman R.L. 2010. Immunology. The origin of TH2 responses. *Science.* 328(5982):1116-1117. <<https://dx.doi.org/10.1126/science.1192009>> <PMid:20508120>
- Debache K., Alaeddine F., Guionaud C., Monney T., Müller J., Strohbush M., Leib S.L., Grandgirard D. & Hemphill A. 2009. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 39(12):1373-1384. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.006>> <PMid:19447110>
- Debache K., Guionaud C., Alaeddine F. & Hemphill A. 2010. Intraperitoneal and intra-nasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 137(2):229-240. <<https://dx.doi.org/10.1017/S0031182009991259>> <PMid:19835644>
- Debache K., Guionaud C., Alaeddine F., Mevissen M. & Hemphill A. 2008. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 38(12):1455-1463. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.001>> <PMid:18495126>
- Dubey J.P. & Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140(1/2):1-34. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.035>> <PMid:16730126>
- Dubey J.P. & Schares G. 2011. Neosporosis in animals - the last five years. *Vet. Parasitol.* 180(1/2):90-108. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>> <PMid:21704458>

- Dubremetz J.F. 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microbiol.* 9(4):841-848. <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x>> <PMid:17346309>
- Dummer L.A., Araujo I.L., Finger P.F., Santos Jr A.G., Rosa M.C., Conceição F.R., Fischer G., van Drunen Littel-van den Hurk S. & Leite F.P.L. 2014. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine* 32(21):2413–2419. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.011>> <PMid:24657716>
- Ferreirinha P., Dias J., Correia A., Perez-Cabezas B., Santos C., Teixeira L., Ribeiro A., Rocha A. & Vilanova M. 2014. Protective effect of intranasal immunization with *Neospora caninum* membrane antigens against murine neosporosis established through the gastrointestinal tract. *Immunology* 141(2):256-267. <<https://dx.doi.org/10.1111/imm.12191>> <PMid:24128071>
- Higa A.C., Machado R.Z., Tinucci-Costa M., Domingues L.M. & Malheiros E.B. 2000. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma Gondii* and *Neospora caninum* antigens in dog sera. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 9(2):91-95.
- Innes E. 2007. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134(Pt 13):1903-1910. <<https://dx.doi.org/10.1017/S0031182007000194>> <PMid:17958926>
- Liddell S., Jenkins M.C., Collica C.M. & Dubey J.P. 1999. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J. Parasitol.* 85(6):1072-1075. <PMid:10647039>
- Lundén A., Wright S., Allen J.E. & Buxton D. 2002. Immunization of mice against neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 32(7):867-876. <[https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00024-3](https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00024-3)> <PMid:12062558>
- Monney T., Debache K., Grandgirard D., Leib S.L. & Hemphill A. 2012. Vaccination with the recombinant chimeric antigen recNcMIC3-1-R induces a non-protective Th2-type immune response in the pregnant mouse model for *N. caninum* infection. *Vaccine* 30(46):6588-6594. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.024>> <PMid:22940381>
- Monney T., Rütli D., Schorer M., Debache K., Grandgirard D., Leib S.L. & Hemphill A. 2011. RecNcMIC3-1-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* 29(40):6967-6975. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.038>> <PMid:21787824>
- Mori A., Oleszycka E., Sharp F.A., Coleman M., Ozasa Y., Singh M., O'Hagan D.T., Tajber L., Corrigan O.I., McNeela E.A. & Lavelle E.C. 2012. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur. J. Immunol.* 42(10):2709-2719. <<https://dx.doi.org/10.1002/eji.201242372>> <PMid:22777876>
- Pare J., Hietala S.K. & Thurmond M.C. 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diag. Pesq. Vet. Bras.* 41:e06814, 2021. *Invest.* 7(3):352-359. <<https://dx.doi.org/10.1177/104063879500700310>> <PMid:7578451>
- Pastor-Fernández I., Arranz-Solís D., Regidor-Cerrillo J., Álvarez-García G., Hemphill A., García-Culebras A., Cuevas-Martín C. & Ortega-Mora L.M. 2015. A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. *Vet. Parasitol.* 207(3/4):203-215. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.009>> <PMid:25579396>
- Pinheiro A.F., Borsuk S., Berne M.E.A., Pinto L.S., Andreotti R., Roos T., Roloff B.C. & Leite F.P. 2013. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *Pathog. Glob. Health* 107(3):116-121. <<https://dx.doi.org/10.1179/204773213Y.0000000082>> <PMid:23683365>
- Qian W., Wang T., Yan W., Zhang M., Han L., Xue R., Song S. & Lv C. 2017. Seroprevalence and first multilocus microsatellite genotyping of *Neospora caninum* in dairy cattle in Henan, central China. *Vet. Parasitol.* 244:81-84. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.022>> <PMid:28917323>
- Ramos C.R.R., Abreu P.E., Nascimento L.T.O. & Ho P.L. 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(8):1103-1109. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004000800001>>
- Reichel M.P. & Ellis J.T. 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet. Parasitol.* 142(1/2):23-34. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.027>> <PMid:16893606>
- Reichel M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca M., Gondim L.F.P. & Ellis J.T. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43(2):133-142. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>> <PMid:23246675>

- Ribeiro D.P., Freitas M.M., Cardoso M.R., Pajuaba A.C., Silva N.M., Mineo T.W., Silva J.S., Mineo J.R. & Silva D.A. 2009. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. *Vaccine* 27(19):2570-2579. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.028>> <PMid:19428863>
- Roy A., Kucukural A. & Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protocols* 5(4):725-738. <<https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.5>> <PMid:20360767>
- Srinivasan S., Mueller J., Suana A. & Hemphill A. 2007. Vaccination with Microneme Protein NcMIC4 increases mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 93(5):1046-1055. <<https://dx.doi.org/10.1645/GE-1181R1.1>> <PMid:18163338>
- Tahmoorespoor M., Soltani M., Nassiri M., Sadrebazzaz A. & Ziaratnia S.M. 2013. Cloning, nucleotide sequencing and bioinformatics study of NcGRA7, an immunogen from *Neospora caninum*. *J. Cell Mol. Res.* 5(1):3-12. <<https://dx.doi.org/10.22067/jcmr.v5i1.13306>>
- Talevich E. & Kannan N. 2013. Structural and evolutionary adaptation of rhoptry kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. *BMC Evol. Biol.* 13:117. <<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-117>> <PMid:23742205>
- Teixeira L., Marques A., Meireles C.S., Seabra A.R., Rodrigues D., Madureira P., Faustino A.M.R., Silva C., Ribeiro A., Ferreira P., Correia da Costa J.M., Canada N. & Vilanova M. 2005. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. *Immunology* 116(1):38-52. <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02195.x>> <PMid:16108816>
- Weber F.H., Jackson J.A., Sobecki B., Choromanski L., Olsen M., Meinert T., Frank R., Reichel M.P. & Ellis J.T. 2013. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. *Clin. Vac. Immunol.* 20(1):99-105. <<https://dx.doi.org/10.1128/CVI.00225-12>> <PMid:23175289>
- Williams D.J., Guy C.S., Smith R.F., Ellis J., Björkman C., Reichel M.P. & Trees A.J. 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.* 75(3):1343-1348. <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00777-06>> <PMid:17145943>
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1/2):203-214. <<https://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>> <PMid:10890397>

## 4.2 Artigo 2

### **The Development of an Indirect ELISA Test Using the Recombinant Protein NcSRS2 to Detect anti-Neospora Caninum Antibodies in humans**

Alceu Gonçalves Dos Santos Junior, Ana Rita Coimbra Motta-Castro, Cristiane Camargo Sanches, Fábio Pereira Leivas Leite, Federal University Of Mato Grosso Do Sul, Leandra Marla Oshiro, Pâmella Oliveira Duarte, Renato Andreotti, Rodrigo Casquero Cunha

Publicado na Revista Science and Animal Health

# The Development of an Indirect ELISA Test Using the Recombinant Protein NcSRS2 to Detect anti-Neospora Caninum Antibodies in humans

AUTHORS: Alceu Gonçalves Dos Santos Junior, Ana Rita Coimbra Motta-Castro, Cristiane Camargo Sanches, Fábio Pereira Leivas Leite, Federal University Of Mato Grosso Do Sul, Leandra Marla Oshiro, Pâmella Oliveira Duarte, Renato Andreotti, Rodrigo Casquero Cunha

**Corresponding author:** Dr. Renato Andreotti – Embrapa Beef Cattle, Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brazil, Tel: 55 67 33682173; Email: renato.andreotti@embrapa.br

## Abstract

### Objective

The objective of this study was the development and standardization of an indirect serological test (ELISA) using the NcSRS2 recombinant protein for anti-Neospora caninum antibodies detection in human serum.

### Material and Methods

Blood samples were collected from HIV patients in reference centers in Campo Grande, MS, Mato Grosso do Sul (Brazil), during the period from November 2009 to June 2011. After collection the samples were centrifuged for serum obtainment and tested with ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) and IFAT (Indirect fluorescence antibody test) for anti-N. caninum IgG detection. The purified NcSRS2 recombinant protein was analyzed with Western blotting, using human serum samples that tested positive and negative for N. caninum.

### Results

209 human blood samples were analyzed with the NcSRS2 for ELISA standardization, being 49 positive and 160 negative, according to IFAT. The correlation between the two diagnostic methods was evaluated with the ROC analysis. Of the 160 negative IFAT samples, 8 were positive when ELISA was used. To confirm this result, Western blotting was used. The positive predictive value was of 91,3%, and the negative predictive value was of 100%. The sensibility value of the ELISA test was of 100%, and specificity value was of 90,5%. Conclusions Using the NcSRS2 recombinant protein, the sensibility and specificity were of 100% and 90%, respectively, when analyzed in conjunction with the IFAT test, which is currently considered the standard test. The Western blotting confirmed the positive reaction between the protein and serum samples. Therefore, the data suggests that ELISA is a promising method that may be used in the serological diagnosis and seroepidemiology of this parasite in humans considering that it can be done on a larger scale and with less subjectivity.

**Keywords:** Neospora caninum; ELISA; HIV; AIDS; Recombinant Protein

## Introduction

Neosporosis is a disease caused by the Neospora caninum protozoan, an intracellular parasite belonging to the same family of Toxoplasma gondii, being confused with it until 1988, when it was described and classified [1]. This parasite is responsible for bovine abortions and canine neuromuscular diseases [2]. It is present in many countries and there is a variety of intermediary hosts in its life cycle, including domestic and wild animals, being transmitted vertically or horizontally [3].

Analyzing the epidemiological data, mainly based on serological diagnosis, it is possible to affirm that this parasite is present worldwide [4]. The presence of specific antibodies in human serum means that the individual may have had exposition to the parasite [5]. According to MacCann et al. [6], individuals may be contaminated with N. caninum by the accidental ingestion of oocysts present in food, or also by ingesting poorly cooked or raw meat with oocysts.

After the experience of Barr et al. [7], where tachyzoites were inoculated in Rhesus female monkeys, non-human primates, and wounds similar to those caused by T. gondii transplacental infections appeared, research in human beings was initiated, such as the one performed by Tranas et al. [8], which confirmed anti-N. caninum antibody presence in humans in California. Afterwards, many studies have been made, such as the one by Lobato et al. [5] in immunocompromised patients, and Oshiro et al. [9] in HIV (Human Immunodeficiency Virus) patients, both indicating the possibility of an opportunistic infection. Ibrahim et al. [10] verified seropositivity in pregnant women in Egypt, who also suggested the similarity with T. gondii regarding the infection of healthy individuals, where mostly are asymptomatic.

The increase of N. caninum biology and epidemiology would not have been possible without the use of serological tests. There are various diagnosis methods, and within them the IFAT is considered the gold standard [11]. In addition, the ELISA presents an advantage in comparison to others: it allows the performance of a large scale test, its nonsubjectivity and the use of specific Ag recombinant [12].

With the identification of *N. caninum* antigens, the possibility of improving the specificity of serological tests using them increased [13]. One of these examples is the NcSRS2 recombinant protein, a surface antigen that is directly linked to the process of adhesion and invasion of the host cell. This protein was identified and isolated in infected animal serum [14]. Serological tests with the immunodominant protein such as the NcSRS2 increases the chances of repeatability, reproducibility and specificity if compared to a diagnostic system with various antigens, such as the surface antigens in IFAT. Based on the NcSRS2 surface protein, this study has the objective of standardizing an indirect serological assay to identify anti-*N. caninum* antibodies in human serum.

## Materials and Methods

### Blood samples

Blood samples were collected from HIV patients in reference centers in Campo Grande, MS, during the period of November 2009 to July 2011. The study was previously approved by the Human Research Ethics Committee (CEP) of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Opinion n. 1941/11). Each sample consisted of 10 mL of blood, collected from the cephalic vein and stored in tubes without anticoagulant, being identified by a healthcare professional. After collection, the samples were centrifuged to obtain the serum and stored at -20 °C until the performance of the serological test.

### Parasites

The *N. caninum* isolate Nc-1 1 was used to prepare the antigen for this study. The parasite was propagated in vero cells using Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. When 80% of the vero cells had been destroyed by *N. caninum* tachyzoites, then one layer was removed and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) solution, with centrifugation at 1,000 × g for 10 min.

### Indirect fluorescence antibody test (IFAT)

Serum samples were tested by IFAT for IgG anti-*N. caninum* detection. The cutoff point was considered to be 1:50 (PBS, pH 7. 2) for *N. caninum* [5]. The IFAT technique and the blades for IFAT were prepared according to Oshiro et al. [15] Bovine serum samples, knowingly positive or negative, were used as control in all blades. The anti-human IgG fluorescent conjugates were used with a dilution of 1:5,000 (conjugate with fluorescein isothiocyanate, Sigma-Aldrich). The blades were observed using a microscope equipped for fluorescence (epi-illumination system) with an objective of 40×. Only the fluorescent reactions around the entire periphery of the parasite were considered positive. Reactions were considered negative when the parasites on the blade did not present fluorescence, or

the fluorescence was located only on one end, what is characterized as "polar coloration" or "apical reaction". The samples with total tachyzoite peripheral fluorescence were considered positive [16].

### Recombinant NcSRS2

The protein NcSRS2 was expressed as described by Andreotti et al [17]. The amplified DNAs were cloned into pet100/DTPO vectors (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA), which were used to transform *Escherichia coli* TOP10 strains (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA). Once the correct orientation of the insert was confirmed, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA). *Escherichia coli* cells in the log phase were treated with 0.75 mM isopropyl- $\alpha$ -D-thiogalactoside (IPTG) for 4.5 hours at 30 °C to induce the expression of the used NcSRS2 recombinant protein [18]. The protein was purified using a nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) purification system (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA), and the recombinant protein was confirmed by molecular weight measurements using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. The protein was purified using a nickel-nitrilotriacetic acid (NiNTA) purification system (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA). After, the recombinant protein was confirmed by molecular weight measurements using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting.

### Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

ELISA 96-well plates (SPL, Life Sciences) were adsorbed for 12 hours at 4 °C with 33,5 ng well<sup>-1</sup> of rNcSRS2 proteins diluted in a suitable buffer (1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.8 M C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 4.0). After thawing, they were washed three times with PBS with 0.1% phosphate buffered saline/Tween (PBST) and blocked with 5% nonfat powder milk. Samples of serum, positive and negative (in duplicate), were diluted at 1:100 in PBST and incubated for 1 hour at 37 °C. The plates were then washed three times with PBST, and 100  $\mu$ L well of rabbit antihuman IgG antibody conjugated with peroxidase (Sigma Chemicals, EUA) diluted at 1:2,500 in PBST were added. The plates were incubated, as described previously, and, after 5 washes with PBST, o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma Chemicals, EUA) /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added as a chromogen substrate. The reaction was stopped by adding 2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the results were read at 490 nm on a Bioclin mindray MR – 96A ELISA reader.

### Western blotting

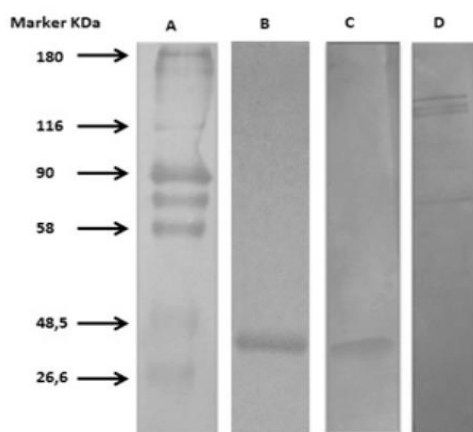
The purified NcSRS2 recombinant protein was homogenized with a SDS-PAGE gel buffer under reducing conditions. The samples were left at 95°C during 10 minutes and separated in SDS-PAGE 15%.

The separated proteins in gel were electro transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, UK). The membranes were blocked with PBS containing %5 of skim powdered milk (LD) during 30 minutes at room temperature and incubated with positive and negative human serum (1:1000 with PBS+LD), and left overnight at room temperature. Then, the nitrocellulose membrane was washed 3 times, during 5 minutes each, with PBST. After, the membrane was incubated with anti-IgG antibodies conjugated with peroxidase (Sigma Chemicals, EUA), diluted at 1:2,000 with PBS+LD at room temperature for 90 minutes. The reaction was revealed using 3,3'-tetrahydrochloride and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Statistical analysis To accurately assess the assay for diagnostic specificity, sensitivity, cutoff and predictive value, the results from the 209 human sera confirming positive and negative samples were subjected to receiver operating characteristic (ROC) analysis using the MedCalc statistical software version 10.3.0.0.

## Results

### IFAT, ELISA-NcSRS2 and Western blotting

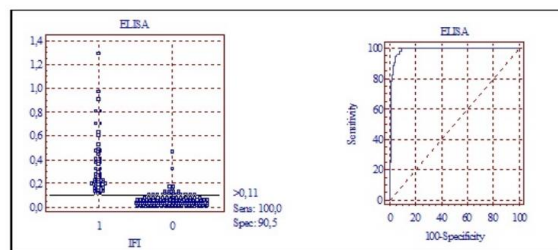
For the IFAT test blades with a parasite concentration of  $1.0 \times 10^6$  tachyzoites/mL were prepared. The produced NcSRS2 protein presented a 1.340 µg/mL yield, enough to standardize the ELISA and Western blotting tests. 209 human blood samples were analyzed for the ELISA test with the NcSRS2 recombinant protein standardization, being 49 positive and 160 negative, according to IFAT. To determine the best antigen, serum and conjugate dilution, plates with concentration curves were used to choose the best reading of the reaction with the substrate. The correlation between the two diagnosis methods was evaluated using ROC. Of the 160 negative IFAT samples, 8 were above the cutoff point of 0,11, being positive for the ELISA test. Of the 39 positive IFAT samples, only 2 were on the cutoff point for negative ELISA. To confirm these results, the Western blotting (Figure 1) with the protein and sera of positive and negative samples were used.



The *N. caninum* infection rate in patients with immunological problems, specifically the HIV positive ones, has been decreasing with the creation of new drugs, and their survival rate has been increasing [20].

**Figure 1.** (A) Molecular weight Standard Pre Blue stained Marker (SDS7B2 / Sigma®). (B) SDS-PAGE gel (15%) stained with Coomassie blue NcSRS2 containing the recombinant protein fragment with a 29KDa. (C) (pool of positive samples) Western blotting detecting anti-human IgG peroxidaseconjugated antibodies from human serum positive for *Neospora caninum*. (D) (negative sample) Western blotting using anti-human IgG peroxidase-conjugated antibodies from human serum negative for *Neospora caninum*. Human sera positive and negative to *Neospora caninum* used for Western blotting were previously tested by IFAT and ELISA tests.

The seroprevalence found was of 24.4% and the positive predictive value for this prevalence was of 91.3%, while the negative predictive value was of 100%. The sensibility value of the ELISA test was of 100%, while the specificity value was of 90.5%, according to Figure 2.



**Figure 2.** ROC analysis on the ELISA-NcSRS2 test using 51 confirmed positive and 158 confirmed negative human serum samples (as shown using the indirect fluorescence antibody test). (a) Frequency distribution of the confirmed positive (1) and confirmed negative (0) serum samples. The samples were considered positive when the cutoff values were greater than or equal to a mean ELISA absorbance value of 0.11. (b) ROC plot. Area under curve = 0.986; 95% confidence interval from 0.959 to 0.997.

## Discussion

The presence of anti-*N. caninum* antibodies in humans was firstly reported by the end of the XX century, in California, by Tranas et al. [8], presenting a 6.7% seropositivity in blood donors. In 2006, Lobato et al. [5], in addition to immunocompromised patients, also reported anti-*N. caninum* antibodies in newborns and healthy individuals, with a rate of 5% and 6%, respectively, suggesting an environmental contamination, and not an infection.

In 2009, Benetti et al. [19] reported a 10.5% seropositivity in rural workers located in rural properties with a high level of bovines positive for *N. caninum*. In Egypt, pregnant women sera were analyzed, with a positivity rate of 7.92%, being also reported a simultaneous infection of *T. gondii* and *N. caninum* in 5.94% of the samples [10]. Oshiro et al. [9] also reported the existence of this same co-infection in HIV positive patients, with a rate of 25.2%.

The sensibility and specificity were of 100% and 90%, respectively, when the data was compared with IFAT, which is considered the gold standard for parasites. Western blotting confirmed the positive reaction



Nonetheless, when the immunity decreases due to various factors, opportunistic infections may appear, having diverse causes, such as fungi, bacteria, viruses and protozoans, amongst others [21].

For some years, there have been reports of opportunistic infection cases in HIV patients, and some of these may have been caused by the *T. gondii* protozoan. There are also reports of infections by *N. caninum* [22] such as the one made by Lobato et al. [5], informing the presence of anti-*N. caninum* antibodies in immunocompromised patients. Oshiro et al. [9] also mentioned the presence of *N. caninum* positive sera in these patients, with a rate of 26.1%. This demonstrates the importance for these patients to, in addition to *T. gondii*, consider *N. caninum* as an opportunistic parasite.

The use of a diagnosis method that allow for large scale testing would increase the chance of possible quick parasite identification. Despite not being the gold standard for *N. caninum* identification, the ELISA would enable this agility [12]. With advanced technology and studies about the *N. caninum*, there have been more opportunities to develop more advanced diagnosis methods, be it for the discovery of a wide variety of antigens [13], or by the production of recombinant proteins.

As an example, it has been proved that the immunodominant surface protein NcSRS2 is present in the already identified isolates, at the moment of parasite-host interaction and in the sera of animals infected during the parasitaemia. In addition, the use of only one recombinant protein in the ELISA test would increase the test's specificity.

There have already been reports of indirect serological methods, particularly the ELISA, using this recombinant protein produced in baculovirus [14]. Andreotti et al. [17] and Borsuk et al. [12] have already produced the protein in *E. coli* for bovine and ovine serological diagnosis, respectively. In 2013, Pinheiro et al. [23] obtained the NcSRS2 protein from *Pichia pastoris* for the development of a serological diagnosis method for bovines in an endemic area in Rio Grande do Sul. Recently, in 2014, Sinnot et al. [24] developed a blocked ELISA test based on the NcSRS2, also for bovines, and in 2015, Pinheiro et al. [25] developed a test for ovine and dogs using the expression platform in *P. pastoris*.

In this study we used the recombinant protein NcSRS2 expressed in *E. coli* for the development of an indirect serological test (ELISA) for the detection of anti-*N. caninum* antibodies in humans.

between proteins and the positive serum samples. With these results, we can suggest that the use of ELISA to diagnose neosporosis in humans is a promising method, since it can be automatized, it is fast and it eliminates the IFAT subjectivity.

### Conflict of interest

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of CNPq, Capes, Embrapa and Fundect-MS.

### References

1. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1988, 192(9):1269-1285.
2. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 1996, 67:1-59.
3. Anderlini GA, Faria EB, da Silva AM, José Wilton Pinheiro Júnior, Rômulo Menna Barreto Valença et al. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em caprinos no estado de Alagoas, Brasil. *Vet Zootec.* 2011, 18(4): 583-590.
4. Dubey JP. A review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 2003, 41(4):1-16.
5. Lobato J, Silva DAO, Mineo TWP, Jodi DHF Amaral, Gesmar R. Silva Segundo et al. 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. *Clin Vaccine Immunol.* 2006, 13(1):84-89.
6. Catherine M McCann, Andrew J Vyse, Roland L Salmon, Daniel Thomas, Diana JL Williams et al. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans England. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14(6):978-980.
7. Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the non human primate. *Lab Invest.* 1994, 71(2):236-242.

8. Tranas J, Heinzen RA, Weiss LM, McAllister MM. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. Clin Diagn Lab Immunol. 1999, 6(5):765-767.
- 9.
10. Ibrahim HM, Huang P, Salem TA, Talaat RM, Nasr MI et al. Short report: prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. Am J Trop Med Hyg. 2009, 80(2):263-267.
11. Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol. 2006, 140(2):1-34.
12. Borsuk S, Andreotti R, Leite FP, Luciano da Silva Pinto, Simone Simionatto et al. Development of an indirect ELISANcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. Vet Parasitol. 2011, 177(1):33-38.
13. Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 1999, 29(8):1175-1188.
14. Nishikawa Y, Kousaka Y, Tragoolpua K, Xuenan Xuan, Levi Makala et al. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. J Clin Microbiol. 2001,39(11):3987-3991.
15. Oshiro LM, Matos MFC, Oliveira JM, Monteiro LARC, Andreotti R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Bras.Parasitol Vet. 2007, 16(3):133-138.
16. Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. J Vet Diagn Investig. 1995,7(3):352-359.
17. Andreotti R, Matos MFC, Gonçalves KN, Leandra Marla Oshiro, Manoel Sebastião da Costa Lima-Junior et al. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein Nc- SRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. Rev Bras Parasitol Vet. 2009,18(2):19-22.
18. Lima Junior MSC, Andreotti R, Caetano AR, Paiva F, Matos MFC. Cloning and expression of an antigenic domain of a major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. Rev Bras Parasitol Vet. 2007,16(2):61-66.
19. Ana Helena Benetti, Fábio Bernardo Schein, Thaís Rabelo dos Santos, Gilson Hélio Toniollo, Alvimar José da Costa et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. Rev Bras Parasitol Vet. 2009,18(1):29-33.
20. CCanini SRMS, Reis RB, Pereira LA, Gir E, Pelá NTR. Qualidade de vida de indivíduos com HIV/AIDS: uma revisão de literatura. Rev Latino-am Enferm. 2004,12(6):940-945.
21. Lazzarotto AR, Deresz LF, Sprinz E. HIV/AIDS e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática. Rev Bras Med Esporte. 2010,16(2):149-154.
22. Barratt JLN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. Clin Microbiol Rev. 2010,23(4):795-836.
23. Pinheiro AF, Borsuk S, Berne MEA, Luciano da Silva Pinto, Renato Andreotti et al. Expression of *Neospora caninum* Nc- SRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. Pathog Glob Health. 2013,107(3):116-121.
24. Sinnott FA, Monte LG, Collares TF, De Matos BM, Pacheco DB et al. Blocking ELISA Using Recombinant NcSRS2 Protein for Diagnosing Bovine Neosporosis. Curr Microbiol. 2015,70(3):429-432.2015,70(3):429-432.
25. Pinheiro AF, Borsuk S, Berne ME, Pinto Lda S, Andreotti R et al. Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. Rev Bras Parasitol Vet. 2015, 24(2): 148-154.148-154.148-154.

### 4.3 Artigo 3

#### **Avaliação de métodos para obtenção de proteínas recombinates**

SANTOS JUNIOR, Alceu Gonçalves dos<sup>1</sup>; PIRAINÉ, Renan Eugênio Araújo<sup>2</sup>;  
CUNHA, Rodrigo Casquero<sup>3</sup>; NIZOLI, Leandro Quintana<sup>4</sup>; ANDREOTTI, Renato<sup>5</sup>;  
LEITE, Fábio Pereira Leivas<sup>6</sup>

*<sup>1</sup>Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPEL; <sup>2</sup>Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFPEL; <sup>3</sup>Pós-Doc, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFPEL; <sup>4</sup>Professor, Doutor, Faculdade de Veterinária/UFPEL; <sup>5</sup>Doutor, Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Embrapa Gado de Corte; <sup>6</sup>Professor, Doutor, Curso de Biotecnologia/UFPEL.*

Publicado na Revista Jacobs Publishers

## Avaliação de métodos para obtenção de proteínas recombinantes

SANTOS JUNIOR, Alceu Gonçalves dos<sup>1</sup>; PIRAINÉ, Renan Eugênio Araújo<sup>2</sup>;  
CUNHA, Rodrigo Casquero<sup>3</sup>; NIZOLI, Leandro Quintana<sup>4</sup>; ANDREOTTI, Renato<sup>5</sup>;  
LEITE, Fábio Pereira Leivas<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPEL; <sup>2</sup>Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFPEL; <sup>3</sup>Pós-Doc, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFPEL; <sup>4</sup>Professor, Doutor, Faculdade de Veterinária/UFPEL; <sup>5</sup>Doutor, Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Embrapa Gado de Corte; <sup>6</sup>Professor, Doutor, Curso de Biotecnologia/UFPEL.

### RESUMO

A utilização de *Pichia pastoris* para a produção de proteínas recombinantes apresenta inúmeras vantagens que esse sistema agrega, destacando-se a exportação das moléculas para o meio extracelular. Isto permite que a obtenção das proteínas possa ser realizada por métodos de precipitação, com uso de sais neutros ou solventes orgânicos, sem trazer prejuízos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de sulfato de amônio, acetona e metanol para obtenção da proteína recombinante Bm86 do carrapato *Rhipicephalus microplus* expressa por *P. pastoris*. A ação provocada pelos solventes orgânicos ocasionou uma solubilidade parcial das proteínas. Na quantificação por densitometria da proteína rBm86-CG, verificou-se que utilizando acetona (1:2) foi obtido 30,3 mg/L, metanol (1:2) 60,5 mg/L e com sulfato de amônio a 70% (83,5 mg/L). A manutenção das características antigênicas após a precipitação foi verificada pela técnica de Western Blot, sendo que a proteína rBm86-CG obtida pelos três métodos foi reconhecida por anticorpos específicos. Os resultados sugerem que a precipitação com sais neutros e solventes orgânicos pode ser utilizada para obtenção de proteínas recombinantes como a rBm86-CG, sem trazer prejuízos a sua antigenicidade.

**Palavras-chave:** *Pichia pastoris*. Sais neutros. Solventes orgânicos. Antigenicidade.

### INTRODUÇÃO

O uso da levedura metilotrófica *Pichia pastoris* para a produção de proteínas recombinantes oferece uma série de vantagens sobre outros sistemas de expressão eucariótico, sistemas mais complexos, como em células de insetos e de mamíferos (CREGG et al., 2000). Entre as vantagens, destaca-se: capacidade de atingir rapidamente elevada densidade celular, possuir uma ampla variedade de vetores para manipulação genética, realizar a exportação de proteínas recombinantes para o meio extracelular e o fato de realizar modificações pós-traducionais (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A exportação de proteínas recombinantes para o meio extracelular faz com que *P. Pastoris* disponibilize de forma solúvel a proteína produzida, o que facilita a sua obtenção e permite o uso de alternativas na purificação (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A precipitação de proteínas é um dos métodos de purificação rotineiramente explorado, pois apresenta baixo custo, reduz o volume da amostra e possui fácil aplicabilidade (JAHIC et al., 2006). Além disso, tem a finalidade de clarificar as amostras, para em uma segunda etapa ser empregada em processos cromatográficos (DUONG-LY; GABELLI, 2014). A precipitação de proteínas tem sido estudada principalmente com o uso de sais neutros, tais como cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mais frequentemente usado é o sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (DOONAN, 2004). Os solventes orgânicos também podem ser empregados para precipitação e concentração de proteínas (GRODZKI; BERENSTEIN, 2010), tais como metanol, etanol, butanol e mais comumente utilizada é a acetona, na preparação de amostras de proteínas para a análise de proteômica, como espectrometria de massas (SIMPSON; BEYNON, 2010). Cada grupo possui um mecanismo de ação para precipitação das proteínas; os sais neutros promovem uma redução na concentração ideal de água superficial, levando à precipitação conhecida por “salting out” (DUONG-LY; GABELLI, 2014); enquanto que os solventes orgânicos, através de seus grupos polares, interagem com os grupos polares da proteína, presentes na superfície e região intramolecular de maneira a impedir a hidratação, resultando na redução da solubilidade e precipitação proteica (TSCHELIESSNIG et al., 2014).

O emprego da precipitação é uma alternativa na obtenção de proteínas recombinantes, seja com o uso de sais ou solventes orgânicos, permitindo a obtenção das proteínas de forma simplificada (JAHIC et al., 2006). Entretanto, é conveniente verificar se as propriedades antigênicas foram preservadas no final do processo (SIMPSON; BEYNON, 2010). O objetivo do presente estudo foi avaliar a obtenção da proteína recombinante Bm86 de *Rhipicephalus microplus* (rBm86-CG) expressa em *P. pastoris* utilizando o sal neutro sulfato de amônio e os solventes orgânicos, acetona e metanol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Expressão da proteína rBm86-CG

Para expressão de rBm86-CG em *P. pastoris* foi utilizada a metodologia descrita por Cunha et al. (2012). Para tal, clones resultantes da transformação por eletroporação da cepa GS115 Mut+ de *P. pastoris* contendo o plasmídeo pPic $\alpha$ A/Bm86-CG foram cultivados em meio Buffered Glycerol Complex Medium (BMGY - extrato de levedura 1%; peptona 2%; fosfato de potássio 100 mM; YNB 1,34%; biotina 4,10-5%; glicerol 1%; pH 6,0), por 24 h, em agitador orbital (150 rpm), a 30 °C. O cultivo com D. O. 600 nm 4 foi centrifugado a 3.300 x g, por 5 minutos. O pellet de células obtido foi suspenso em meio Buffered Methanol Complex Medium (BMMY - extrato de levedura 1%; peptona 2%; fosfato de potássio 100 mM; YNB 1,34%; biotina 4,10-5%; metanol 0,5%; pH 6,0), e mantido a 30 °C, sob agitação. Posteriormente, o cultivo obtido foi induzido com metanol 1%, a cada 24 horas. Após 96 horas, o cultivo foi centrifugado a 3.300 x g por 5 minutos e o sobrenadante separado, adicionado de 100 mM de Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF - Sigma-Aldrich) e mantido a -20 °C, até a sua utilização.

Alíquotas de 10 mL do sobrenadante receberam a adição de acetona e metanol (Vetec), nas proporções 1:1, 1:2 e 1:3 (sobrenadante/solvente), respectivamente, e sulfato de amônio (Symth), nas concentrações de 25%, 35%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% e 80%, conforme relatado por Englard e Sam (1990). Após, os sobrenadantes foram incubados à 4 °C por 3 h e centrifugados a 8.000 x g, por 5 minutos. Os precipitados foram solubilizados em 1 mL de solução a 50 mM de Tris-HCl pH 7,0, contendo 100 mM de PMSF, e armazenados a -20 °C até a sua análise.

### Quantificação da proteína rBm86-CG

Os precipitados obtidos a partir do cultivo foram suspensos em tampão de amostra (glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), aquecidos a 50 °C por 8 minutos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7,5%, a 100 V por 90 minutos. O gel obtido foi corado com Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad). As imagens foram analisadas e quantificadas por densitometria, com auxílio do software TotalLab 2.0 (Amersham/Biosciences).

### Western Blot

As frações que obtiveram maior concentração da proteína rBm86-CG foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose Hybond<sup>TM</sup> ECL (GE Healthcare). Após o bloqueio (PBS-T, 5% leite em pó desnatado), a membrana foi lavada em solução PBS-T e incubada por 1 h, a 37 °C, com um pool de soros bovinos vacinados com vacina comercial contendo a proteína rBm86 (1:400). Foi realizada nova lavagem em PBS-T e o anticorpo secundário anti-bovino (1:5000, conjugado com horseradish peroxidase, HRP, Sigma-Aldrich) foi adicionado, incubando-se por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada com solução contendo 3,3'- Diaminobenzidina (0,6 mg 3,3'- Diaminobenzidina (DAB) - Sigma-Aldrich; sulfato de níquel 0,03%, tris-HCl 50 mM pH 8,0 - Synth; peróxido de hidrogênio 30 v/v - Synth).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Precipitação

O sobrenadante contendo a proteína rBm86-CG, ao ser adicionado com os solventes orgânicos (acetona e metanol), apresentou uma reação instantânea de precipitação. Ao aumentar a proporção do solvente em relação ao sobrenadante, ocorreu o aumento do precipitado (Figura 1).

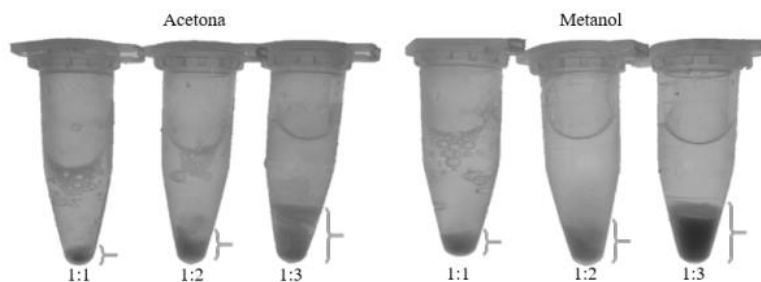


Figura 1 - Precipitações de rBm86-CG por acetona e metanol. A figura mostra os precipitados nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 do sobrenadante/solvente.

Na Figura 1 é possível visualizar que tanto a acetona quanto o metanol formaram um precipitado insolúvel em todas as frações. Observou-se que, com o aumento da concentração no gradiente agente precipitante/proteína, houve uma maior precipitação de proteínas. Com o uso de tampão 50 mM Tris-HCl para solubilização das proteínas, foi evidenciado que as amostras precipitadas com acetona e metanol foram solubilizadas parcialmente, permanecendo uma porção insolúvel (Figura 1). As proteínas solubilizadas em Tris-HCl (50 mM) e precipitadas, podem ser visualizadas na Figura 2. Identificou-se que na fração 1:2 o metanol apresentou uma obtenção superior a acetona, cerca de 60,5 mg/L de proteína solúvel, enquanto que a acetona obteve 30,3 mg/L, quando quantificado por densitometria pelo software TotalLab 2.0.

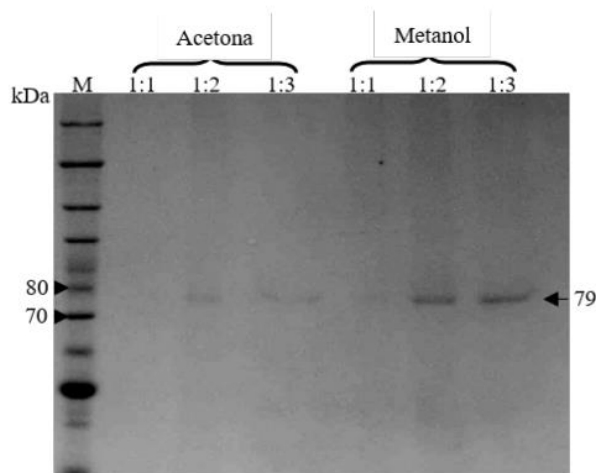


Figura 2 - SDS-PAGE 15% para análise da obtenção da proteína rBm86-CG (79 kDa) precipitada por acetona e metanol. M - BenchMark™ Protein Ladder standard; precipitações com acetona e metanol na proporção de sobrenadante/solvente.

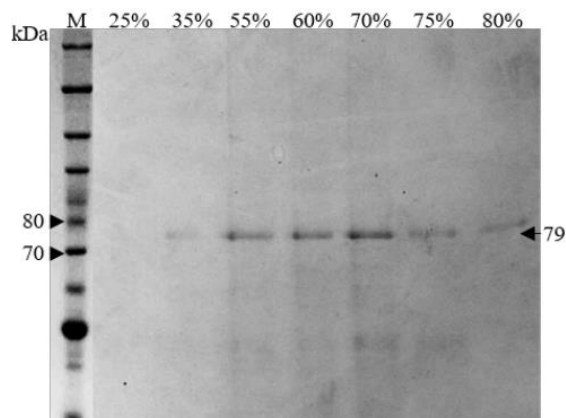


Figura 3 - SDS-PAGE 15% para análise da obtenção da proteína rBm86-CG (79 kDa) precipitada com sulfato de amônio. M - BenchMark™ Protein Ladder standard; gradiente de precipitação (p/v) de 25 a 80%.

A rBm86-CG precipitada por sulfato de amônio foi completamente solubilizada no tampão Tris-HCl, na Figura 3 é possível identificar a obtenção da rBm86-CG a partir da concentração 35% até 80%. Na quantificação do gradiente de precipitação de rBm86-CG utilizando sulfato de amônio, através do software TotalLab 2.0, observou-se que a fração 70% evidenciou a melhor obtenção, cerca de 83,5 mg/L da proteína.

### Western Blot

No Western Blot, os anticorpos de bovinos produzidos a partir da inoculação de uma vacina comercial contendo Bm86 reconheceram a rBm86-CG obtida das precipitações. Utilizando a concentração de 5 µg de cada precipitação, observou-se que aquelas produzidas pelos solventes apresentaram uma reação de menor intensidade em comparação ao sulfato de amônio, como pode ser observado na Figura 4.

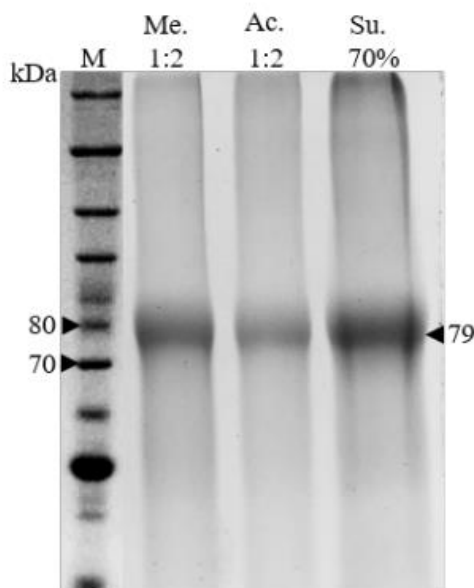


Figura 4 - Western Blot da reatividade de rBm86-CG (79 kDa) com anticorpos de bovinos, após obtenção das precipitações. M - BenchMark™ Protein Ladder standard; Me. – obtenção com metanol (1:2); Ac. – obtenção com acetona (1:2); Su. – obtenção com sulfato de amônio (70%).

A busca por métodos de obtenção de proteínas secretadas no sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* tem auxiliado na otimização de produção e etapas de purificação (JAHIC et al., 2006). O sulfato de amônio tem sido empregado como primeira escolha na obtenção de proteínas recombinantes expressas por *P. pastoris*, e os resultados têm demonstrado que sua utilização na concentração entre 70-80% tem permitido a maior obtenção de proteínas em diferentes estudos (DUMMER et al., 2009; HARTWIG et al., 2010; NIZOLI et al., 2009). Raramente são reportados estudos que envolvem a análise do rendimento utilizando outros métodos de precipitação para mesma proteína (WERTEN et al., 2001).

A obtenção de rBm86-CG testando outros métodos de precipitação complementa estudos anteriores (CUNHA et al., 2012) e possibilita a investigação dos diferentes agentes de precipitação e seu rendimento na obtenção de proteínas recombinantes. Entre os métodos de obtenção de proteínas, observou-se que ao utilizar solventes orgânicos e/ou sais neutros, encontramos resultados diferentes na obtenção de rBm86-CG. O gradiente de precipitação utilizando sulfato de amônio permitiu a separação de frações contendo impurezas, como descrito por Duong-Ly e Gabelli (2014), e obtenção do melhor rendimento na obtenção de rBm86-CG (83,5 mg/L) com 70% de sulfato de amônio. Os resultados apresentados são semelhantes aos obtidos por Mohammed et al. (2017), que ao utilizarem o sulfato de amônio em gradiente, conseguiram remover grande parte das impurezas nas primeiras frações e obter, em seguida, frações com alta pureza.

A obtenção da rBm86-CG obtida neste estudo, utilizando o sulfato de amônio (70%) foi 25% superior ao reportado por Cunha et al. (2012), que utilizaram o metanol, sugerindo que o uso do sulfato de amônio é uma alternativa a ser considerada na obtenção da rBm86-CG. O rendimento superior obtido pela precipitação com sulfato de amônio pode ser explicado pela solubilização parcial das proteínas precipitadas com os solventes orgânicos (Figura 1). Esta observação sugere que a reação intramolecular promovida pela acetona e metanol tenha provocado alterações na proteína, dificultando a sua solubilidade (TSCHELIESSNIG et al., 2014). Werten et al. (1999) reportaram o uso de gradiente em precipitações com acetona para remover proteínas mais instáveis, e obter a proteína com maior pureza em concentrações superiores, como 80% v/v, sem problemas de solubilidade.

Entretanto, a ação causada pela acetona pode ter comprometido a solubilidade de rBm86-CG, além disso é possível que outras proteínas mais instáveis tenham sido precipitadas em conjunto, o que dificulta a solubilização (WERTEN et al., 1999). Isto poderia explicar a baixa solubilidade da rBm86-CG precipitada por acetona, resultando na menor obtenção, 30,3 mg/L neste estudo.

O emprego do metanol na precipitação, geralmente é utilizado em estudos de farmacocinética, como por exemplo, na precipitação experimental de saponina entre componentes plasmáticos (WANG et al., 2015). Sendo também amplamente utilizado para precipitação de proteínas presentes no plasma sanguíneo de animais e humanos (SUN et al., 2016). Entretanto, neste estudo a ação causada na precipitação por metanol trouxe perda da solubilidade de rBm86-CG (Figura 1). A obtenção da proteína utilizando metanol (60,5 mg/L) é semelhante a alcançada por Cunha et al. (2012), de 62,5 mg/L. Evidencia-se que a obtenção das precipitações por solventes orgânicos teve uma solubilização parcial de rBm86-CG.

Uma tentativa para aumentar a solubilização dos precipitados seria a utilização de um tampão contendo a alta molaridade de um agente desnaturante, como a ureia, a qual poderia favorecer a solubilização (BURGESS, 2009). Entretanto, isso incluiria também posteriores etapas de dessalinização, o que tornaria esta metodologia mais dispendiosa e de pouca usabilidade, além disso, toda vantagem de obtenção da proteína solúvel estaria sendo deixada de lado (CREGG et al., 2000).

A utilização de solventes orgânicos na precipitação de proteínas recombinantes exige cautela (DOONAN, 2004). A interação promovida por solventes orgânicos pode provocar uma reação irreversível na proteína precipitada, não sendo mais possível sua solubilização, havendo dessa forma prejuízos em sua utilização e sua função (TSCHELIESSNIG et al., 2014). Demonstrou-se que apesar da solubilidade parcial de rBm86-CG precipitada com solventes orgânicos, a proteína recuperada foi capaz de ser reconhecida por anticorpos específicos, sugerindo que manteve regiões antigênicas comuns preservadas (Figura 4). A rBm86-CG recuperada com sulfato de amônio foi eficientemente solubilizada no tampão Tris HCl 50 mM (Figura 3) e também foi reconhecida por anticorpos específicos. Wang et al. (2013) destacaram a importância da utilização de sulfato de amônio, uma vez que a instabilidade e precipitação promovida pelo sal geralmente traz menores riscos à perda das propriedades proteicas.

Neste sentido, cabe salientar que a reação de anticorpos bovinos específicos evidenciou uma maior reatividade à rBm86-CG obtida com sulfato de amônio em comparação a acetona e metanol. Além disso, a precipitação por sulfato de amônio permite que a amostra seja concentrada e submetida à purificação por cromatografia sem prejuízos a sua imunogenicidade (JEONG et al., 2016; KWON, 2012; LI et al., 2015; MA, 2013). O uso de diferentes métodos de precipitação é uma importante ferramenta que pode otimizar processos e minimizar custos de produção, entretanto é importante que os mesmos sejam avaliados para cada proteína separadamente, investigando se suas propriedades de interesse foram preservadas.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que os processos de precipitação com sais neutros e solventes orgânicos realizados permitiram a obtenção da rBm86-CG, preservando sua antigenicidade, sendo o sulfato de amônio o mais eficiente na obtenção e solubilização da proteína, obtendo cerca 83,5 mg/L. Esses resultados encorajam estudos semelhantes com outras moléculas de importância industrial, com o objetivo de diminuir custos e tornar mais simples o processo e a purificação.

## EVALUATION OF METHODS FOR OBTAINING RECOMBINANT PROTEINS

### ABSTRACT

The use of *Pichia pastoris* for the production of recombinant proteins presents numerous advantages, especially the export of the molecules to the extracellular medium. This allows the protein to be obtained by precipitation methods, with the use of neutral salts or organic solvents, without detriment. The objective of this work was to evaluate the use of ammonium sulfate, acetone and methanol to obtain the recombinant Bm86 protein of the *Rhipicephalus microplus* tick expressed by *P. pastoris*. The action of the organic solvents caused a partial solubility of the proteins. In the quantification, by densitometry, of the rBm86-CG protein, it was found that using acetone (1:2) it was obtained 30.3 mg/L, methanol (1:2) 60.5 mg/L and ammonium sulfate 70% (83.5 mg/L). The maintenance of the antigenic characteristics after the precipitation was verified by the Western Blot technique, and the rBm86-CG protein obtained by the three methods was recognized by specific antibodies. The results suggest that the precipitation with neutral salts and organic solvents can be used to obtain recombinant proteins such as rBm86-CG, without impairing its antigenicity.

**Keywords:** *Pichia pastoris*. Neutral salts. Organic solvents. Antigenicity.



## EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

### RESUMEN

A utilización de *Pichia pastoris* para la producción de proteínas recombinantes presenta innumerables ventajas que ese sistema agrega, destacándose la exportación de las moléculas hacia el medio extracelular. Esto permite que la obtención de las proteínas pueda ser realizada por métodos de precipitación, con uso de sales neutras o solventes orgánicos, sin traer perjuicios. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización de sulfato de amonio, acetona y metanol para obtener la proteína recombinante Bm86 de la garrapata *Rhipicephalus microplus* expresada por *P. pastoris*. La acción provocada por los disolventes orgánicos ocasionó una solubilidad parcial de las proteínas. En la cuantificación por densitometría de la proteína rBm86-CG, se verificó que utilizando acetona (1:2) se obtuvo 30,3 mg/L, metanol (1:2) 60,5 mg/L y con sulfato de amonio al 70% (83,5 mg/L). El mantenimiento de las características antigénicas después de la precipitación fue verificado por la técnica de Western Blot, siendo que la proteína rBm86-CG obtenida por los tres métodos fue reconocida por anticuerpos específicos. Los resultados sugieren que la precipitación con sales neutras y disolventes orgánicos puede ser utilizadas para la obtención de proteínas recombinantes como la rBm86-CG, sin traer perjuicios a su antigenicidad.

**Palabras clave:** *Pichia pastoris*. Sales neutras. Solventes orgánicos. Antigenicidad.

### REFERÊNCIAS

- BURGESS, R. R. Chapter 17 refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in Enzymology*, v. 463, p. 259–282, 2009.
- CUNHA, R. C.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; LEITE, F. P. L.; et al. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 254–262, 2012.
- DOONAN, S. Bulk purification by fractional precipitation. *Methods in molecular biology*, v. 244, p. 117–24, 2004.
- DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*, v. 161, n. 1, p. 84–90, 2009.
- DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, v. 541, p. 85–94, 2014. ENGLARD, S.; SAM, S. Precipitation techniques. *Methods in Enzymology*, v. 182, p. 285–300, 1990.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.
- GRODZKI, A. C.; BERENSTEIN, E. Immunocytochemical methods and protocols. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 588, p. 1689-1699, 2010.
- HARTWIG, D. D.; OLIVEIRA, T. L.; SEIXAS, F. K.; et al. A High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*, v. 9, n. 1, p. 98, 2010.
- JAHIC, M.; VEIDE, A.; CHAROENRAT, T.; et al. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, v. 22, n. 6, p. 1465– 1473, 2006.
- JEONG, K. Y.; YI, M.; SON, M.; et al. IgE reactivity of recombinant pacc3 from the asian needle ant (*Pachycondyla chinensis*). *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 169, n. 2, p. 93–100, 2016.
- KWON, W. T. Protective immunity of *Pichia pastoris* expressed recombinant envelope protein of japanese encephalitis virus. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 11, p. 1580–1587, 2012.

- LI, J.; ZHU, W.; LUO, M.; et al. Molecular cloning, expression and purification of lactoferrin from tibetan sheep mammary gland using a yeast expression system. *Protein Expression and Purification*, v. 109, p. 35–39, 2015.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.
- MA, J. Expression, purification and characterization of a recombinant Tat47-57-Oct4 fusion protein in *Pichia pastoris*. *Molecular Medicine Reports*, v. 9, n. 2, p. 471–475, 2013.
- MOHAMMED, S. A.; EISSA, M. S.; AHMED, H. M. Simple protein precipitation extraction technique followed by validated chromatographic method for linezolid analysis in real human plasma samples to study its pharmacokinetics. *Journal of Chromatography. B*, v. 1043, p. 235-240, 2017.
- NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; et al. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 2, p. 1–4, 2009.
- SIMPSON, D. M.; BEYNON, R. J. Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. *Journal of Proteome Research*, v. 9, p. 444–450, 2010.
- SUN, Y.; XUE, J.; LI, B.; et al. Simultaneous quantification of triterpenoid saponins in rat plasma by UHPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral total saponin of *Aralia elata* leaves. *Journal of Separation Science*, v. 39, p. 4360–4368, 2016.
- TSCHELIESSNIG, A.; SATZER, P.; HAMMERSCHMIDT, N.; et al. Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. *Journal of Biotechnology*, v. 188, p. 17–28, 2014.
- WANG, F.; LI, X.; MO, X.; et al. A biologically active vMIP-II-IgG3-TfN fusion protein, secreted from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 87, n. 1, p. 47–54, 2013.
- WANG, Z.; WU, Q.; MENG, Y.; et al. Determination and pharmacokinetic study of two triterpenoid saponins in rat plasma after oral administration of the extract of *Aralia elata* leaves by UHPLC–ESI–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 985, p. 164–171, 2015.
- WERTEN, M. W. T.; VAN DEN BOSCH, T. J.; WIND, R. D.; et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, v. 15, n. 11, p. 1087–1096, 1999.
- WERTEN, M. W. T.; WISSELINK, W. H.; JANSEN-VAN DEN BOSCH, T. J.; et al. Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*. *Protein Engineering Design and Selection*, v. 14, n. 6, p. 447–454, 2001.

## 5 Patente

### 5.1 Título

SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICA, PROTEÍNA RECOMBINANTE ROP2 DE *Neospora caninum* E USO COMO VACINA CONTRA NEOSPOROSE.

### 5.2 Resumo

A presente invenção refere-se ao processo de preparação e utilização de uma vacina recombinante contra a Neosporose, causada pelo protozoário *N. caninum*. Devido falta de vacinas comerciais atualmente disponíveis contra a Neosporose, a presente invenção descreve o processo de preparação e utilização de uma vacina de subunidade baseado na tecnologia do DNA recombinante, cuja formulação contenha o antígeno rROP2, sendo este um fragmento de 18kDa da roptria 2, pertencente à família Quinases. A proteína rROP2 foi produzida em *Escherichia coli*, caracterizada e avaliada como vacina ou componente de formulações vacinais em camundongos e bovinos naturalmente infectados por *N. caninum* em propriedades com bovinos de corte e leiteiros de produção extensiva intensiva. O antígeno vacinal rROP2 induziu um aumento significativo na resposta imune celular e humoral em camundongos e bovinos. A presente invenção se mostra eficaz para a utilização como vacina ou componente de formulações vacinais no controle e prevenção da Neosporose.

### 5.3 Reivindicações

1. Sequência de DNA sintética proteína Roptria 2 (ROP2) de *Neospora caninum*, caracterizada por conter códons otimizados para expressão, em *Escherichia coli*, descrita na SEQ ID Nº 1.
2. Proteína recombinante rROP2, caracterizada por compreender sequência de aminoácido descrita na SEQ ID Nº 2.
3. Uso da proteína recombinante rROP2, conforme definida na reivindicação 2, caracterizada por uma vacina de subunidade recombinante constituída de uma

quantidade de 5-400 µg por dose vacinal, administrada por via intramuscular e subcutânea.

4. Uso da proteína rROP2, conforme na reivindicação 2 e 3, caracterizada por ser emulsificada em adjuvante e Hidróxido de Alumínio ou Óleo mineral.
5. Uso de rROP2 como antígeno vacinal, conforme reivindicações 2, 3 e 4, caracterizado por estimular a produção de anticorpos em mamíferos.
6. Uso de rROP2 em formulações vacinais, conforme reivindicações 2, 3, 4, e 5, caracterizado por ser co-administrada com outras moléculas recombinantes.
7. Método diagnóstico para Neosporose, conforme reivindicação 2, caracterizado por utilizar 5-300 µg de proteína em técnicas de imunodiagnóstico, e produção de anticorpos monoclonais.

## 6 Considerações Finais

- As proteínas rNcROP2 e rLTB/NcROP2 foram expressas em corpos de inclusão;
- As proteínas rNcROP2 e rLTB/NcROP2 foram expressas em *E. coli*; apresentando rendimento de 125 mg/L e 25 mg/L, respectivamente;
- As duas proteínas construída apresentaram antigenicidade, sendo reconhecidas por anticorpos presente em soro de bovinos naturalmente infectados;
- Camundongos vacinados com rNcROP2 e rLTB/NcROP2 produziram anticorpos contra a proteína que reagiram em ELISA indireto;
- As proteínas rNcROP2 e rLTB/NcROP2 produzidas neste trabalho apresentaram potente imunogenicidade, imunomodulação Th2/Th17, sugerindo serem promissores antígenos a compor vacinas de subunidade contra a neosporose.

## Referências

- 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.
- ALIBOLANDI, M.; MIRZAHOSEINI, H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. **Biochemistry Research International**, v. 2011, p. 1-6, 2011.
- ALVAREZ-GARCÍA, G.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D. A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. **Research Veterinary Science**, v. 148, p. 303-309, 2013.
- ALVAREZ-GARCÍA, G.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D.; NAVARRO-LOZANO, V.; PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ORTEGA-MORA, L. M. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 85-95, 2013.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVE, 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 American Veterinary Medicine Association**, v. 218, p. 1803-1806, 2001.
- BASU, A.; LI, X.; LEONG, S. S. J. Refolding of proteins from inclusion bodies: Rational design and recipes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, p. 241-251, 2011.
- BASZLER, T. V.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Immunization of BALB/c mice with Killed *Neospora caninum* Tachyzoite Antigen Induces a Type 2 Immune Response and Exacerbates Encephalitis and Neurological Disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 7, p. 893-898, 2000.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271-274, 1984. BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, p. 11-25, 2001.
- BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P.; DA SILVA PINTO, L.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. D.; BERNE, M. E. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 33-38, 2011.
- BURGESS, R. R. Chapter 17 Refolding solubilized inclusion body proteins. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 259-282, 2009.
- CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal Biotechnology**, v. 96, p. 3-12, 2002.

CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. **FEBS Letters**, v. 489, p. 29-33, 2001.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1102-1107, 2012.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 5734-5743, 2006.

CONNELL, T. D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by Type I and Type II heat-labile enterotoxins. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, p. 821-834, 2007.

DA HORA V. P.; CONCEIÇÃO F. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; DOOLAN, D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v. 29, p. 1538-1544, 2011.

DE BERNARDEZ, C. E. Refolding of recombinant proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 157-163, 1998.

DEBACHE, K.; ALAEDDINE, F.; GUIONAUD, C.; MONNEY, T.; MÜLLER, 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.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; HEMPHILL, A. Intraperitoneal and intra-nasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology**, v. 137, p. 229, 2010.

DEBACHE, K.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; MEVISSSEN, M.; HEMPHILL, A. 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.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology**, v. 4, p. 216-238, 2015.

DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; PARK, E. Y. Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. **BMC Biotechnology**, v. 12, p. 19, 2012.

DUBEY J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 4, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006.

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, p. 1269-1285, 1988.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1-34, 2006.

DUBREMETZ, J. F.; GARCIA-RÉGUET, N.; CONSEIL, V.; FOURMAUX, M. N. Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1007-1013, 1998.

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

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expression and Purification**, v.37, p. 203-206, 2004.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, p. 836-839, 1985.

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

FERREIRINHA, P.; CORREIA, A.; TEIXEIRA-COELHO, M.; OSÓRIO, H.; TEIXEIRA, L.; ROCHA, A. Mucosal immunization confers long term protection against intragastrically established *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v. 34, p. 6520-6258, 2016.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; MORAES, C. M.; FERREIRA, L. N.; VILELA, C. O.; CAETANO, C. F.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; VIDOR, T.; ROEHE, P. M. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 489–495, 2010.

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 and Immunopathology**, v. 144, p. 423-429, 2011.



GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KÜHN, R.; MÜLLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 798-805, 1996.

GIL, L. F.; DA CUNHA, C. E. P.; MOREIRA, G. M. S. G.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R.; LOBATO, F. C. F.; MENDONÇA, M.; DELLAGOSTIN, O. A.; CONCEIÇÃO, F. R. Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against *Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D. **PLoS One**, v. 8, p. 1–10, 2013.

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

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.

GU, J.; GAO, X.; PAN, X.; PENG, X.; LI, Y.; LI, M. High-level expression and one-step purification of a soluble recombinant human interleukin-37b in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 108, p. 18-22, 2015.

HECKER, Y. P.; CANTÓN, G.; REGIDOR-CERRILLO, J.; CHIANINI, F.; MORRELL, E.; LISCHINSKY, L.; ORTEGA-MORA, L. M.; INNES, E. A.; ODEÓN, A.; CAMPERO, C. M.; MOORE, D. P. Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 214, p. 247-54, 2015.

HEMPHILL, A.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; MÜLLER, J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**, v. 143, p. 245-59, 2016.

HEMPHILL, A.; MÜLLER, J. Vaccines and drugs against *Neospora caninum*, an important apicomplexan causing abortion in cattle and other farm animals. **Reports in Parasitology**, v. 4, p. 31-41, 2015.

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

HIGA, A. C.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation of Cross-Reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Antigens in Dogs Sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, p. 91-95, 2000.

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

5322-5328, 1998.

HUANG, P.; LIAO, M.; ZHANG, H.; LEE, E. G.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Dense-granule protein NcGRA7, a new marker for the serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in aborting cows. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 1640-1643, 2007.

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

INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Parasitology**, v. 133, p. S145-S168, 2006.

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

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

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; ROCCHI, M. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 155-163, 2011.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K. An ultra-Rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **American Society for Microbiology**, v. 71, p. 234, 2002.

KELLER, N. Identification of a *Neospora caninum* Microneme Protein (NcMIC1) Which interacts with Sulfated Host Cell Surface Glycosaminoglycans. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3187-3198, 2002.

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.

KIEFHABER, T.; RUDOLPH, R.; KOHLER, H. H.; BUCHNER, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. **Biotechnology**, v. 9, p. 825-829, 1991.

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

LIEW, F. Y. Timeline: TH1 and TH2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 55–60, 2002.

- LONG, M. T.; BASZLER, T. V.; MATHISON, B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **Journal Parasitology**, v. 84, p. 316, 1998.
- LOPEZ, P. J.; MARCHAND, I.; JOYCE, S.; DREYFUS, M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 188-199, 1999.
- LOVETT, J. L.; HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 107, p. 33-43, 2000.
- MAEDA, Y.; YAMADA, H.; UEDA, T.; IMOTO, T. Effect of additives on the renaturation of reduced lysozyme in the presence of 4 M urea. **Protein Engineering**, v. 9, p. 461-465, 1996.
- 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.
- McALLISTER, M.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M.; JOLLEY, W. R.; TRANAS, J. D.; WILLIAMS, E. S.; LINDSAY, D. S.; BJORKMAN, C.; BELDEN, E. L. Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1531-1536, 1999.
- MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 352-355, 2011.
- MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, p. 289-298, 1996.
- MITSDOERFFER, M.; LEE, Y.; JÄGER, A.; KIM, H. J.; KORN, T.; KOLLS, J. K.; CANTOR, H.; BETTELLI, E.; KUCHROO, V. K. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 107, p. 14292-14297, 2010.
- MONNEY, T.; DEBACHE, K.; GRANDGIRARD, D.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A. Vaccination with the recombinant chimeric antigen recNcMIC3-1-R induces a non-protective Th2-type immune response in the pregnant mouse model for *N. caninum* infection. **Vaccine**, v. 30, p. 6588-6594, 2012.
- MONNEY, T.; DEBACHE, K.; HEMPHILL, A. Vaccines against a major cause of abortion in cattle, *Neospora caninum* infection. **Animals**, v. 1, p. 306-325, 2011.
- MONNEY, T.; GRANDGIRARD, D.; LEIB, S.; HEMPHILL, A. Use of a Th1 stimulator adjuvant for vaccination against *Neospora caninum* infection in the pregnant mouse

model. **Pathogens**, v. 2, p. 193-208, 2013.

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

MONNEY, T.; RÜTTI, D.; SCHORER, M.; DEBACHE, K.; GRANDGIRARD, D.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A. RecNcMIC3-1-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, p. 6967-6975, 2011.

NUC, P.; NUC, K. Produkcja rekombinowanych białek w *Escherichia coli*. **Postępy Biochemii**, v. 52, p. 448-456, 2006.

OKEOMA, C. M.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E.; STOWELL, K. M.; GILLESPIE, L. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 307-315, 2004.

OTSUKI, T.; DONG, J.; KATO, T.; PARK, E. Y. Expression, purification and antigenicity of *Neospora caninum* antigens using silkworm larvae targeting for subunit vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 284-287, 2013.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.

PALOMARES, L.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Methods in Molecular Biology**, v. 267, p. 15-52, 2004.

PARE, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* Sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 352-359, 1995.

PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ARRANZ-SOLÍS, D.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; HEMPHILL, A.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; CUEVAS-MARTÍN, C.; ORTEGA-MORA, L. M. A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 207, p. 203-215, 2015.

PECKHAM, R. K.; BRILL, R.; FOSTER, D. S.; BOWEN, A. L.; LEIGH, J. A.; COFFEY, T. J.; FLYNN, R. J. Two distinct populations of Bovine IL-17+ T-cells can be induced and WC1+IL-17+ $\gamma\delta$  T-cells are effective killers of protozoan parasites. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-5, 2014.

PINHEIRO, A. F.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. A. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **Pathogens Global Health**, v. 107, p. 116-121, 2013.

PITCOVSKI, J.; BAZAK, Z.; WASSERMAN, E.; ELIAS, O.; LEVY, A.; PERETZ, T.; FINGERUT, E.; FRANKENBURG, S. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. **Vaccine**, v. 24, p. 636-643, 2006.

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.

RAMAMOORTHY, S.; SANAKKAYALA, N.; VEMULAPALLI, R.; DUNCAN, R. B.; LINDSAY, D. S.; SCHURIG, G. S.; BOYLE, S. M.; KASIMANICKAM, R.; SRIRANGANATHAN, N. Prevention of lethal experimental infection of C57BL/6 mice by vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1521-1529, 2007.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. E.; NASCIMENTO, L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

RAMOS, R. A. Da S.; CONCEIÇÃO, F. R.; GRASSMANN, A. A.; LAGRANHA, V. L.; DELLAGOSTIN, O. A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 677-686, 2008.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA A. M.; 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, p. 133-142, 2013.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ-ZABALLOS, F.; RODRÍGUEZ-MARCOS, S.; BLANCO-MURCIA, J.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. **Veterinary Research**, v. 44, p. 106, 2013.

ROMAND, S., THULLIEZ, P., DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infections. **Parasitology Research**, v.60, p.50-53, 1998.

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

ROOS, T. B.; DE LARA, A. P. DE S. S.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEITE, F. P. L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v. 30, p. 2173-2177, 2012.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-17, 2014.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E. H.; GUY, C. S.; KIPAR, A.; SMITH, R. F.; KAISER, P.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Upregulation 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.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D. J. L. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS One**, v. 6, p. e15799, 2011.

SAEIJ, J. P. J.; COLLER, 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.

SAÏDA, F.; UZAN, M.; ODAERT, B.; BONTEMS, F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. **Current Protein & Peptide Science**, v.7, p. 47-56, 2006.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific anti-body and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v. 67, p. 1175–1184, 2007.

SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. M.; WILLIAMS, N.; DOUGAN, G. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, p. 218-226, 2001.

SOLTANI, M.; NASSIRI, M.; SADREBAZZAZ, A.; TAHMOORESPOOR, M. Cloning, nucleotide sequencing and bioinformatics study of NcGRA7, an immunogen from *Neospora caninum*. **Journal of Cell Molecular Research**, v. 5, p. 3-12, 2013.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymology**, v. 185, p. 60-89, 1990.

TALEVICH, E.; KANNAN, N. Structural and evolutionary adaptation of rhopty kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. **BMC Evolurionary Biology**, v. 13, p. 117, 2013.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 205-209, 1989.

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 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, 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 parasitemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v. 121, p. 347-358, 2000.

WILLIAMS, D. J. L.; 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.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, p. 203-214, 2000.

## **Anexos**





Pelotas, 18 de dezembro de 2012

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Professor Fábio Pereira Leivas Leite

*Centro de Desenvolvimento Tecnológico*

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Expressão da proteína ROPII de Neosporose para utilização como imunobiológico**”, processo nº23110.009651/2012-65, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitação: 60 bovinos e 100 camundongos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à CEEA. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9651).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 28/10/2013

Assinatura do Professor Responsável:

Fábio Pereira Leivas Leite  
Médico Veterinário Ph.D.  
CPMV-RS 2627 CPF 207326600-25

