

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Clonagem, expressão e caracterização da região imunodominante de NcROP2

Renan Eugênio Araujo Piraine

Pelotas, 2014

Renan Eugênio Araujo Piraine

Clonagem, expressão e caracterização da região imunodominante de NcROP2

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Orientador de estágio: Me. Alceu Gonçalves dos Santos Junior

Coorientador de estágio: Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P667c Piraine, Renan Eugênio Araujo

Clonagem, expressão e caracterização da região imunodominante de ncrop2 / Renan Eugênio Araujo Piraine ; Fábio Pereira Leivas Leite, Alceu Gonçalves dos Santos Junior, orientadores ; Rodrigo Casquero Cunha, coorientador. — Pelotas, 2014.

51 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Neosporose. 2. Vacina. 3. Ncrop2. 4. Imunodiagnóstico. 5. Escherichia coli. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Santos Junior, Alceu Gonçalves dos, orient. III. Cunha, Rodrigo Casquero, coorient. IV. Título.

CDD : 615.372

Renan Eugênio Araujo Piraine

Clonagem, expressão e caracterização da região imunodominante de NcROP2

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 10/12/2014

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador).

Doutor em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin-Madison

Me. Alceu Gonçalves dos Santos Junior

Mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dedico este trabalho a meus pais, responsáveis pelo
incentivo na busca de meu futuro.

Agradecimentos

Aos meus pais, Orisvaldo e Carla, pela estrutura, apoio, doação, compreensão, e paciência com a minha escolha em buscar meu ensino superior em outra cidade;

A toda minha família, pelos ensinamentos e por comandar por meio de ações meu trajeto até o momento;

A minha tia Marta que certamente compartilhou com minha mãe preocupações quanto minha vida em outra cidade;

Aos meus padrinhos Claudia e Duberney, que mesmo com a distância me fizeram sentir importante e amparado quando necessário;

Ao Prof. Dr. Fábio, por ter aceitado ser meu orientador ao longo dos meus anos de graduação e disponibilizado seu laboratório para minhas atividades na pesquisa;

Ao grupo do laboratório 4 do Centro de Biotecnologia, Itaua, Luana, Matheus, Paula e Patrícia, que logo nos primeiros anos de estágio me acolheram como um integrante e tiveram paciência no meu aprendizado;

Aos demais componentes do laboratório 4 que conheci após retornar do meu intercâmbio, por me receberem de braços abertos e permanecerem ao meu lado durante meu trabalho de conclusão de curso e estágio final;

Aos amigos que fiz na Itália, principalmente meus coinquilinos Allan, Vicente, Wilson, Carlos e Luiz, que me ajudaram a superar a distância da família e ensinaram-me o valor da amizade;

As grandes amizades que construí dentro da faculdade, principalmente na 3ª turma de biotecnologia. Arthur, Lucas, Rodrigo, Drielly, Carol, Mariana, Fernanda, nunca os esquecerei;

Aos meus amigos/irmãos Rafael, Mauro, Matheus e suas famílias, pela amizade desde a infância e discussões relacionadas a vida amorosa e acadêmica;

Aos grandes amigos e colegas Livia e Alceu, que estiveram ao meu lado ajudando e ensinando, que com planos e propósitos compartilharam meu caminho na pesquisa.

A todos estes, meu sincero muito obrigado.

Resumo

PIRAINE, Renan Eugênio Araujo. **Clonagem, expressão e caracterização da região imunodominante de NcROP2**. 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Neospora caninum, parasito causador da Neosporose, é conhecido mundialmente como um dos principais responsáveis por abortos em rebanhos bovinos, provocando prejuízos econômicos na pecuária. A transmissão do parasito entre os animais é de difícil combate, assim, métodos de diagnóstico e controle devem ser aplicados para reduzir a disseminação do patógeno nas propriedades. A vacinação de rebanhos seria uma alternativa, contudo a falta de vacinas seguras e eficazes impede a aplicação deste método de controle. O parasito possui diferentes estruturas que auxiliam no processo de infecção, como proteínas de superfície, proteínas dos micronemas (MICs), antígenos dos grânulos densos (GRAs) e proteínas das rôptrias (ROPs). Estes componentes são atualmente estudados como antígenos vacinais, obtidos de forma recombinante, e aplicados isolados ou em associações (quimeras), com o objetivo de avaliar a resposta imunológica. A expressão heteróloga de proteínas recombinantes através de sistemas de expressão é uma das ferramentas utilizadas para o desenvolvimento de vacinas experimentais em laboratório. O trabalho apresentado teve como objetivo a expressão e obtenção do fragmento entre os aminoácidos 191-359 da proteína NcROP2 de *N. caninum* em *Escherichia coli*. A proteína recombinante rNcROP2 produzida em *E. coli* cepa BL21 Star™, apresentou tamanho de 20kDa, com propriedades de insolubilidade na ausência de tampão contendo ureia a 8M. A proteína rNcROP2 foi purificada e caracterizada por anticorpos monoclonais anti-histidina e sua antigenicidade reconhecida por soro de animais infectados naturalmente, ambos a partir de técnica de *immunoblotting*. Com rNcROP2 sendo reconhecida por anticorpos anti-*N. caninum*, esta proteína se revelou um alvo para estudos futuros que poderão utilizá-la em testes de imunodiagnóstico e desenvolvimento de vacina experimental contra Neosporose.

Palavras-Chave: Neosporose; NcROP2; vacina; imunodiagnóstico; *Escherichia coli*

Abstract

PIRAINE, Renan Eugênio Araujo. **Cloning, expression and characterization of NcROP2's immunodominant region**. 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Neospora caninum, parasite that causes Neosporosis, is known worldwide as one of the main causes of abortion in cattle herds, causing economic losses to livestock. The parasite's transmission among animals is difficult to combat, therefore control and diagnostics methods should be applied to reduce the pathogen's spread on properties. Vaccination of these cattle would be an alternative, however the lack of safe and effective vaccines preclude the application as a control method. The parasite has different structures that aid in the process of infection, such as surface proteins, micronemes proteins (MICs), dense granules antigens (GRAS) and rhoptries proteins (ROPs). These compounds are currently investigated as vaccine antigens, obtained recombinantly and applied isolated or in association (chimeras) with the aim to analyze the induced immune response. The heterologous expression of recombinant proteins through expression systems is one of the tools used in the development of experimental vaccines. The present study aimed the expression and the obtainment of the fragment between the 191-359 amino acids of ROP2 protein from *N. caninum* in *Escherichia coli*. The recombinant protein produced in *Escherichia coli* strain BL21 Star™ presented a 20 kDa size with insolubility properties in the absence of 8M urea buffer. The rNcROP2 protein was purified and characterized with anti-histidine monoclonal antibodies and its antigenicity was recognized by sera from animal naturally infected, both by immunoblotting technique. With the rNcROP2's recognition by anti-*N. caninum* antibodies, this proved to be a target for future studies aiming the development of immunodiagnostic tests and experimental vaccines against Neosporosis.

Key-Words: Neosporosis; NcROP2; vaccine; immunodiagnostic; *Escherichia coli*

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura do plasmídeo pAE.....	29
Figura 2A	Porção a ser amplificada da sequência total de NcROP2	33
Figura 2B	Análise <i>in silico</i> do fragmento de 168 aminoácidos.....	33
Figura 3	Eletroforese da PCR do gene NcROP2	34
Figura 4A	Eletroforese com a digestão do fragmento com <i>PmeI</i>	35
Figura 4B	Estrutura do plasmídeo pAE/NcROP2.....	35
Figura 5	Eletroforese da extração plasmidial de pAE/NcROP2.....	36
Figura 6	Eletroforese da confirmação dos clones pAE/NcROP2.....	37
Figura 7	SDS-PAGE dos cultivos de <i>E. coli</i> em 10mL	38
Figura 8	SDS-PAGE da expressão heteróloga na cepa BL21 Star™..	39
Figura 9A	SDS-PAGE com a purificação de rNcROP2.....	39
Figura 9B	SDS-PAGE para quantificação de rNcROP2.....	39
Figura 10A	<i>Western blot</i> com soro anti-histidina.....	40
Figura 10B	<i>Western blot</i> com soro anti- <i>N. caninum</i>	40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequência dos iniciadores desenhados.....	28
----------	---	----

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão bibliográfica	13
2.1. Cenário da Neosporose no Brasil.....	13
2.2. Transmissão.....	15
2.3. Estrutura de <i>N. caninum</i>	15
2.3.1. Proteínas de superfície (SAGs)	217
2.3.2. Proteínas dos micronemas (MICs)	18
2.3.3. Antígenos dos grânulos densos (GRAs)	18
2.3.4. Proteínas das róptrias (ROPs)	19
2.4. Imunidade e <i>Neospora caninum</i>	20
2.5. Medidas de controle baseadas na vacinação.....	21
2.5.1. Vacinas atenuadas.....	22
2.5.2. Vacinas utilizando vetores biológicos.....	23
2.5.3. Vacinas de DNA.....	24
2.5.4. Vacinas de subunidades recombinantes	24
2.6. Vacinologia reversa	26
3. Objetivos	27
3.1. Objetivos gerais.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. Metodologia.....	28
4.1. Desenho <i>in silico</i> dos iniciadores	28
4.2. Amplificação do fragmento de NcROP2 a partir de DNA de <i>N. caninum</i>	28
4.3. Construção e clonagem do plasmídeo pAE/NcROP2	29
4.4. Expressão de rNcROP2	30
4.5. Purificação de rNcROP2	31
4.6. Caracterização de rNcROP2	32
5. Resultados.....	33
5.1. Construção dos iniciadores	33
5.2. PCR.....	34
5.3. Clonagem	34
5.4. Seleção dos plasmídeos recombinantes	35
5.5. Expressão da rNcROP2	37
5.6. Purificação e Caracterização.....	39
6. Discussão.....	41
7. Conclusão.....	44
Referências.....	45

1. Introdução

Neospora caninum, agente causador da Neosporose, é um protozoário intracelular pertencente ao filo apicomplexa, identificado inicialmente em doenças neuromusculares em cães (BJERKAS et al., 1984) e posteriormente descrito por Dubey et al. (1988). Reconhecido mundialmente como um dos principais causadores de abortos em bovinos (DUBEY et al., 2006), é responsável por perdas econômicas globais em torno de US\$ 2 bilhões/ano na indústria leiteira e de gado de corte (REICHEL et al., 2013). Além dos custos com a perda de animais no rebanho, são relatados prejuízos econômicos com a diminuição da produção de leite (HERNANDEZ et al., 2001) e menor ganho de peso após o desmame (BARLING et al., 2000). Amplamente distribuída, são apresentados relatos de casos da doença em países como Nova Zelândia, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Espanha, Austrália, entre outros (REICHEL et al., 2013).

O parasito possui como hospedeiros definitivos o cão (*Canis familiaris*) (BJO et al., 2002; DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006) e o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004) e como hospedeiros intermediários, principalmente, ovinos, equinos, cervídeos, caninos, bubalinos e bovinos (DUBEY; SCHARES, 2011). Nos caninos ocorrem as fases sexuada e assexuada do ciclo de vida de *N. caninum* (BJO et al., 2002). Sendo hospedeiros definitivos, os cães infectam-se por ingerirem cistos teciduais, liberando em suas fezes oocistos não esporulados no ambiente, os quais, após poucos dias esporulam para dois esporocistos que contêm na totalidade quatro esporozoítos (HADDAD; DOHOO; VANLEEWEN, 2005). Dessa forma, hospedeiros intermediários ingerem oocistos esporulados (que estão presentes na água ou na pastagem) que invadem a parede intestinal. Neste momento ocorre a conversão para o estágio de taquizoítos (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013), os quais desenvolvem uma parasitemia alcançando diversos tecidos, infectando células neurais, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais vasculares (MONNEY; HEMPHILL, 2014) inseridos em vacúolos parasitóforos (VP) nos citoplasmas de células infectadas (BJO et al., 2002).

Para obter sucesso na invasão da célula hospedeira, *N. caninum* possui organelas e conjuntos de proteínas especializadas no desempenho desta função. Antígenos de superfície (SAGs), proteínas dos micronemas (MICs), proteínas das

róprias (ROPs) e proteínas dos grânulos densos (DGs) são alguns dos componentes da maquinaria celular que estão intimamente relacionados a esse processo invasivo (HEMPHILL et al., 2013). Conhecendo a localização destes antígenos e a sua participação neste processo, entende-se que possuem aspectos fundamentais (como a indução de uma resposta imune celular ou humoral, dependendo do estágio vital do hospedeiro) para a escolha como imunógenos no desenvolvimento de uma vacina de subunidade (HECKER et al., 2012) .

A vacina comercial, Bovilis Neoguard™, composta por taquizoítos inativados, teve sua ação analisada em diferentes países. Além de resultados como a redução de taxas de aborto acima de 50%, foi verificada uma possível relação com o aumento no risco de morte embrionária precoce, o que favoreceu para que a vacina fosse retirada do mercado em determinados locais (MONNEY; HEMPHILL, 2014; WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012). Com o propósito de apresentar ao mercado e ao setor agropecuário uma alternativa mais eficaz, segura e econômica de controlar a Neosporose, vacinas recombinantes são amplamente estudadas em centros de pesquisa pelo mundo, com os mais diversos alvos e formulações (HECKER et al., 2012; HEMPHILL et al., 2013; NISHIKAWA; MIKAMI; NAGASAWA, 2002; OJO et al., 2014).

O trabalho aqui apresentado refere-se à clonagem, expressão heteróloga e caracterização da região imunogênica da proteína ROP2 de *N. caninum* por *immunobloting*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Cenário da Neosporose no Brasil

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino no mundo, contando com mais de 209 milhões de cabeças, o que o torna um dos maiores produtores de leite e carne bovina (IBGE, 2011). No país, é estimado que, na indústria leiteira, as perdas relacionadas à Neosporose atinjam em torno de US\$ 50 milhões/ano enquanto na produção de carne este valor pode chegar até US\$ 100 milhões/ano (REICHEL et al., 2013). A confirmação da presença de *N. caninum* nos rebanhos bovinos brasileiros foi publicada em 1999, por Gondim et al., e desde então, busca-se estimar sua taxa de

prevalência, que normalmente varia de forma considerável entre os estados (MOORE, 2005). As conclusões obtidas a partir de trabalhos que relacionam *N. caninum* e o Brasil estão em grande parte de acordo com o restante do mundo, onde Reichel et al. (2013) sugerem uma média de 16,1% de soroprevalência para o gado leiteiro e de 11,5% para o gado de corte. Contudo, muitas vezes, em casos de abortos em bovinos e animais domésticos, não são realizados diagnósticos definitivos, o que pode ser explicado pela não inclusão da doença na rotina de diagnósticos laboratoriais, dificultando, desta forma, a real epidemiologia desta parasitose, assim como a definição de uma taxa representativa de prevalência que não seja fruto de oscilações entre propriedades rurais específicas e casos isolados (ANDREOTTI et al., 2003).

Na região sul, a soropositividade para *N. caninum* foi analisada (CAMILLO et al., 2011; CORBELLINI et al., 2002; OGAWA et al., 2005; RAGOZO et al., 2003; VOGEL; ARENHART; BAUERMANN, 2006) assim como sua relação com as taxas de aborto em bovinos no Rio Grande do Sul (CORBELLINI et al. 2002). Corbellini et al. (2002) destaca em seu estudo que a chance de aborto em vacas soropositivas foi 3 vezes maior, contudo pode ser ainda superior, como demonstrado por Hein et al. (2012), em que animais soropositivos possuíam risco 7 vezes maior relacionado ao abortamento. Devido às oscilações na prevalência da doença no país, assim como neste estado, entende-se que as buscas por métodos de controle ou diagnósticos eficientes são fundamentais. O teste de imunofluorescência indireto (RIFI) é considerado como teste de referência para o diagnóstico de Neosporose (BJO; UGGLA, 1999), sendo capaz de detectar anticorpos anti-*Neospora* em soros bovinos, avaliando assim o status de infecção. Em lâminas contendo taquizoítos fixados, diluições dos soros suspeitos são aplicadas e, logo após, é feita a detecção dos anticorpos anti-*Neospora* ligados a superfície dos taquizoítos, com anticorpos anti-IgG bovino conjugado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) que emitem fluorescência (BJO; UGGLA, 1999). Para o desenvolvimento da técnica é necessário o estabelecimento de diluições ótimas do anticorpo secundário que provoca a fluorescência, baseadas em testes sorológicos de amostras sabidamente positivas e negativas, contudo ainda assim os resultados podem ser subjetivos, visto que a RIFI depende da interpretação visual individual dos resultados, do treinamento e da experiência do corpo técnico que o executa (BJO; UGGLA, 1999). Além deste, outros testes como *immunoblotting*, testes de aglutinação, ELISA (*enzyme-linked*

immunosorbent assays) e reação em cadeia da polimerase (PCR) também são utilizados no diagnóstico (DONG et al., 2012).

2.2. Transmissão

A dificuldade em manter bovinos livres da infecção pelo parasito é devido seu modo de transmissão eficiente: horizontal e vertical. A transmissão de modo horizontal dá-se quando um bovino ingere oocistos esporulados, enquanto a vertical ocorre através da mãe para a prole (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Os oocistos não esporulados excretados nas fezes pelo hospedeiro definitivo (canídeos) normalmente estão em baixo número, no entanto apresentam alta resistência às variáveis encontradas no ambiente e, quando esporulados, tornam-se infectantes para o gado (DUBEY; SCHARES, 2011; REICHEL et al., 2014). A transmissão vertical pode ocorrer de duas formas: transmissão transplacentária exógena, em que a vaca é infectada durante a gestação após ingerir oocistos, que diferenciam-se em esporozoítos e então em taquizoítos, os quais difundem-se para o útero via circulação, utilizando células do sistema mononuclear fagocítico, atravessando posteriormente a placenta, onde acabam infectando o feto; ou a transmissão transplacentária endógena, em vacas infectadas anteriormente a prenhez, nas quais há a reativação dos cistos teciduais (bradizoítos) em taquizoítos, que propagam-se através da placenta até o feto (REICHEL et al., 2014; WILLIAMS et al., 2009).

2.3. Estrutura de *N. caninum*

A literatura disponível que aborda padrões de expressão em *N. caninum* revela alterações ao longo dos seus estágios do ciclo de vida e em diferentes condições ambientais (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2014; REID et al., 2012; WASTLING et al., 2009), evidenciando a importância do conhecimento destes padrões para o desenvolvimento de vacinas de subunidade e quais as respostas que esta poderá induzir no sistema imune.

N. caninum, sendo pertencente ao filo Apicomplexa, é um parasito obrigatoriamente intracelular que possui diferentes mecanismos direcionados ao processo de invasão, como o “complexo apical” característico e que dá nome ao filo,

o qual é composto por uma coleção de filamentos proteicos e organelas secretórias (COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012).

A regulação da expressão das proteínas de *N. caninum* acontece de acordo com o ciclo biológico do parasito e sua necessidade. O taquizoíto movimenta-se através da matriz extracelular e busca o reconhecimento do melhor local para a invasão celular. No momento inicial da relação entre *N. caninum* e a célula hospedeira, há um contato de baixa afinidade com a membrana superficial da célula-alvo, seguido por um processo de adesão mais estável entre as partes. Nesta etapa destacam-se as proteínas do tipo SAG, que mantêm este contato de forma reversível (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002). Para que haja a invasão da célula, os taquizoítos reorientam-se perpendicularmente à membrana superficial da célula, onde organelas secretórias pertencentes ao complexo apical, Micronemas e Roptrias, liberam, por exocitose, proteínas adesivas na superfície celular que irão se ligar em receptores de glicanos para estabelecer um forte e específico contato. Neste momento há um aumento de Ca^{2+} citosólico no parasito (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013), responsável por este e outros eventos importantes na relação parasito-hospedeiro. Estas proteínas medeiam interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato, através de domínios como *lectin-like*, *integrin (I)-like*, *thrombospondin (TSP)-like* e *epidermal growth factor (EGF)-like*.

ROPs e MICs inserem-se na membrana plasmática possibilitando a formação do receptor para AMA-1, proteína conservada dos micronemas, que está relacionada com a montagem da “junção motora” responsável pelo trânsito de *N. caninum* até o interior do citoplasma (COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012; MONNEY; DEBACHE; HEMPHILL, 2011). A junção motora é translocada por meio da superfície do parasito até o polo posterior enquanto proteínas MIC são liberadas via atividade proteásica romboide, o que acaba forçando o engolfamento do parasito pela célula. Nesta invasão há a formação do Vacúolo Parasitóforo (VP), que protege o parasito de ações externas de defesa da célula e que possui a Membrana do Vacúolo Parasitóforo (MVP), constituída pela própria membrana da célula hospedeira resultante da entrada do patógeno. O VP é responsável por impedir a ação de lisossomos, permitindo assim que *N. caninum* se multiplique até alcançar uma massa crítica intracelular que acaba provocando a ruptura da célula hospedeira. Proteínas dos Grânulos Densos (GRA) modificam a MVP e participam da formação de uma rede túbulo-vesicular

intravacuolar, considerada a matriz do VP e formada por lipídeos. Mitocôndrias e retículo endoplasmático da célula hospedeira encontram-se adjacentes ao vacúolo parasitóforo. (BUXTON; MCALLISTER; DUBEY, 2002; HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006; POLLO-OLIVEIRA et al., 2013).

2.3.1. Proteínas de superfície (SAGs)

O contato inicial na interação parasito-célula é mediado, em partes, por dois antígenos imunodominantes principais: NcSAG1 e NcSRS2 (*SAG1-related sequence*) (HEMPHILL, 1996). Genes de antígenos de superfície estão espalhados pelo genoma de *N. caninum*, possuindo alguns polimorfismos já descritos em cada locus. Há a divisão em dois grupos, chamados SAG1 ou SAG2 (*surface antigen 1* e *surface antigen 2*), e entende-se que estas famílias de proteínas possuem papel fundamental na virulência do parasito. A família de proteínas SAG1 é constituída de componentes cruciais para a virulência, sendo caracterizada pela presença de dois domínios SRS disulfídicos unidos (SOLTANI et al., 2013). Ncp43 foi demonstrada por Hemphill (1996) estar localizada na membrana externa como também na membrana interna de taquizoítos de *N. caninum*, além de estar associada aos grânulos densos e roptrias, o que a relaciona ao processo de ligação e entrada na célula hospedeira. A partir de análises *in silico*, a proteína é predita com 43kDa, contendo 401 aminoácidos e o sítio Arg-Gly-Asp (RGD) essencial na interação com receptores da superfície celular (SOLTANI et al., 2013).

NcSAG1, um dos antígenos mais estudados e comprovadamente imunogênico, é expresso por taquizoítos e sofre uma diminuição nos níveis de expressão durante a conversão do parasito para bradizoíto (TAKASHIMA et al., 2013). Dentre os imunógenos expressos de forma heteróloga e testados em formulações vacinais, rNcSAG1 destaca-se como um dos que induzem maiores níveis de proteção (RAMAMOORTHY et al., 2007). Similares a NcSAG1 e NcSRS2, Ncp29 e Ncp35, respectivamente, foram demonstradas por Howe et al. (1998) como dois antígenos exclusivamente associados a membrana de taquizoítos do parasito, possuindo alta imunogenicidade e sendo bem conservados, características que os tornam interessantes na busca por imunógenos novos para vacinas e testes de diagnóstico. Supõe-se que antígenos de superfície expressos pelos bradizoítos, como NcBSR4,

atuem como barreiras protetoras, sendo receptores que auxiliam na invasão dos mais diferentes tipos celulares ou como mediadores da evasão da resposta imune, permitindo a propagação do parasito e sua sobrevivência (RISCO-CASTILLO et al., 2007).

2.3.2. Proteínas dos Micronemas (MICS)

Micronemas são organelas fusiformes ou em forma de “charuto”, presente em grande número na parte apical, responsável, junto as róptrias, pela adesão à célula hospedeira, desestruturação localizada da membrana desta célula, entre outros processos (BLACKMAN; BANNISTER, 2001). Suas proteínas, as chamadas “MICs” contém ao menos um domínio que as confere propriedades adesivas, que normalmente está relacionado a receptores de superfícies (carboidratos) ou outras MICS (proteínas), além de poderem possuir sítios transmembrana, citoplasmáticos ou associados a enzimas (COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012).

Dentre as MICs já estudadas, pode-se destacar NcMIC1, proteína liberada no meio e que mantém interação com a superfície celular da célula hospedeira, através da ligação com glicosaminoglicanos específicos (KELLER et al., 2002). Além desta, outra proteína, NcMIC2, demonstrou-se importante durante a invasão de células-alvo em estudos de Lovett et al. (2000), sendo sua expressão estimulada quando há elevação de temperatura do cultivo e aumento da concentração de cálcio intracelular no parasito. Esta pertence a uma família de proteínas que possui sítios *integrin-like* e TSP (trombospondina) tipo I, relacionados a ligação parasito-célula. A proteína imunodominante NcMIC3 também foi analisada por Naguleswaran et al. (2001), a qual está distribuída pela superfície do parasito com a função de ajustar a interação com moléculas da superfície da célula hospedeira e, através de sua possível interação física com actina/miosina, oferecem ao parasito a maquinaria e força motora para invadirem células de forma ativa.

2.3.3. Antígenos dos Grânulos Densos (GRAs)

Grânulos Densos são vesículas delimitadas por membranas que contém grande quantidade de conteúdo granular armazenado, que variam de tamanho, forma

e número entre os apicomplexas, sendo algumas vezes confundidos com micronemas e róptrias em secções de microscopia eletrônica. Possuem antígenos que são secretados para o VP durante o desenvolvimento intracelular de taquizoítos de *N. caninum*, possuindo relação com o estímulo da imunidade humoral pelo hospedeiro (TAHMOORESPOOR et al., 2013). Como exemplo destas proteínas, NcGRA2 é encontrada associada com a rede tubular do VP em taquizoítos e fazendo parte da parede celular de bradizoítos (STROHBUSCH et al., 2008). Tão importante quanto, NcGRA7 é altamente imunogênica, relacionada inicialmente ao desenvolvimento parasitário intracelular mas também tem sua importância reconhecida durante o processo inicial de invasão da célula hospedeira (TAHMOORESPOOR et al., 2013). A proteína NcMAG1 foi descrita por Guionaud et al. (2010) principalmente em bradizoítos, inserida nos grânulos densos, compondo a parede do cisto ou disperso em sua matriz. Possui após seu processamento em torno de 55kDa, destacando-se por conter porções altamente imunogênicas, que estão relacionadas com a estimulação de resposta por células B (GUIONAUD et al., 2010).

2.3.4. Proteínas das Róptrias (ROPs)

As róptrias são organelas em número superior, com formato de “clava”, que possuem ductos que as conectam até o polo extremo do parasito. Dentre as proteínas das róptrias, tendo como base estudos utilizando *T. gondii* e *N. caninum*, entre outros parasitos apicomplexas, pôde-se executar a divisão entre: proteínas *rhoptry necks* (RONs), conservadas no filo Apicomplexa, que auxiliam na formação do VP; grupo de quinases, fosfatases e proteases comuns a células eucarióticas; e, ainda, proteínas do bulbo das róptrias (ROPs), que apresentam homologia apenas em gêneros estritamente relacionados, como *Neospora*, *Toxoplasma* e *Sarcocystis* (ALAEEDDINE et al., 2013). Um complexo de proteínas, RONs, é responsável por localizar pontos estratégicos para formação e ancoragem estável da “junção motora” durante a invasão da célula hospedeira, a partir da interação com componentes do citoesqueleto da célula e ainda impedir a destruição lisossomal do VP (BECK et al., 2014). Sugere-se que as ROPs participem do processo da biogênese de VP e na modulação de propriedades funcionais de MVP. Após a secreção, estas podem: permanecer no lúmen do VP, associadas a MVP, ou então serem liberadas no citoplasma da célula hospedeira, com a intenção de que atinjam diferentes pontos, como por exemplo o

núcleo. Na família NcROP2, todos precursores possuem peptídeos sinais e grande parte depende da clivagem de uma pró-região durante a maturação, possivelmente estando relacionadas a migração do parasito e a localização do VP próximo ao núcleo da célula infectada (ALAEDDINE et al., 2013; CHARRON; SIBLEY, 2001). Semelhante a família ROP2 de *T. gondii*, a família NcROP2 é um grupo de proteínas das roptrias com alguns homólogos de quinases, os quais possuem todos os resíduos necessários para desempenhar esta função (DEBACHE et al., 2008). Por ser altamente conservada, imunodominante, desempenhando papel fundamental durante a invasão e manutenção do taquizoíto e ainda, demonstrando a partir de diferentes estudos a capacidade de induzir proteção, NcROP2 apresenta-se como um antígeno com grande potencial de utilização para o desenvolvimento de vacinas contra *N. caninum* e testes de imunodiagnóstico.

2.4. Imunidade e *Neospora caninum*

O aborto é a principal manifestação clínica da Neosporose em bovinos, tanto no rebanho leiteiro quanto de corte (DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006). Não há momento específico da gestação para que ocorra o aborto, porém em sua maioria ocorrem entre o quinto e o sexto mês de gestação (DUBEY; SCHARES, 2011). As consequências aos embriões e fetos podem ser variadas, como a morte dentro do útero, a reabsorção, a mumificação, a autólise, ou nascer clinicamente normal porém persistir infectado (DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006; DUBEY; SCHARES, 2011). As consequências mais severas surgem quando a gestação ainda está nos seus primeiros meses, o que pode ser explicado pela imaturidade do sistema imune do feto que é incapaz de combater com eficácia a infecção (HADDAD; DOHOO; VANLEEWEN, 2005).

Uma das razões do aborto está na relação entre o sistema imune da mãe e do feto no combate a *N. caninum*. Por ser um parasito intracelular, a resposta imune através da regulação de citocinas é de grande importância. Citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, como o interferon- γ (IFN γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12), podem, dependendo dos níveis, provocar uma resposta imunológica prejudicial ao feto, porém necessária para limitar a proliferação de *N. caninum* (INNES et al., 2002). IFN γ é responsável por aumentar a expressão de MHC de classe I,

favorecendo a apresentação de antígenos e aumentando a chance de que as células infectadas sejam reconhecidas por uma resposta citotóxica. De modo sinérgico pode atuar TNF- α , ativando macrófagos e células *Natural killer* (NK) (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2014). Neste processo há também um aumento na expressão de IL-12, que exerce induz um aumento na proliferação e produção de IFN γ por linfócitos T e células NK estimuladas por antígenos do parasito, e além disso, é responsável por induzir uma diminuição na resposta imunológica Th2 (BASZLER et al., 1999). No entanto, na prenhez o sistema imune é modulado para que haja uma tolerância materna ao feto. A interface materno-fetal mantém citocinas como a interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4) e o fator transformador do crescimento beta (TGF- β), que atuam a partir de uma resposta imunológica Th2 e participam da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (INNES et al., 2001, 2002). Um dos principais hormônios durante a gestação, a progesterona, favorece o desenvolvimento de células do tipo Th2, responsáveis pela produção de IL-5 e IL-4, além de induzir o aumento da expressão de seus próprios receptores em leucócitos, contribuindo dessa forma na polarização de uma resposta do tipo Th2.. Logo, este tipo de imunomodulação pode favorecer a invasão pelo parasito e a infecção do feto. (ENTRICAN, 2002; INNES; VERMEULEN, 2006; KANO et al., 2007).

2.5. Medidas de controle baseadas na vacinação

Procurando obter uma resposta imune que proteja e seja duradoura contra *N. caninum*, capaz de estimular de forma correta um balanço entre Th1/Th2, diferentes protótipos de vacinas já foram e estão sendo testadas. Como descrito por Monney et al. (2011), uma vacina eficiente é dependente de alguns requisitos, como prevenir a proliferação de taquizoítos e sua disseminação no gado durante a gestação, prevenir/reduzir a excreção de oocistos pelos hospedeiros definitivos e impedir a formação de cistos teciduais em hospedeiros intermediários. Ao longo de mais de 15 anos, protótipos de vacinas inativadas, vivas atenuadas, recombinantes, de DNA, em vetores, e com diferentes adjuvantes, já foram testadas (HECKER et al., 2012; INNES et al., 2002; MONNEY; DEBACHE; HEMPHILL, 2011; MONNEY; HEMPHILL, 2014; NISHIKAWA; MIKAMI; NAGASAWA, 2002; WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012). Adrianarivo et al. (1999) realizaram experimentos com taquizoítos inativados em

formulações com diferentes adjuvantes, como Havlogen®, Polygen®, Havlogen + Bay R-1005 e Montanide ISA 773, apresentando assim um dos primeiros trabalhos relacionados ao controle do parasito a partir da vacinação.

A única vacina já disponível no mercado foi a Bovilis® Neoguard (Intervet), a qual era composta por lisado de taquizoítos com adjuvante SPUR®, e que apresentou resultados como a diminuição em torno de 50% dos casos de aborto em determinado rebanho na Costa Rica (FRANKENA; ROMERO; PE, 2004), porém, apresentou em novo estudo o aumento da chance de morte embrionária precoce e normalmente não impedia a infecção fetal ou placentária em vacas vacinadas (INNES et al., 2002; MONNEY; HEMPHILL, 2014; WESTON; HEUER; WILLIAMSON, 2012). A partir destes e outros estudos, a vacina foi removida do mercado em alguns países. Os problemas relacionados a uma vacina inativada para induzir proteção podem ser explicados pela variedade de antígenos presentes em *N. caninum*, ao passo que alguns antígenos são responsáveis por modular uma resposta imune protetora a favor do hospedeiro, outros possuem efeito contrário, favorecendo a invasão pelo parasito e causando danos ao hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013).

2.5.1. Vacinas atenuadas

Na busca por vacinas contra a Neosporose, são estudadas também vacinas vivas, as quais apresentam em sua formulação cepas menos virulentas do parasito ou geneticamente modificadas. Como destacado por Hecker et al. (2012), a proteção fornecida por este tipo de vacinas as tornam importantes ferramentas no combate à doença, contudo, encontram-se limitações pela possibilidade de gerarem infecções crônicas com posterior transmissão vertical. Dois isolados, Nc-Nowra (MILLER et al., 2002) e Nc-Spain 1H (ROJO-MONTEJO et al., 2009), foram identificados como menos virulentos e quando testados em camundongos apresentaram menor patogenicidade, onde em alguns casos não eram observados sinais clínicos ou mortes resultantes da doença (HECKER et al., 2012; ROJO-MONTEJO et al., 2009). Outras abordagens como o isolamento de mutantes sensíveis a temperatura, a irradiação de taquizoítos por raios gama, a atenuação por sucessivas passagens em cultura celular e a manipulação genética do parasito, resultam em candidatos ao seu controle (MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011; RAMAMOORTHY et al., 2006; LINDSAY et

al., 1999). Com engenharia genética, Hernandez et al. (2011) apresentam uma abordagem interessante, na qual possuíram sucesso na geração de taquizoítos que expressam constitutivamente NcSAG4, um importante e específico antígeno de bradizoítos. Dessa forma, obteve-se uma cepa com baixa persistência no cérebro de ratos, e sendo capaz de induzir resposta imune contra NcSAG4 de modo prévio ao estágio encistado do parasito.

2.5.2. Vacinas utilizando vetores biológicos

Vetores biológicos como Herpesvirus e Vaccinia virus carreadores de sequências proteicas recombinantes despertam o interesse de pesquisadores, pois estes se demonstraram eficazes contra a infecção por protozoários (HECKER et al., 2012). Nishikawa et al. (2011) construíram vetores (Vaccinia virus), expressando NcSRS2 e NcSAG1, duas das mais importantes proteínas envolvidas na invasão da célula hospedeira. Camundongos vacinados com estes vetores apresentaram altos níveis de anticorpos IgG1 antes e durante o desafio com *N. caninum* e, além disso foram responsáveis por conferir um padrão de resposta imune eficaz e protetora contra este parasito (HECKER et al., 2012; NISHIKAWA et al., 2000, 2001). *Brucella abortus* atenuada (cepa RB51) também foi apresentado por Ramamoorthy et al. (2007) como vetor, expressando individualmente cinco antígenos imunodominantes de *N. caninum*: MIC1, MIC3, GRA2, GRA6 e SRS2. Naquele estudo, com a vacinação e posterior desafio de camundongos C57BL/6, estas proteínas testadas individualmente ou em associação apresentaram resultados muito satisfatórios, como a proteção a níveis de 90% com RB51-SRS2 e 100% para RB51-GRA6. Foi evidenciado também a capacidade de induzir uma resposta imune celular predominante e possível utilização destes vetores para o controle de duas doenças bovinas abortivas importantes, a Neosporose e a Brucelose (RAMAMOORTHY et al., 2007). Porém, para a utilização de vetores biológicos, principalmente os vírus, é necessário um alto nível de segurança biológica e que estes vetores possuam sua patogenicidade eliminada ou reduzida, para que não sejam capazes de desenvolver danos ao organismo imunizado (URA; OKUDA; SHIMADA, 2014).

2.5.3. Vacinas de DNA

Vacinas baseadas em plasmídeos contendo sequências de antígenos de patógenos se unem a lista de alvos para o desenvolvimento de um método de controle da Neosporose. Monney et al. (2011) montou associações (quimeras) entre três diferentes proteínas NcMIC1, NcMIC3 e NcROP2, utilizando partes consideradas mais imunogênicas e construindo quatro diferentes sequências para expressão: NcMIC3E-NcMIC1E, NcROP2E-NcMIC3E-NcMIC1E, NcMIC3E-NcROP2E-NcMIC1E, NcMIC3E-NcMIC1E-NcROP2E. Mesmo contendo as mesmas partes destes antígenos, a associação na forma NcMIC3E-NcMIC1E-NcROP2E apresentou uma resposta imune protetora de 100%, a qual não foi induzida da mesma forma pelas outras quimeras supracitadas, que não induziram proteção acima de 70%. Ambas construções estimularam uma resposta baseada em IL-4 durante a vacinação, e posteriormente ao desafio com o parasito, houve a mudança para uma resposta baseada em IFN- γ . Cannas et al. (2002), a partir da vacinação de camundongos com vacinas de DNA contendo NcSRS2 ou NcSAG1, juntamente de um implemento de SRS2 (rSRS2) e SAG1 (rSAG1) recombinantes respectivamente, obtiveram proteção com níveis de 60%-75% de camundongos desafiados com *N. caninum*. Outros pesquisadores, como Zhao et al. (2009), também utilizaram a sequência gênica de NcSRS2 em uma vacina de DNA e testes em camundongos BALB/C, obtendo como resposta a indução de imunidade baseada em linfócitos T CD8⁺, um aumento nas concentrações de óxido nítrico no plasma sanguíneo e nos níveis de IL-2 e IFN- γ , entretanto foi obtida resposta humoral fraca. Liddell et al. (2003) construíram plasmídeos para expressão de duas diferentes proteínas, NcGRA7, pertencente aos grânulos densos de taquizoítos e NcsHSP (*small heat shock protein*), proteínas relativamente pouco estudadas porém com expressão altamente regulada durante o desenvolvimento do parasito.

2.5.4. Vacinas de subunidades recombinantes

A partir do desenvolvimento dos processos biotecnológicos, a expressão de peptídeos recombinantes em sistemas de expressão como plantas, vírus, fungos, bactérias, células de inseto e de animais, desperta o interesse de pesquisadores para sua utilização como vacinas de subunidade, aquelas em que contenham um ou mais

peptídeos pertencentes ao agente patológico estudado. Estes peptídeos são escolhidos de acordo com a seleção entre candidatos que melhor estimulam o sistema imune (DINIZ; FERREIRA, 2010). A utilização de peptídeos isolados (que contenham epítomos importantes para a resposta imunológica) como vacinas pode estimular resposta protetora sem efeitos ou reações imunes antagônicas causadas por outras estruturas do patógeno. Unido a isto existe a possibilidade do estudo das respostas produzidas pelo sistema imune de acordo com cada peptídeo testado, e ainda, das associações (frações peptídicas fusionadas) que podem levar a respostas melhores destes antígenos vacinais (MONNEY et al., 2011; STA; HANSSON, 2000). *Escherichia coli* constitui o principal sistema de expressão procariótico e, normalmente, sua utilização é uma das primeiras abordagens para a produção de proteínas recombinantes, sendo atualmente uma referência como plataforma de expressão em atividades comerciais (CHEN, 2012).

A imunização de cobaias com peptídeos do parasito expressos de forma recombinante tornou-se uma das principais ferramentas para análises de proteção e soroconversão a partir destas frações. Debache et al. (2010) produziram três diferentes proteínas recombinantes de *N. caninum* em *E. coli*: NcPDI (rNcPDI), NcROP2 (rNcROP2) e NcMAG1 (rNcMAG1). Estas proteínas foram inoculadas de forma intranasal e intraperitoneal, buscando assim avaliar qual destas seria a melhor para a administração do imunógeno de acordo com a proteção frente ao desafio a que camundongos C57B1/6 foram submetidos. As análises foram feitas a partir dos 20 dias após o desafio. Na análise destes dados, sugere-se uma grande importância do estudo da via de imunização, pois rNcPDI administrado de forma intraperitoneal apresentou 20% de proteção após 20 dias do desafio, enquanto a partir da administração intranasal, esta mesma proteína conferiu proteção de 90%. De maneira inversa, aos 28 dias após o desafio, rNcMAG1 apresentou proteção de 10% quando inoculada via intranasal e 50% quando aplicada via intraperitoneal. A proteína rNcROP2 conferiu níveis de proteção que se mantiveram entre as vias de inoculação, acima de 60% de camundongos desafiados (após 28 dias do desafio).

Uchida et al. (2013) utilizaram o mesmo sistema de expressão (*E. coli*) para obter quatro proteínas recombinantes de bradizoíto: NcBAG1 (rNcBAG1), NcBSR4 (rNcBSR4), NcMAG1 (rNcMAG1) e NcSAG4 (rNcSAG4). Camundongos foram vacinados com duas doses em grupos separados de acordo com a proteína testada

e, após cinco semanas, foram desafiados com taquizoítos de *N. caninum*. Os grupos vacinados com rBAG1, rMAG1 e rNcSAG4 demonstraram poucos ou moderados sinais clínicos da doença, enquanto aqueles vacinados com NcBSR4 não desenvolveram proteção significativa, desenvolvendo a doença de forma severa. Dentre os diversos trabalhos publicados utilizando proteínas recombinante de *N. caninum* como imunógenos individuais ou testes de diagnóstico, NcSRS2 destaca-se como um dos principais focos de pesquisa (CANNAS et al., 2003; OTSUKI et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; PINITKIATISAKUL et al., 2007; TUO et al., 2011), demonstrando alta proteção de camundongos diante de desafios com o parasito.

2.6. Vacinologia Reversa

Uma abordagem *in silico*, isto é, através de simulações computacionais, para a busca por frações imunogênicas de subunidades pode ser mais interessante do que a busca de efetividade em vacinas tradicionais atenuadas ou inativadas. Com este tipo de análise, é possível prever quais proteínas, dentre as diversas presentes no parasito, serão capazes de estimular uma atividade desejada pelo sistema imune, a partir de epítopos de linfócitos T que possam se ligar ao complexo de histocompatibilidade (MHC), ou sejam proteínas de superfície ou secretadas que contenham epítopos de células B (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2014). A pesquisa utilizando diretamente a cultura dos patógenos possui algumas limitações, como a dificuldade e risco deste cultivo para o pesquisador, a possível diferença entre a expressão de proteínas *in vivo* durante a infecção e *in vitro*, o que pode resultar na não identificação de algumas proteínas importantes durante este processo (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2012). A disponibilização de várias sequências de microrganismos em bancos de dados criou a estrutura necessária para a “Vacinologia Reversa” que, utilizando análises *in silico*, supõe proteínas-alvo que contenham epítopos importantes na indução de uma resposta imune pelo hospedeiro (RAPPUOLI, 2001). Como analisado por Monney et al. (2011), com base em *softwares* que predizem regiões hidrofílicas, flexibilidade, acessibilidade, folhas pregueadas β , exposição de superfície proteica, polaridade, propensão a antigenicidade e ser espécie-específico, a porção de NcROP2 que contém 168 aminoácidos (do aminoácido 191 ao 359) representa uma região imunogênica importante para o estudo da resposta gerada pelo hospedeiro.

O sequenciamento do genoma e transcriptoma de taquizoítos de *N. caninum* cepa Liverpool como executado por Reid et al. (2012), auxiliam no descobrimento de novos peptídeos-alvo para síntese ou expressão de forma recombinante. Utilizando métodos *in silico*, pode-se promover a comparação com diferentes microrganismos em busca de similaridades e diferenças, como o executado no estudo de REID et al. (2012), entre *N. caninum* e *Toxoplasma gondii*. O potencial dos -omas (genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma) é reconhecido e utilizado como ferramenta no entendimento de patógenos e na busca de vacinas e alvos para medicamentos. As informações disponíveis sobre o parasito revelam que cepas de *N. caninum* são extremamente similares, contudo possuem diferenças significativas no comportamento do parasito, como principalmente na virulência (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

3 Objetivos

3.1. Objetivo geral

O trabalho apresentado visou realizar a clonagem do fragmento de DNA e a expressão da região entre os aminoácidos 191 a 359 da proteína NcROP2, para que, no futuro, esta possa ser avaliada como um imunógeno e/ou componente de teste imunodiagnóstico para Neosporose.

3.2. Objetivos específicos

- Amplificar a sequência parcial do gene de NcROP2 e cloná-la em vetor plasmidial
- Expressar e purificar a proteína recombinante rNcROP2.
- Caracterizar a proteína expressa e avaliar sua antigenicidade frente a soros de animais naturalmente infectados por *N. caninum*.

4 Metodologia

4.1. Desenho dos iniciadores

Para obter a sequência de DNA pertencente ao gene de NcROP2 foram desenhados os seguintes iniciadores (*primers*) construídos no *software* Vector NTI Advance™ (Invitrogen) demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificar a sequência de NcROP2

Iniciador	Sequência	Temperatura de anelamento
Senso	5'-AGACTCGAGCTGCGACCAGGCCA-3'	67,9°C
Anti-senso	5'-CTCAAGCTTGGCGTGTTAGTCGGG-3'	64,6°C

O iniciador senso possui o sítio CTCGAG, de reconhecimento da enzima de restrição *Xho*I (New England Biolabs®), enquanto o anti-senso possui AAGCTT, sequência reconhecida e clivada pela enzima de restrição *Hind*III (New England BioLabs®).

4.2. Amplificação do fragmento de NcROP2 a partir de DNA de *N. caninum*

A análise *in silico* da sequência de 2.278pb do gene que codifica NcROP2, demonstrou a localização do fragmento e dos sítios de ligação dos iniciadores construídos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) buscou a amplificação de uma sequência de 168 aminoácidos (505 pb), a qual compreende a região imunodominante da proteína NcROP2.

A PCR foi realizada com DNA extraído de taquizoítos de *N. caninum* da cepa Nc-1, disponível no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da UFPel. A técnica foi executada utilizando *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), com desnaturação inicial a 95°C por 5min, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 59°C por 45s e extensão a 72°C por 45s; extensão final por 10min a 72°C. A amplificação da sequência parcial de DNA de NcROP2 foi confirmada através da eletroforese utilizando gel de agarose 1%, a 100V em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) durante 1h30min. A banda referente a sequência

foi extraída diretamente do gel de agarose, sendo posteriormente purificada utilizando o kit *Nucleic Acid and Purification Nucleospin* (MACHEREY-NAGEL).

4.3. Construção e clonagem do plasmídeo pAE/NcROP2

O plasmídeo pAE, vetor presente na Biblioteca de Plasmídeos do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) (Figura 1), foi utilizado para clonagem do inserto, na construção pAE/NcROP2. Este plasmídeo, utilizado para expressão de proteínas em *E. coli*, confere resistência ao antibiótico ampicilina e é responsável por adicionar 6 aminoácidos histidina (6xHis) à proteína produzida, facilitando posteriormente sua purificação.

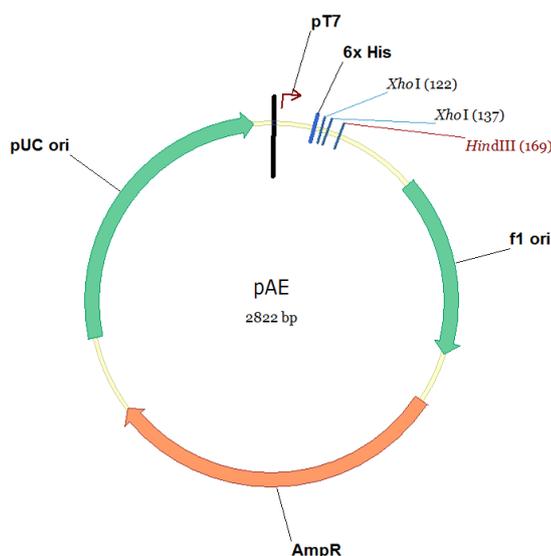


Figura 1 – Estrutura do plasmídeo pAE

Para confirmação da amplificação da sequência correta referente ao fragmento de 505pb, foi realizada a digestão com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs®), que cliva na posição 127pb, com produto de dois fragmentos de aproximadamente 120pb e 390pb. O resultado da restrição enzimática foi aplicado em gel de agarose 2% para eletroforese durante 2h30min, a 80V.

O plasmídeo e o inserto (fragmento de 505pb) foram submetidos a digestão com as enzimas disponíveis comercialmente *XhoI* e *HindIII* (New England BioLabs®), separadamente, em período de 16h a 37°C. Na análise da restrição destes sítios, foi aplicada eletroforese em gel de agarose 1%, durante 1h30min a 100V. A digestão do

inserto com estas enzimas possibilitou que suas extremidades se tornassem coesivas, isto é, que fossem complementares aos sítios criados pela digestão do plasmídeo. Para a ligação, foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (Ludwig), durante 4h a 16°C.

Após a ligação inserto/plasmídeo, procedeu-se a transformação da cepa TOP10F de *E. coli*. Baseando-se na técnica de SAMBROOK; RUSSEL (2001), a transformação foi feita por choque térmico, utilizando 100µL de CaCl₂ (100mM), uma colônia de placa de cultivo contendo *E. coli* TOP10F e pAE/NcROP2. A amostra foi mantida em gelo por 20min, em seguida incubou-se por 1min a 42°C e posteriormente 2min em gelo, para que ocorra o choque térmico com estas oscilações de temperatura. A transformação foi cultivada em meio LB ágar com o antibiótico ampicilina (100µg/mL). O cultivo foi mantido por 16h a 37°C. As colônias que cresceram na placa foram cultivadas em 1mL de meio LB líquido com ampicilina, por 16h a 37°C. Os cultivos foram centrifugados por 3min a 12.000xg e o *pellet* de células formado foi submetido a técnica *MicroPrep* (JOUGLARD et al. 2002), uma extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1%, 100V por 1h. Os clones que apresentaram tamanho superior quando comparado com o vetor intacto, foram cultivados em 10mL de meio LB líquido com 100µg/mL de ampicilina, por 16h a 37°C e agitação de 150rpm. A extração plasmidial foi realizada de modo adaptado de SAMBROOK; RUSSEL (2001), através de lise alcalina. Para confirmar a presença do inserto (NcROP2) nos plasmídeos recombinantes, foi realizada a técnica de PCR com os mesmos parâmetros já citados, e o produto da amplificação foi encaminhado para sequenciamento junto a empresa ACTGene Análises Moleculares.

4.4. Expressão de rNcROP2

A construção pAE/NcROP2 confirmada pelo sequenciamento foi utilizada para transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 StarTM e cepa *E. coli* OverExpress C41 (DE3) pela técnica descrita em SAMBROOK; RUSSEL (2001). A avaliação da expressão foi realizada em 10mL, partindo de um pré-inóculo de 3mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina 100µg/mL, a 37°C por 16h e com agitação de 150 rpm. Após este período, o volume dos cultivos foi aumentado para 10 mL suplementado com ampicilina 100µg/mL. Incubado durante 1h30min para atingir densidade óptica DO_{600nm} de 0,6 (fase *log*) para indução da expressão da proteína

recombinante por 3h a 37°C e agitação de 150rpm. Destes cultivos foram extraídos 1mL antes da indução e 1mL após às 3h de indução com IPTG (Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo). As amostras foram centrifugadas a 12000xg por 3min, suspendidas em 80μL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e submetidas a SDS-PAGE 15%.

Utilizando os dados fornecidos pelo SDS-PAGE das expressões em pequena escala, a cepa BL21 Star™ foi utilizada para a expressão em maior escala, a partir da qual houve a extração e purificação de rNcROP2. O plasmídeo pAE/NcROP2 foi novamente transferido para cepa BL21 Star™ através da técnica de choque térmico. A transformação foi propagada em 25mL de meio LB líquido contendo 100μg/mL de ampicilina, sendo este o pré-inóculo cultivado por 16h a 37°C com agitação de 150rpm. Posteriormente o pré-inóculo foi transferido para 225mL de meio LB líquido (completando os 250mL de meio de cultivo), que continha ampicilina na concentração de 100μg/mL até que alcançasse uma DO_{600nm} de 0,6, correspondendo a metade da fase *log* de crescimento bacteriano. Assim, após a retirada de 1mL de amostra, o cultivo foi induzido com 0,5mM de IPTG, por 3h e 30min a 37°C com agitação constante de 150rpm.

4.5. Purificação de rNcROP2

O *pellet* de células obtido através da centrifugação foi suspenso em 25mL de tampão de lise Akta Wash (NaH₂PO₄ 0,2M; NaCl 0,5M; Imidazol 10mM) e incubado por 1h a 4°C com lisozima 100μg/mL. Logo a incubação, a amostra foi sonicada com ciclos de 15s de 60Hz, centrifugada novamente por 15min a 8.000xg e o sobrenadante do processo foi armazenado a 4°C. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 25mL de tampão de solubilização Akta Wash com uréia (NaH₂PO₄ 0,2M; NaCl 0,5M; Ureia 8M; Imidazol 10mM) e incubado a 4°C por 24h sob leve agitação. O processo de solubilização ocorre pois, normalmente, são formados corpos de inclusão intracitoplasmáticos, ou seja, agregados densos de proteínas com conformação parcial e insolúveis, resultantes de altos níveis de expressão proteica pelas células. Assim, após o período de solubilização com o tampão contendo uréia, procedeu-se a centrifugação a 8.000xg, 4°C por 15min, para avaliar a presença da proteína recombinante no sobrenadante, o que confirma que houve a expressão de rNcROP2

de maneira insolúvel. Após este processo, as amostras foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE 15%.

A amostra no tampão de solubilização foi filtrada com membrana com *cut off* de 0,3 μ M para a retirada de restos celulares antes da purificação. Após a filtração, a amostra foi submetida a cromatografia de afinidade com o uso da coluna de níquel HisTrap TALON[®], a qual permite a ligação entre íons de níquel imobilizados e a cauda de poli histidina da proteína recombinante e, inseridos pelo vetor pAE. A proteína foi recuperada em todas as frações do tampão Akta Wash com Uréia acrescido de 500mM de imidazol. Após este processo as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15%.

As frações obtidas na eluição passaram por diálise em tampão PBS durante 36h, sendo este trocado até atingir a concentração de 1M de uréia na amostra. A concentração das frações foi realizada utilizando método de osmose por 3h. Posteriormente as amostras da proteína rNcROP2 foram quantificadas através da comparação com concentrações conhecidas de Albumina Séria Bovina (BSA) em SDS-PAGE e armazenadas a 4°C.

4.6. Caracterização de rNcROP2

Foi utilizado a técnica de *Western blot* para caracterização da rNcROP2 purificada quanto ao seu tamanho e característica antigênica. Inicialmente as amostras da rNcROP2 foram submetidas a SDS-PAGE por 2h30min a 100V. Logo, utilizando o gel de poliacrilamida, as amostras foram eletrotransferidas a 30V, 90mA, por 1h para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). Após a transferência a membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado 5%, diluído em PBS-T (*phosphate buffered saline* + 0,05% de *Tween* 20). Para detecção da cauda de poli histidina presente na proteína recombinante, foi utilizado anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis, por 1h, na diluição 1:5.000 em PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de camundongo) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na mesma diluição. Para revelação da reação foi utilizado 6 μ g de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução contendo Tris HCl 50mM, Sulfato de Níquel 0,3% e 100 μ L de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

A técnica de *Western blot* foi utilizada para verificar a antigenicidade da proteína recombinante produzida, com o uso de soro bovino naturalmente infectado por *N. caninum*, na diluição de 1:300 em PBS-T. O anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de bovinos) conjugado (Sigma-Aldrich), na diluição de 1:3.000 em PBS-T. A reação foi revelada com DAB.

5 Resultados

5.1. Construção dos iniciadores

A análise a partir do desenho *in silico* no *software* Vector NTI Advance™ (Invitrogen), demonstrou a região a ser amplificada (Figura 2. A). Como analisado, esta região apresenta 505pb, codificando uma proteína com 168 aminoácidos (Figura 2. B).

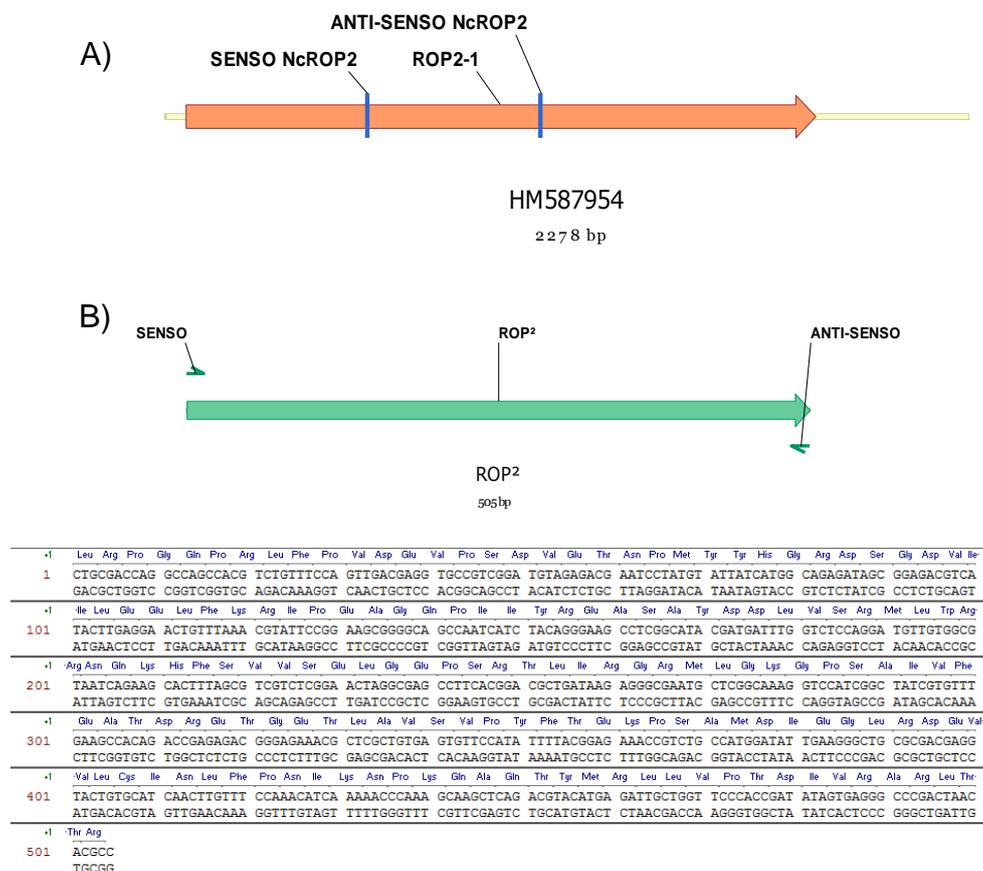


Figura 2 - A) Porção a ser amplificada a partir da sequência total de NcROP2. B) Análise *in silico* do fragmento de 168 aminoácidos.

5.2. PCR

Ocorreu a amplificação do fragmento esperado, o produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose, apresentando o tamanho predito de 505pb (Figura 3).

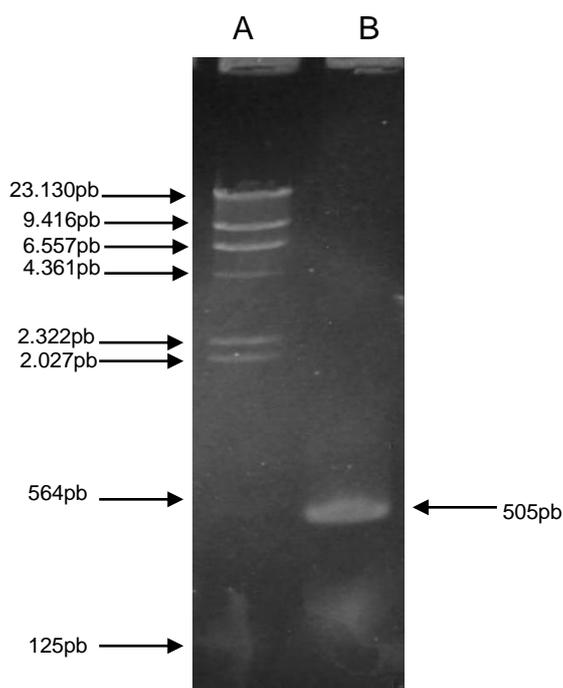


Figura 3 – Eletroforese da PCR do gene NcROP2 em gel de agarose 1%. A) Marcador de peso molecular *Lambda DNA-HindIII Digest* (Invitrogen), B) Amplificação do fragmento de DNA do gene da NcROP2 que codifica para a região entre os aminoácidos 191-359.

5.3. Clonagem

O produto da PCR submetido a restrição apresentou clivagem, confirmando a presença do sítio da enzima *PmeI* e possivelmente do fragmento objetivado (figura 4. A). A clonagem do fragmento de DNA de NcROP2 no plasmídeo pAE foi simulada inicialmente *in silico*, utilizando-se o software Vector NTI Advance™ (Invitrogen) gerando um plasmídeo de 3.286pb (Figura 4. B).

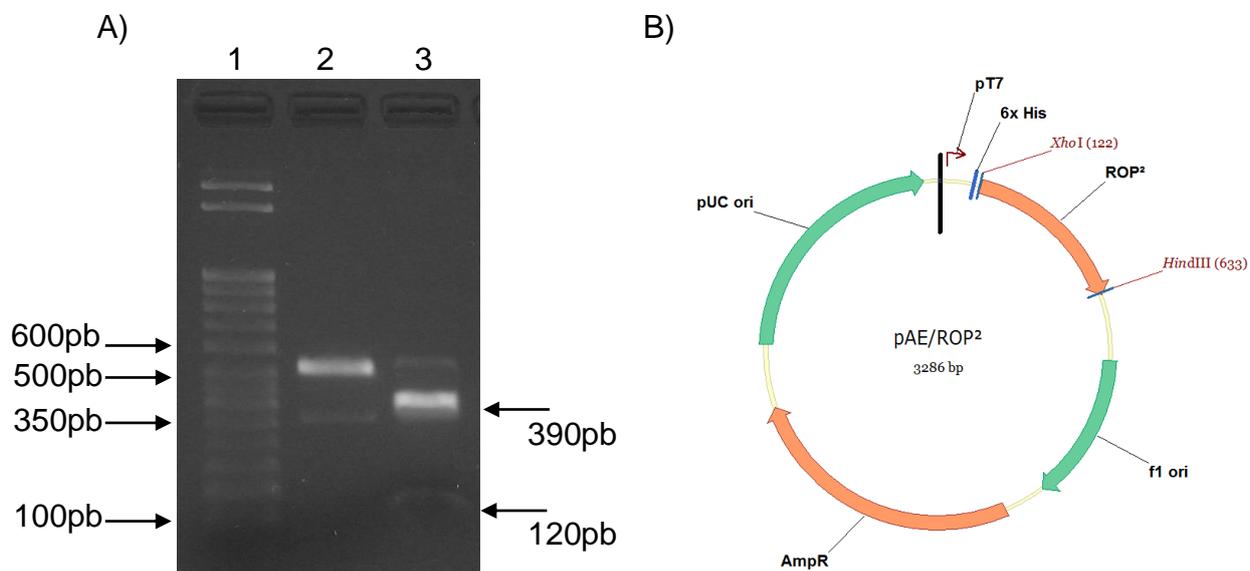


Figura 4 – A) Eletroforese em gel de agarose 2%, contendo a digestão do fragmento de NcROP2 com *PmeI*. A clivagem separa a sequência em duas porções menores, uma com aproximadamente 120pb e outra com 390pb; 1) Marcador de peso molecular *DirectLoad™ Step Ladder 50pb*, 2) Fragmento de NcROP2 controle, 3) Fragmento clivado, apresentando as duas bandas menores das frações. B) Estrutura do plasmídeo pAE/NcROP2.

5.4. Seleção dos plasmídeos recombinantes

O produto da ligação entre NcROP2 e vetor pAE foi transformado em cepa de *E. coli* TOP10F para identificar em quais das colônias o plasmídeo mantém o gene inserido na construção. Na extração de plasmídeos das colônias, foi verificado em duas destas um padrão de peso molecular dos plasmídeos superior ao controle (pAE intacto) (Figura 5). Sugerindo que nestes ocorreu a inserção do gene.

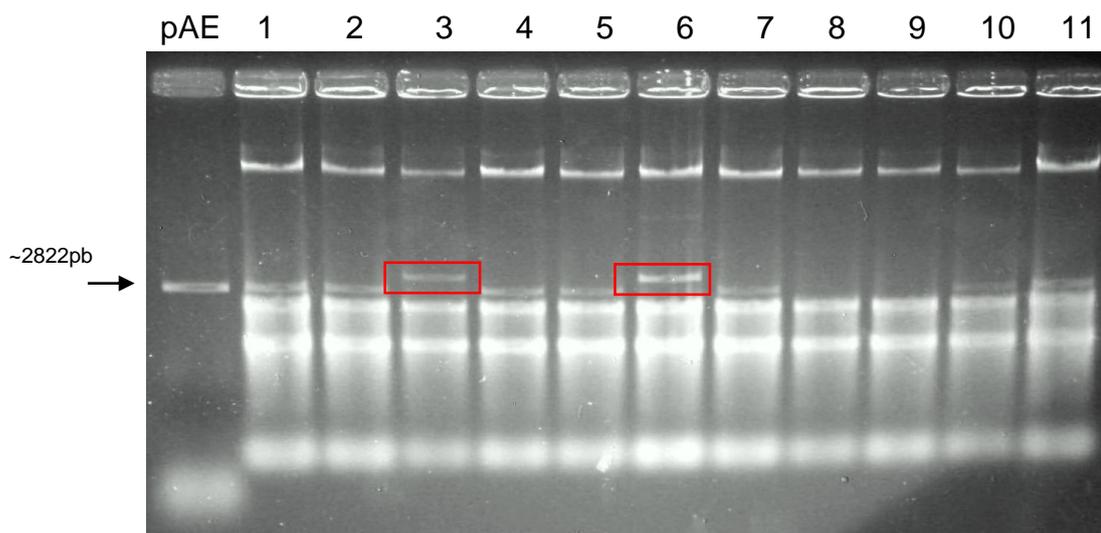


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o resultado da extração plasmidial de 11 clones de *E. coli* que cresceram em meio de cultivo suplementado com ampicilina. A primeira coluna possui o plasmídeo intacto, dessa forma sendo o controle como base para comparação. Apenas o clone da coluna 3 e 6 foram considerados como plasmídeos pAE/NcROP2 (destacados nos quadros vermelhos).

A presença do fragmento do gene de NcROP2 na construção do plasmídeo foi confirmada pela PCR utilizando os iniciadores Senso e Anti-Senso construídos. O produto amplificado a partir do plasmídeo apresenta o mesmo tamanho do fragmento obtido de DNA de taquizoitos, comprovando que ocorreu a clonagem e inserção correta no plasmídeo (Figura 6). O produto da PCR foi encaminhado para a empresa ATC Análise e o *contig* formado foi usado na pesquisa utilizando a ferramenta BLAST® (*Basic Local Alignment Search*) onde apresentou 99% de identidade com a sequência do gene de NcROP2 de *N. caninum*, número de acesso HM587954.

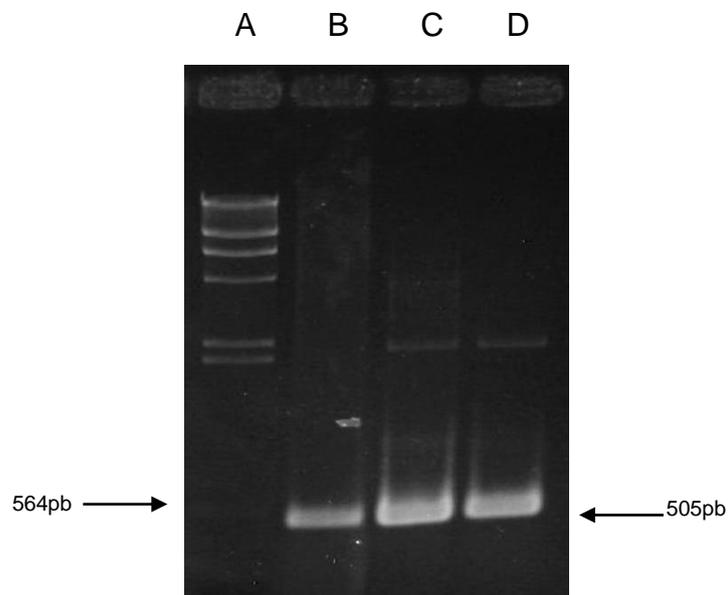


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmação dos clones pAE/NcROP2. A) Marcador molecular *Lambda DNA-HindIII Digest* (Invitrogen), B) Fragmento NcROP2 amplificado inicialmente a partir do DNA de taquizoítio, como controle de amplificação da região, C) PCR do clone da coluna 3, D) PCR do clone da coluna 6.

5.5. Expressão da rNcROP2

A proteína rNcROP2 foi expressa em 10mL e 250mL pela cepa “BL21 StarTM”, utilizando uma indução de IPTG na concentração de 0,5mM por 3h30mim. Em ambas as cepas testadas pode-se observar que a proteína apresenta um tamanho de aproximadamente 20kDa e sua expressão começa mesmo antes da indução (figura 7).

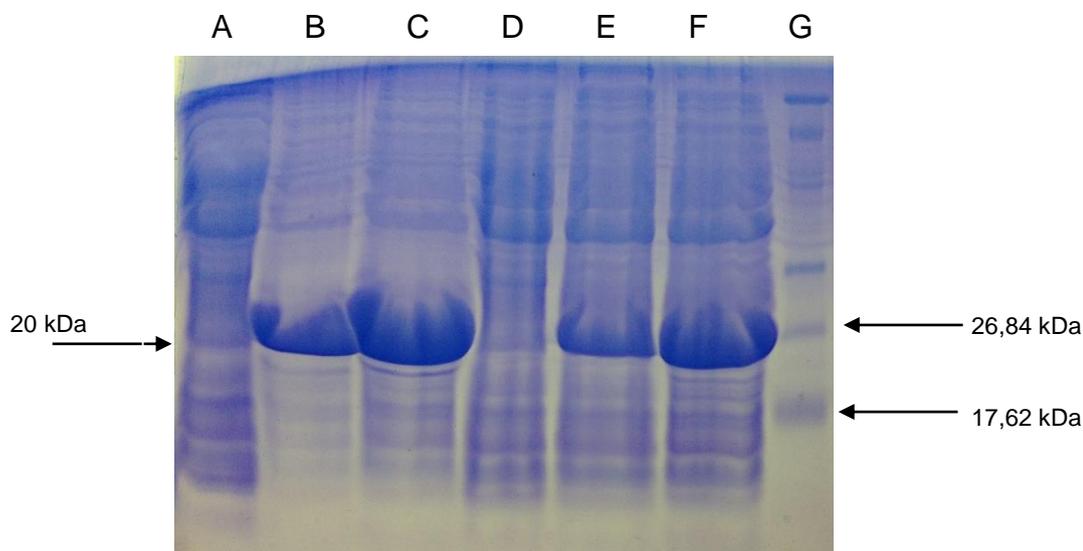


Figura 7 – SDS-PAGE da expressão em 10mL. A) *E. coli* BL21 Star™ não transformada, para controle, B) *E. coli* BL21 Star™ antes da indução, C) *E. coli* BL21 Star™ após a indução com IPTG, D) *E. coli* OverExpress C41 (DE3) não transformada com o plasmídeo (controle), E) *E. coli* OverExpress C41 (DE3) antes da indução, F) *E. coli* OverExpress C41 (DE3) após a indução com IPTG, G) Marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range* (Bio-Rad).

A proteína rNcROP2 foi expressa utilizando a cepa *E. coli* BL21 Star™ em 250mL de meio líquido, no entanto se mostrou insolúvel. Apenas o tampão Akta Wash não foi suficiente para solubilizar a proteína de interesse, dessa forma foi necessária a utilização de agente desnaturante (uréia a 8M) para solubilização e liberação dos corpos de inclusão (Figura 8).

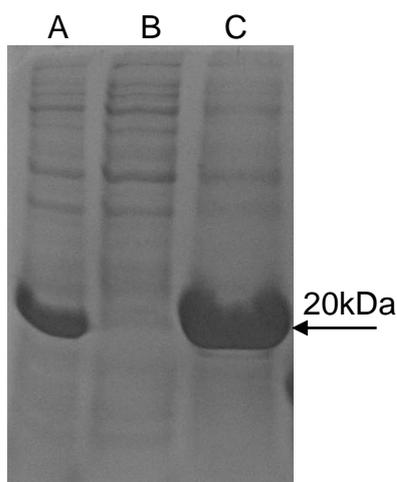


Figura 8 – SDS-PAGE que confirma a expressão de rNcROP2 e sua obtenção na fração solubilizada com o tampão com uréia. A) Amostra do cultivo após a indução da expressão com IPTG, B) Amostra em tampão sem uréia, C) Amostra contendo a proteína em tampão com 8M de uréia.

5.6. Purificação e Caracterização

A fração da proteína eluída em tampão Akta Wash com uréia foi filtrada e em seguida purificada por cromatografia de afinidade. A figura 9.A apresenta resultados da purificação, evidenciando que todas as frações obtidas apresentaram a proteína com mais de 90% de pureza. Em algumas frações foi verificada a formação de agregados proteicos. As alíquotas da purificação passaram a ser concentradas e a quantificação foi estimada pela comparação com amostras de Albumina Sérica Bovina (BSA) de concentração já conhecida, onde identificou-se o rendimento de 3,7 mg/L (figura 9.B).

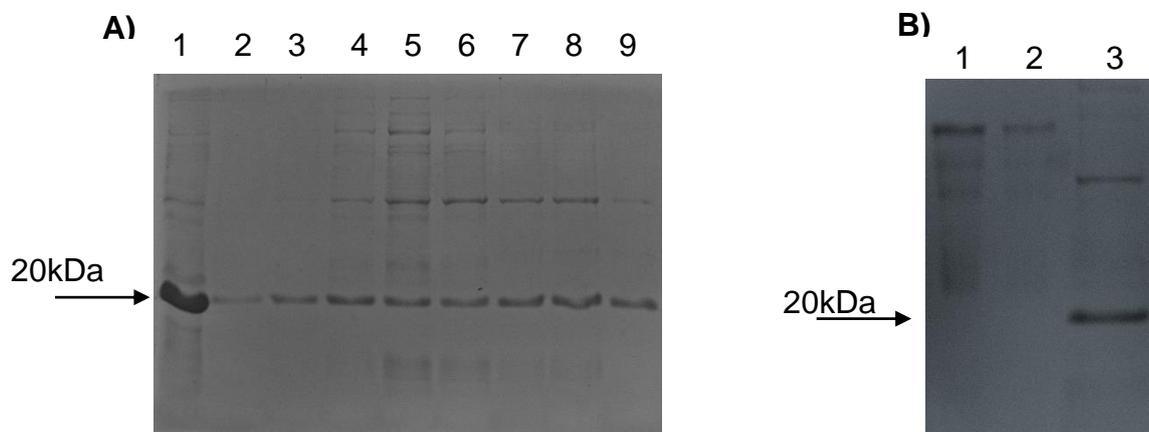


Figura 9 – Na imagem A, SDS-PAGE das amostras da purificação. Na coluna 1, amostra em Akta Wash com uréia que serve como padrão para o peso molecular do fragmento de rNcROP2, enquanto nas

colunas 2 a 9 estão as amostras purificadas da proteína recombinante. As amostras consideradas mais puras foram unidas e utilizadas para a análise de concentração utilizando SDS-PAGE, o que é evidenciado pela imagem B, onde na coluna 1 foi aplicada 1 µg de BSA [0,25µg/mL], na coluna 2, 0,5µg de BSA [0,25µg/mL] e na coluna 3 a amostra obtida da purificação (15µL).

Na técnica de *Western blot*, anticorpos anti-His e soro bovino naturalmente infectado por *N. caninum* foram usados para caracterizar a proteína produzida. Com ambos os soros, evidenciou-se reação positiva para rNcROP2, com tamanho aproximado de 20kDa. A reação com o anticorpo anti-histidina foi evidente, comprovando que o plasmídeo pAE foi eficaz na adição das histidinas à proteína recombinante expressa (Figura 10.A). A reação positiva frente ao soro bovino naturalmente infectado com o parasito demonstrou o caráter antigênico da proteína recombinante (figura 10.B).

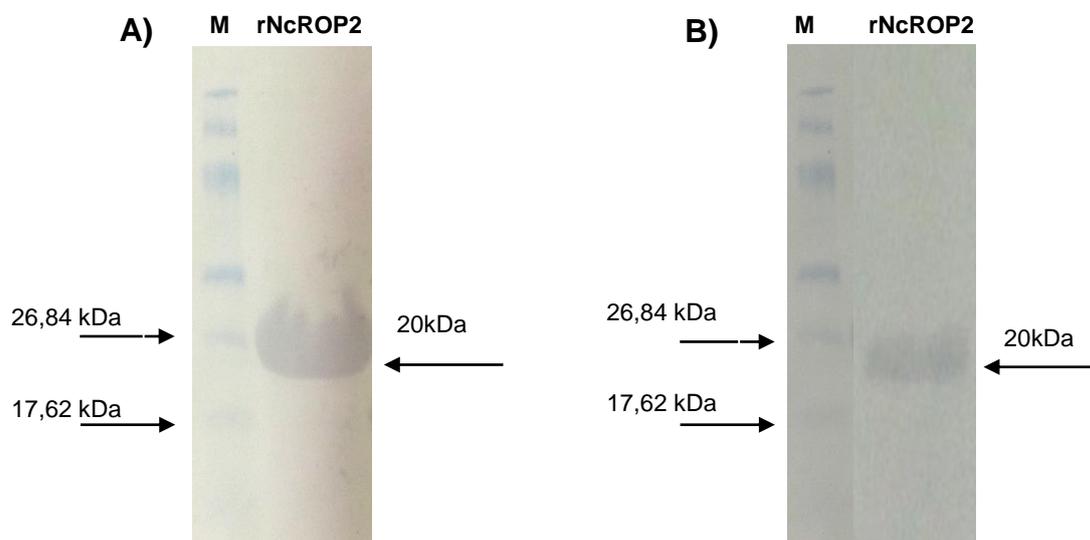


Figura 10 – Na imagem A, *Western blot* com anticorpos anti-histidina; na primeira coluna há o marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range* (Bio-Rad) e ao lado a amostra de rNcROP2. Na imagem B, *Western blot* com soro de bovino naturalmente infectado com *N. caninum*, que reconheceu epítomos da proteína recombinante expressa, confirmando sua antigenicidade. Na primeira coluna há o marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range* (Bio-Rad) e, ao lado, amostra de rNcROP2.

6. Discussão

A produção de proteínas recombinantes é um campo extremamente vasto. A constante descoberta de novas proteínas estimula a busca pelo conhecimento de suas funções, demandando novas abordagens para sua produção a partir da clonagem das sequências de DNA que as codificam no genoma do organismo ao qual pertencem, visando a obtenção em quantidade e qualidade suficientes para análise bioquímica e estrutural (CHEN, 2012).

Na avaliação destas proteínas é importante um sistema de expressão adequado que possa produzir de forma recombinante a proteína ou a porção peptídica de interesse. A bactéria gram-negativa *E. coli*, microrganismo amplamente estudado e bem estabelecido na área de expressão de proteínas, apresenta algumas vantagens para este processo, como: sua cinética de crescimento é rápida, cultivada em meios comercialmente disponíveis e a transformação com DNA exógeno é simples (ROSANO; CECCARELLI, 2014)

Sequências de DNA que codificam para proteínas de *Neospora caninum* e determinantes antigênicos estão distribuídos em todo o genoma e participam da conformação estrutural do parasito, podendo ser alvos para testes de imunodiagnóstico ou desenvolvimento de vacinas (PINITKIATISAKUL, 2007). Os estudos destes alvos vacinais tem se dado em torno de proteínas de superfície e antígenos de secreção e excreção, porém, para a escolha dos melhores alvos na construção de associações peptídicas, deve-se analisar aqueles que poderão melhor estimular uma resposta imunológica baseada no balanço entre Th1/Th2, pois, ao passo que anticorpos neutralizantes são importantes nos momentos iniciais da infecção, a resposta citotóxica é responsável pelo reconhecimento de células infectadas e sua destruição (NISHIKAWA; MIKAMI; NAGASAWA, 2002). Este envolvimento pode ser predito a partir de abordagens *in silico*, em que programas computacionais utilizam parâmetros que revelam a presença de epítomos lineares, estrutura proteica, localização celular no parasito, apresentação via MHC, entre outros (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2014).

As róprias são organelas importantes na estrutura do parasito, pois possuem componentes que a partir de sua exocitose participam da formação da junção motora, na relação direta com o núcleo, e da formação do VP (DUBREMETZ, 2007). Segundo

Alaeddine et al. (2013) o gene da proteína NcROP2 possui níveis similares de transcrição em ambos estágios de bradizoíto e taquizoíto do parasito, sendo uma das principais proteínas das róprias. A utilização de imunoglobulinas produzidas pelo reconhecimento de peptídeos recombinantes de NcROP2, foi capaz de neutralizar parcialmente a invasão de taquizoítos em células *in vitro*. Utilizando modelos murinos, a vacinação com rNcROP2 estimulou a produção de anticorpos IgG2a (relacionado a Th1) e IgG1 (relacionado a Th2), dependendo do adjuvante utilizado para formulação da vacina (ALAEDDINE et al., 2013).

Estudos com porções que contemplam regiões importantes de proteínas deste parasito são perspectivas importantes no conhecimento da indução de resposta imune dirigida para certos peptídeos. Debache et al. (2008) expressaram a porção entre os aminoácidos 238-594, utilizaram-na para vacinação de camundongos e o soro policlonal obtido foi testado contra um extrato de taquizoítos, buscando a confirmação do reconhecimento da proteína. Através da quantificação por qPCR (PCR quantitativo), o desafio com *N. caninum* de animais vacinados resultou em menor carga parasitária cerebral e maiores títulos de anticorpos IgG1 quando comparados aos não vacinados com a porção de NcROP2 (DEBACHE et al., 2008).

Nas combinações das frações das proteínas NcMIC1, NcMIC3 e NcROP2 desenvolvidas por Monney et al. (2011), a associação peptídica na construção NcMIC3E-NcMIC1E-NcROP2E demonstrou a proteção de 100% em camundongos desafiados com taquizoítos de *N. caninum*, enquanto as demais quimeras produzidas não obtiveram os mesmos resultados na indução de uma resposta imune protetora. Isto revela a importância de diversos fatores além da expressão de regiões peptídicas preditas como imunogênicas, como a estrutura tridimensional formada e a superfície exposta de domínios importantes. O estudo utilizou a sequência entre os aminoácidos 191-359, selecionado através de análise *in silico* de padrões como a hidrofobicidade, capacidade antigênica, polaridade, entre outros. De acordo com os resultados obtidos, esta região demonstrou-se interessante alvo para posteriores aplicações em técnicas de imunodiagnóstico e construção de uma vacina para o combate de *N. caninum*.

Nosso grupo de pesquisa expressou o fragmento de 505pb pertencente a sequência gênica da proteína NcROP2, utilizando o plasmídeo pAE e o sistema de expressão procarioto *E. coli*. A amplificação da sequência desejada foi possível pela PCR, em que a temperatura aplicada para anelamento dos iniciadores foi eficaz,

resultando na amostra que foi purificada e utilizada para a clonagem no plasmídeo. De acordo com a fase de leitura, o resíduo de 6 histidinas (conhecido como cauda de poli histidina ou *fusion tag*) adicionado na porção N-terminal do fragmento de NcROP2 pelo plasmídeo, facilita o reconhecimento da proteína recombinante expressa a partir de anticorpos específicos e durante a utilização da coluna de cromatografia de afinidade.

A eficácia do processo de clonagem e transformação foi comprovada pela extração plasmidial que resultou em plasmídeos com maior número de pares de bases que não clonado, através da PCR que amplificou a sequência de 505pb e do sequenciamento que revelou sequência com 99% de identidade com a analisada *in silico*. A cepa BL21 Star™ demonstrou-se capaz de produzir a proteína de interesse em níveis que vão de acordo com os demais trabalhos que utilizam a bactéria, de modo que, mesmo que obtenham-se concentrações baixas desta proteína recombinante, é de fácil manipulação e rápido período de cultivo. Visto que a proteína encontrava-se insolúvel, foi necessário utilizar tampão com o agente desnaturante uréia (8M) para a sua recuperação, confirmada por SDS-PAGE, demonstrando que esta foi produzida com peso próximo aos 20kDa, o que era o esperado. Por ser expressa de modo intracelular pela bactéria e ainda formando corpos de inclusão, outras proteínas estavam presentes na amostra, sendo retirado em torno de 90% destas com o processo de cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel.

O *Western blot* com anticorpos anti-histidina confirmou que o plasmídeo foi capaz de inserir na proteína recombinante a cauda de poli histidina, revelando rNcROP2 através da marcação da membrana de nitrocelulose com o peso molecular de 20kDa. Contudo, era necessário ainda o reconhecimento por anticorpos que reajam com *N. caninum*, já que este é um componente proteico do parasito; o que foi posteriormente realizado utilizando a diluição de soro bovino naturalmente infectado pelo patógeno, que demonstrou também o reconhecimento da proteína recombinante com peso molecular de 20kDa. Assim, entendemos que epítomos importantes mantiveram-se na conformação da proteína recombinante rNcROP2, confirmando esta como um alvo potencial no desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico, como ELISA ou Cromatografia de Fluxo Lateral, e principalmente como componente em vacina de subunidade para o controle da Neosporose.

7. Conclusão

No presente estudo foi possível clonar, expressar e caracterizar um fragmento proteico recombinante de 168 aminoácidos pertencente a proteína NcROP2 de *Neospora caninum* utilizando o sistema de expressão em *E. coli* cepa BL21 Star™.

A obtenção do fragmento de DNA confirmado por PCR, sequenciamento e o SDS-PAGE da proteína expressa revelam que as técnicas aplicadas para a construção do plasmídeo pAE/NcROP2 foram satisfatórias, assim como as etapas de expressão e recuperação após o cultivo da bactéria *E. coli*. As análises de *Western blot* identificaram a obtenção da proteína recombinante e suas características antigênicas.

Como objetivos futuros destacamos a construção de um teste rápido de cromatografia de fluxo lateral, que possa ser utilizado a campo para verificar nos rebanhos bovinos animais positivos para presença de anticorpos anti-*N. caninum* e a elaboração de experimentos de vacinação com a proteína recombinante produzida, utilizando modelos murinos e bovinos.

8. Referências

- ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.1913–1625, 1999.
- ALAEDDINE, F. et al. 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, n. 8, p. 1033–1050, 2013.
- ANDREOTTI, R. Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos. **Documentos/Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, p. 51, 2003.
- BASZLER, T. V. et al. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1635–1646, 1999.
- BECK, J. R. et al. RON5 is critical for organization and function of the *Toxoplasma* moving junction complex. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, 2014.
- BJERKAS, I. et al. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271–274. 1984.
- BJO, C. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 2002.
- BJO, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1497–1507, 1999.
- BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 11–25, 2001.
- BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. . The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546–552, 2002.
- CAMILLO, G. et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, 2011.
- CANNAS, A. et al. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 303–312, 2003.
- CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 12, 2001.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102–7, 2012.

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

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

DEBACHE, K. et al. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1455–63, 2008.

DINIZ, M. de O.; FERREIRA, L. C. de S.; Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, 2010.

DONG, J. et al. Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 19, 2012.

DUBEY, J. P. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259–1263, 1988.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267–289, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90–108, 2011.

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

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

GONDIM, L. F P. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 35, 1999.

GONDIM, L. F. P. et al. 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. Evaluating high-throughput ab initio gene finders to discover proteins encoded in eukaryotic pathogen genomes missed by laboratory techniques. **PloS one**, v. 7, n. 11, 2012.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Infection , Genetics and Evolution 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.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Discovering a vaccine against neosporosis using computers : is it feasible ? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 401–411, 2014.

GUIONAUD, C. et al. Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. **Parasitology**, v. 137, n. 11, p. 1605-1619, 2010.

HADDAD, J. P. A.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle — a Canadian perspective. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, 2005.

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

HEIN, H. E. et al. Bovine neosporosis: evaluation of vertical transmission and population etiological fraction of abortion in a bovine population in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, 2012.

HEMPHILL, A. Subcellular Localization and Functional Characterization of Nc-p43 , a Major *Neospora caninum* Tachyzoite Surface Protein. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p. 4279–4287, 1996.

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

HEMPHILL, A. et al. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience**, p. 23–36, 2013.

HERNANDEZ, J. et al. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 5, p. 632–635, 2001.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**; 2011. [citado 2014 Dec 05]; Disponível em: URL: www.ibge.gov.br.

INNES, E. A.; et al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 13, p. 1523–1534, 2001.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497–504, 2002.

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

KELLER N. et al. 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.

LINDSAY, D. S. et al. Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 64–67, 1999.

LOVETT, J. L. et al. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 107, 33–43, 2000.

MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V. et al. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 472–80, abr. 2011.

MILLER, C. M. et al. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 8, n. 10, p. 620–625, 2002.

MONNEY, T. et al. 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, n. 40, p. 6967–75, 16 set. 2011.

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

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

MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 87–97, 2005.

NAGULESWARAN, A. et al. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC 3 mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 695–704, 2002.

NISHIKAWA, Y. et al. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 51–58, jan. 2000.

NISHIKAWA, Y. et al. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v. 19, p. 1381–1390, 2001.

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

OGAWA, L. et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, 2005

OJO, K. K. et al. *Neospora caninum* calcium-dependent protein kinase 1 is an effective drug target for neosporosis therapy. **PLoS one**, v. 9, n. 3, 2014.

OTSUKI, T. et al. Expression, purification and antigenicity of *Neospora caninum*-antigens using silkworm larvae targeting for subunit vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 284–287, 2013.

PINHEIRO, A. F. et al. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 3, p. 116–121, 2013.

PINITKIATISAKUL, S. **Recombinant Subunit Vaccines against *Neospora caninum***. v. 40, p. 1–53, 2007.

PINITKIATISAKUL, S. et al. Immunogenicity and protective effect against murine cerebral neosporosis of recombinant NcSRS2 in different iscom formulations. **Vaccine**, v. 25, n. 18, p. 3658–3668, 2007.

POLLO-OLIVEIRA, L. et al. Unravelling the *Neospora caninum* secretome through the secreted fraction (ESA) and quantification of the discharged tachyzoite using high-resolution mass spectrometry-based proteomics. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 335, 2013.

RAGOZO, A. M. A. et al. Ocorrência de anticorpos anti -*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 37, p. 33–37, 2003.

RAMAMOORTHY, S. et al. 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, n. 13, p. 1521–1529, 2007.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2688–2691, 2001.

REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133–142, 2013.

REICHEL, M. P. et al. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1455–1470, 2014.

REID, A. J. et al. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 3, 2012.

RISCO-CASTILLO, V. et al. Molecular characterization of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 8-9, p. 887–896, 2007.

ROJO-MONTEJO, S. et al. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 7–16, 2009.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: A laboratory manual,. 3rd ed, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2001.

STA, S.; HANSSON, M. Design and production of recombinant subunit vaccines Introduction to vaccinology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 107, p. 95–107, 2000.

STROHBUSCH, M. et al. NcGRA2 as a molecular target to assess the parasitocidal activity of toltrazuril against *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 135, n. 9, p. 1065–1073, 2008.

TAHMOORESPOOR, M. et al. Cloning , nucleotide sequencing and bioinformatics study of NcGRA7 , an immunogen from *Neospora caninum*. **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 5, p. 3–12, 2013.

TAKASHIMA, Y. et al. Prevalence and Dynamics of Antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 Antigens of *Neospora caninum* in Cattle during the Gestation Period. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 11, p. 1413–1418, 2013.

TREES, A. J. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, p. 1895–1900, 2009.

TUO, W. et al. Immunization of female BALB/c mice with *Neospora* cyclophilin and/or NcSRS2 elicits specific antibody response and prevents against challenge infection by *Neospora caninum*. **Vaccine**, v. 29, n. 13, p. 2392–2399, 2011.

URA, T.; OKUDA, K.; SHIMADA, M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. **Vaccine**, v. 2, n. 3, p. 624–641, 2014.

VOGEL F.S.F.; ARENHART S.; BAUERMANN F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 2010-2011, 2006.

WASTLING, J. M. et al. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa – Where 's the message ? **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 135–143, 2009.

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

ZHAO, Z. et al. Immunogenicity of a DNA vaccine expressing the *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 in mice. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 57, n. 1, p. 51-62, 2009.