

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Desenvolvimento de ELISA para o Diagnóstico da Neosporose**

**Amanda Fernandes Pinheiro**

Pelotas, 2010

AMANDA FERNANDES PINHEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.) (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientação: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (UFPel)

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P654d Pinheiro, Amanda Fernandes  
Desenvolvimento de ELISA para o diagnóstico da neosporose / Amanda Fernandes Pinheiro. – 83f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Pelotas, 2010. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Luciano da Silva Pinto.

1.Parasitologia. 2.*Neospora caninum*. 3.*Pichia pastoris*.  
4.ELISA-NcSRS2. 5.IFI. 6.Diagnóstico sorológico. I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Pinto, Luciano da Silva. IIITítulo.

CDD: 593.1

## **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)

---

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli

---

Prof. Dra. Cláudia Pinho Hartleben

---

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar tamanha felicidade, por ter iluminado meu caminho e abençoado minhas decisões, agradeço por manter-me saudável, principalmente nos momentos mais críticos, pois sem qualquer destes fatos, eu não teria conseguido.

Não tenho palavras em meu coração para expressar a gratidão aos meus pais Wilton e Maria da Graça. São eles os responsáveis pela pessoa que sou hoje. Obrigada pelo amor, educação e confiança que sempre recebi de vocês. Espero ser sempre motivo de orgulho. Amo vocês.

À toda minha família, que mesmo distante sempre torceram por mim e vibram comigo nessa nova etapa da minha vida.

*In memoriam* a minha querida madrinha Neiva e a minha avó Hilda, que hoje não estão mais entre nós, mas onde quer que estejam, sei que estarão sempre torcendo por mim.

Ao meu namorado Luiz Carlos, pela paciência em me acompanhar neste período, por me amparar nos momentos mais difíceis me dando força para superar as dificuldades e compreender esta grande dedicação.

Ao professor Dr. Fábio Leivas Leite por sua ajuda nos momentos mais árduos, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Obrigada pela oportunidade de aprender com você.

À professora Dra. Sibeles Borsuk e ao professor Dr. Luciano Pinto pelo tempo dedicado as explicações sobre a execução deste trabalho e também pelas suas sábias sugestões.

Aos professores que me acompanharam e com quem aprendi mais sobre esse fantástico mundo da ciência, sou grata a todos.

Aos colegas pós-graduandos pelos momentos que passamos juntos estudando e estimulando uns aos outros: Ana Paula, Cibele, Dani, Fernando, Jaqueline, Leonardo, Sâmara... Obrigada pela amizade e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular: Ana, Ana Paula, Cristine, Fernanda, Gabriela, Lucas, Marília, Paula, Régis, Relber, Suelen, Talita... Muito obrigada pelo carinho, amizade e pelos momentos alegres que passamos juntos.

Agradeço a CAPES pela grande oportunidade e pelo financiamento de meus estudos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia pela oportunidade de crescer como profissional em meio a tantas limitações e ao respeito por nós alunos.

A todos os amigos próximos ou distantes que souberam entender um “hoje eu não posso” mas que sempre estiveram disponíveis e que sempre estiveram comigo em um lugar muito reservado.

Muito Obrigada!

*“Fé é dar o primeiro passo,  
mesmo quando você não vê toda a escada.”*  
Martin Luther King

*Nas grandes batalhas da vida,  
o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!*  
Mahatma Gandhi.

## RESUMO

PINHEIRO, Amanda Fernandes. **Desenvolvimento de ELISA para o Diagnóstico da Neosporose**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

A neosporose é uma enfermidade causada pelo protozoário intracelular *Neospora caninum* esta é de grande importância principalmente em bovinos, pois pode ocasionar abortos nos animais infectados, causando grandes perdas econômicas para indústria pecuária de vários países do mundo. No presente estudo, foi relatada a expressão, purificação e a caracterização da proteína NcSRS2 de *N. caninum* na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. O gene *ncsrs2* foi clonado no vetor de expressão pPICZαB seguindo de integração no genoma da levedura. A proteína recombinante NcSRS2 foi demonstrada no sobrenadante da cultura onde posteriormente foi concentrada e purificada. Um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) foi desenvolvido utilizando soros negativos e positivos de bovinos e ovinos naturalmente infectados a campo por *N. caninum*. Este demonstrou que a proteína recombinante apresentou as características antigênicas da proteína nativa o que permitiu o seu reconhecimento por soros de diferentes espécies de animais com neosporose. Os resultados foram comparados com a imunofluorescência indireta (IFI). O teste diagnóstico ELISA-NcSRS2 descrito no presente trabalho constitui um método específico e sensível para a detecção de *N. caninum* em bovinos e ovinos. Os resultados indicam que a proteína recombinante produzida neste trabalho pode ser utilizada para o desenvolvimento de métodos diagnósticos com menor custo de produção e em escala industrial, pois estes são necessários e importantes para a implantação de medidas de controle adequadas para esta parasitose nos rebanhos bovinos.

Palavras chaves: *Neospora caninum*, *Pichia pastoris*, ELISA-NcSRS2, IFI, Diagnóstico Sorológico.

## ABSTRACT

PINHEIRO, Amanda Fernandes. **ELISA development for the neosporosis diagnosis**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

The neosporosis is a disease caused by intracellular protozoa *Neospora caninum*, which is of great importance, especially in cattle, because it may cause abortion in infected animals, causing big economic losses for the cattle industry of many countries in the world. In the present study it was reported the expression, purification, and characterization of the protein NcSRS2 of *N. caninum* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The gene *ncsrs2* was cloned in the vector of expression pPICZαB, followed by the integration in the genome of yeast. The recombinant protein NcSRS2 was shown in the supernatant of the culture, where later it was concentrated and purified. An indirect immunoenzymatic assay (ELISA) was developed, using seronegative and seropositive of cattle and sheep, naturally field-infected. It showed that the recombinant protein presented the antigenic characteristics of native protein, which allowed its recognition by the blood serum of different species of animals with neosporosis. The results were compared with the indirect immunofluorescence (IFI). The diagnosis test ELISA- NcSRS2 described in the present work is a specific and sensitive method for the detection of *N. caninum* in cattle and sheep. The results indicate that the recombinant protein produced in this work, can be used for the development of diagnosis methods with low-cost production, and in industrial scale, because they are necessary and important for the introduction of proper controlling measurements for this parasitosis in cattle flocks.

Key words: *Neospora caninum*, *Pichia pastoris*, ELISA-NcSRS2, IFI, Serologic Diagnosis.

## ABREVIACOES E SIGLAS

<b>ANUALPEC</b>	Anuário da Pecuária Brasileira
<b>AOX</b>	Álcool Oxidase
<b>BMGY</b>	Meio complexo tamponado com glicerol
<b>BMMY</b>	Meio complexo tamponado com metanol
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>D.O</b>	Densidade óptica
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático Indireto (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>MAb</b>	Anticorpo Monoclonal
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MM</b>	Meio Mínimo
<b>NcSRS2</b>	Antígeno de superfície de <i>Neospora caninum</i>
<b>Ohms</b>	Unidade de resistência elétrica
<b>OPD</b>	Ortofenilenodiamina
<b>PBS</b>	Salina isotônica com tampão fosfato (Phosphate-buffered saline)
<b>PBS-T</b>	PBS contendo Tween-20
<b>PCR</b>	Reação da Polimerase em Cadeia
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>UI</b>	Unidade internacional
<b>vvm</b>	Volume de gás por volume útil de reator por minuto

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produto de Amplificação do gene <i>ncsrs2</i> de <i>N. caninum</i> .....	52
Figura 2	Mapa do vetor de expressão pPICZαB .....	53
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão do plasmídeo pPICZαB/ <i>ncsrs2</i> .....	54
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do fragmento <i>ncsrs2</i> por PCR de colônia. ....	55
Figura 5	Dot Blotting do sobrenadante da cultura em fermentador .....	56
Figura 6	Dot Blotting da proteína NcSRS2 precipitada com Sulfato de Amônio.....	57
Figura 7	Dot Blotting da proteína NcSRS2 precipitada com Acetona .....	57
Figura 8	Dot Blotting da proteína NcSRS2 precipitada com Álcool Etílico.....	58
Figura 9	Controle positivo e controle negativo das precipitações.....	58
Figura 10	Western blotting da proteína NcSRS2.....	59
Figura 11	ELISA com Soros Bovinos .....	60
Figura 12	ELISA com Soros Ovinos .....	60
Figura 13	Valores Preditivos Positivo e Negativo do ELISA.....	61

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>15</b>
2.1	<i>Neospora caninum</i>	15
2.2	Hospereiros	16
2.3	Caracterização do agente	18
2.4	Transmissão	19
2.4.1	Transmissão em cães	19
2.4.2	Transmissão em bovinos	20
2.5	Ciclo Biológico	22
2.6	Patogenia e Sintomatologia	24
2.6.1	Neosporose em cães	24
2.6.2	Neosporose em bovinos	25
2.6.3	Neosporose em ovinos e eqüinos	26
2.7	Perpetualização, suscetibilidade e fatores condicionantes	27
2.8	Epidemiologia	29
2.9	Diagnóstico	30
2.10	Profilaxia	32
2.11	Tratamento	33
2.12	Imunologia	34
2.13	<i>Pichia pastoris</i>	34
2.14	NcSRS2	36
2.15	Perspectivas	36
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>38</b>
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38

<b>4 Materiais e Métodos .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Parasitos .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Obtenção e preparo do gene <i>ncsrs2</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.1 Síntese dos <i>primers</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.3 Purificação dos produtos de PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.4 Digestão do gene <i>ncsrs2</i> e do vetor pPICZαB .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Clonagem do gene <i>ncsrs2</i> no sistema pPICZαB .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.1 Ligação do gene <i>ncsrs2</i> no vetor pPICZαB .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.2 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.3 Transformação em <i>E. coli</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.4 Seleção dos clones recombinantes em <i>E. coli</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.5 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> e seleção de colônias transformantes ..</b>	<b>45</b>
<b>4.4.1 Preparo de células competentes de <i>P. pastoris</i> e transformação com pPICZαB/<i>ncsrs2</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.2 Dot blot e PCR das colônias recombinantes de <i>P. pastoris</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.3 Cultivo em erlenmeyer com 25ml de meio .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.4 Cultivo em fermentador .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.5 Dot Blotting do sobrenadante da cultura em fermentador .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 Precipitação da proteína NcSRS2 .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.1 Precipitação com sal.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.2 Precipitação com solventes orgânicos .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5.3 Diálise e liofilização da proteína .....</b>	<b>48</b>
<b>4.6 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford.....</b>	<b>48</b>
<b>4.6.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) .....</b>	<b>49</b>
<b>4.6.2 Western Blotting da proteína NcSRS2.....</b>	<b>49</b>
<b>4.7 Padronização e avaliação do ELISA com NcSRS2.....</b>	<b>50</b>
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>51</b>
<b>5 Resultados .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Construção do Vetor pPICZαB/<i>ncsrs2</i> .....</b>	<b>52</b>

<b>5.2</b>	<b>Transformação de <i>Pichia pastoris</i> X33 com pPICZ<math>\alpha</math>B/<i>ncsrs2</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3</b>	<b>Teste de Expressão das proteínas recombinantes .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4</b>	<b>Precipitação com Sal e Solventes Orgânicos.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5</b>	<b>Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford .....</b>	<b>58</b>
<b>5.6</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>65</b>
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>66</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>79</b>

## 1 Introdução

A neosporose, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, é considerada a principal causa de abortamentos em bovinos em vários países. A importância econômica da infecção por *N. caninum* em rebanhos bovinos é atribuído pelos custos associados aos abortos, aumento no número de descarte de vacas e diminuição na produção de leite. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo (19% da população bovina mundial, IBGE 2008), com grande expressão no cenário mundial da pecuária bovina e mercado de carne, ficando somente atrás da Índia, com rebanho total de mais de 336 milhões de cabeças, segundo ANUALPEC, 2006. As regiões Centro-Oeste e Sul destacam-se na produção de carne bovina e o Rio Grande do Sul, além de contribuir significativamente para a exportação de carne, é considerado um dos principais estados produtores de leite do país, juntamente com os Estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná (AGRONEGÓCIO BRASILEIRO, 2007). Apesar dos resultados apresentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) serem satisfatórios, o Brasil ainda possui grandes perdas econômicas relacionadas a doenças que atingem os rebanhos e que podem prejudicar o ganho de peso, índices reprodutivos ou até mesmo ocasionar a perda dos animais. Dubey (2003) relata prevalências de soropositividade para *N. caninum* de até 87 % nos rebanhos do País. No Rio Grande do Sul abortos causados por *N. caninum* foram recentemente diagnosticados. Na região de Pelotas foram examinados 1046 bovinos de 92 propriedades leiteiras. A soroprevalência constatada foi de 12,04%, sendo que em 47,6% das propriedades existia pelo menos um bovino soropositivo (LUCAS, 2007). No Brasil, algumas dificuldades ainda impedem a realização do diagnóstico de forma mais ampla. Isto ocorre por falta de conhecimento do agente e da sua prevalência nos rebanhos brasileiros, o elevado custo do diagnóstico é devido à difícil obtenção do agente e manutenção do protozoário em laboratório (ANDREOTTI et al., 2003). Estudos têm sido desenvolvidos para identificar e caracterizar os componentes moleculares

antigênicos específicos de *N. caninum* com o objetivo de melhorar o diagnóstico sorológico e aumentar os conhecimentos relacionados com a biologia celular e sua interação com o hospedeiro (HEMPHILL et al., 1999). Pesquisas sobre a antigenicidade do parasito sugeriu que os antígenos mais específicos das espécies do filo Apicomplexa, que compreende o gênero *Neospora* encontram-se na superfície celular, e testes sorológicos que possuem como alvo estes antígenos apresentam menor percentual de reações cruzadas com parasitos do mesmo filo (BJORKMAN & UGGLA, 1999). Nesta perspectiva, a NcSRS2 é uma proteína de superfície imunodominante presente nos estágios de taquizoítos e bradizoítos, desta forma apresenta potencial para a utilização no desenvolvimento de testes sorológicos por estar presente somente em *N. caninum*. Como sistema de expressão foi utilizada a levedura *Pichia pastoris*, pois esta é efetiva na produção de proteínas heterólogas e tem recebido destaque nas últimas duas décadas (TORRES; MORAES, 2000). Dentre as características vantajosas destacam-se a capacidade de promover modificações pós-traducionais como formação de pontes dissulfeto, -O e -N glicosilação além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação (CEREGHINO; CREGG, 1999). *P. pastoris* é capaz de crescer através da utilização de metanol como única fonte de carbono, sendo que esta rota metabólica é totalmente reprimida na presença de outra fonte, como glicerol (GELLISSEN, 2000). Segundo CEREGHINO & CREEG, (1999) essa repressão é importante porque proteínas heterólogas quando expressas em altos níveis no sobrenadante podem ser tóxicas para as células, assim, a habilidade em manter a cultura crescendo com o sistema de expressão desligado minimiza os efeitos inibitórios do crescimento celular. A utilização desta levedura proporciona vantagens com relação aos sistemas de expressão procariotos, mantendo a fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitindo a sua expansão para a produção de proteínas em escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol (CEREGHINO et al., 2002). Deste modo este sistema de expressão foi utilizado para a produção da proteína NcSRS2 em grandes quantidades, conservando as características da proteína nativa.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 *Neospora caninum*

A Neosporose é uma doença causada por um protozoário intracelular obrigatório denominado *Neospora caninum*. Este parasito pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae, gênero *Neospora*, espécie *Neospora caninum* (DUBEY, et al., 1988). Durante muito tempo *N. caninum* foi considerado o único membro do gênero *Neospora*, porém Marsh et al., (1998), isolou uma nova espécie a partir do sistema nervoso central de um eqüino adulto, o qual passou a ser denominado *Neospora hughesi*.

Até 1988 *N. caninum* foi erroneamente diagnosticado como *Toxoplasma gondii* devido à sua similaridade morfológica, embora apresente diferenças antigênicas e biológicas sendo capaz de infectar com êxito uma grande variedade de tipos celulares *in vitro* (HEMPHILL et al., 1999; DUBEY, 2003).

A neosporose tem se caracterizado como sendo uma das principais causas de aborto e mortalidade neonatal em rebanhos bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos e veados, e anticorpos anti-*N. caninum* têm sido encontrados em soro de búfalos, raposas, coiotes, camelos e felinos (DUBEY, 2003). Em cães é responsável por distúrbios neurológicos severos, principalmente em ninhadas congenitamente infectadas (DUBEY, et al., 1999).

A importância econômica da infecção por *N. caninum* em rebanhos bovinos é atribuído pelos custos associados aos abortos, aumento no número de descartes de bovinos (HÄSLER et al., 2006) e diminuição na produção de leite (HERNANDEZ et al., 2001). Em alguns rebanhos, taxas de prevalência de até 90% podem ser detectadas onde a maioria dos animais nascem saudáveis, mas portadores (DUBEY et al., 2002). Estes animais jovens persistentemente infectados são muito importantes na epidemiologia da enfermidade e constituem-se nos principais

responsáveis pela manutenção do agente em um rebanho (DUBEY, 2003). Não existem dados precisos dos prejuízos causados por esta parasitose no Brasil, mas tomando como exemplo as estimativas da Austrália e Nova Zelândia, os custos anuais devido à neosporose em bovinos de leite superam os 85 milhões e 24 milhões de dólares, respectivamente (RIICHEL, ELLIS, 2006). O impacto econômico, sem dúvida, é grande e deve ser considerado, uma vez que o prejuízo gerado por esta parasitose é expressivo.

## 2.2 Hospedeiros

*N. caninum* parasita uma grande variedade de hospedeiros, em geral, foram constatados dois tipos para este protozoário: os hospedeiros intermediários, nestes o protozoário realiza reprodução pela forma assexuada, tanto em experimentações como em seu ciclo biológico natural (GEORGIEVA et al., 2006), dentre eles estão, várias espécies como: caninos (COLE et al., 1995) e felinos (DUBEY et al., 1990). Evidências de infecção por *N. caninum* foi demonstrada pela identificação do parasito em tecidos de ovinos, caprinos, cervídeos, bubalinos e equinos (DUBEY et al., 2003). Rodrigues, et al. (2005) descreveu os búfalos como importantes reservatórios naturais de *N. caninum*, através do isolamento do parasito de cistos cerebrais de búfalos da região norte do Brasil. Infecções experimentais foram realizadas com êxito em bovinos, ovinos, caprinos, suínos, canídeos, felinos, camundongos, gerbis e aves (DUBEY et al., 2002). A exposição de animais domésticos e silvestres foi evidenciada pela resposta de anticorpos em raposas, coiotes, lobos, alpacas e camelos (DUBEY et al., 2003). A relação entre *N. caninum* e *T. gondii* levou inicialmente a suspeita de um hospedeiro definitivo carnívoro para *N. caninum*. Em 1998 após 10 anos de sua descrição foi descoberto o primeiro hospedeiro definitivo pela demonstração de oocistos nas fezes de cães (*Canis familiaris*) alimentados com cistos teciduais de camundongos experimentalmente infectados por *N. caninum* (LINDSAY et al., 1999). Coiotes (*Canis latrans*) também são considerados atualmente como hospedeiros definitivos de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004), estas são as únicas espécies reconhecidas até então que podem se comportar como hospedeiros definitivos, nas quais ocorre o desenvolvimento sexual

do protozoário resultando na eliminação de oocistos nas fezes (GONDIM et al., 2004). Ambos podem servir também de hospedeiro intermediário, infectando-se com seus próprios oocistos excretados pelas fezes, como também através da ingestão de oocistos eliminados nas fezes de outros hospedeiros definitivos (SARTOR et al., 2005). É possível que outras espécies de canídeos silvestres possam exercer o papel de hospedeiros definitivos para *N. caninum*. Evidências sorológicas sugerem que canídeos silvestres como dingo australiano (*Canis familiaris dingo*), *Pseudalopex gymnocercus* (graxaim do campo), *Cerdocyon thous* (graxaim do mato), *Chrysocium brachyurus* (lobo guará) e *Dusicyon vetulus* (raposinha do nordeste ou do campo), também possam ser hospedeiros definitivos (DUBEY, 2003; CÂNON-FRANCO et al., 2004). Detectou-se também a presença de infecção pelo coccídio em cervos (*Odocoileus virginianus*) norte-americanos, evidenciando assim a manutenção de um ciclo selvagem da neosporose nos Estados Unidos da América (VIANA et al., 2005). Recentemente um estudo com infecção experimental de *N. caninum* em aves demonstrou que cães eliminam oocistos nas fezes após alimentação com ovos embrionados de galinhas inoculados com taquizoítos de *N. caninum*, mostrando que as aves podem participar como reservatório desse parasito (FURUTA et al., 2007). Logo após galinhas (*Gallus domesticus*), principalmente as galinhas caipiras ou de criação extensiva foram confirmadas como hospedeiros naturais de *N. caninum* (COSTA et al., 2008).

O parasito ainda não foi detectado em humanos, embora em infecção experimental por *N. caninum* em primatas Rhesus (*Macaca mulatta*) foram observadas nos fetos, lesões semelhantes à toxoplasmose congênita (BARR et al., 1994). Na Califórnia, Tranas et al. (1999) detectaram anticorpos anti-*N. caninum* com título de 100 em 6,7% dos soros humanos analisados pela reação de imunofluorescência indireta (IFI). Na Inglaterra, em estudo com 518 trabalhadores rurais e com 3.232 pessoas não consideradas “grupo de risco”, McCann et al. (2008) não observaram soropositividade para *N. caninum* através da IFI, embora tenham sido encontrados bovinos soropositivos na mesma localidade. Lobato et al. (2006) detectaram anticorpos IgG contra *N. caninum* em 38% de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em 18% de pacientes com desordens neurológicas comparado com indivíduos saudáveis, em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, sendo esse estudo importante por sugerir a possibilidade da neosporose

constituir parasitose oportunista em pacientes imunocomprometidos. Os autores consideraram também que a soropositividade para *N. caninum* e *T. gondii* estavam significativamente associadas nesses dois grupos de pacientes examinados.

Embora anticorpos anti-*N. caninum* tenham sido relatados (LOBATO et al., 2006), o parasito ainda não foi demonstrado em tecidos humanos.

### 2.3 Caracterização do agente

A apresentação morfológica do *Neospora caninum*, consiste em dois estágios assexuados que são encontrados nos hospedeiros intermediários e ocorrem intracelularmente (DUBEY et al., 2002), identificados como taquizoítas e bradizoítas, denominados de formas proliferativas, pela característica de sua participação intracelular generalizada; e um estágio sexuado, representado pelos esporozoítos contidos nos oocistos, estas formas morfológicas são bastante similares aos correspondentes estágios do *T. gondii*.

Os oocistos, são excretados nas fezes dos cães (McALLISTER et al., 1998) e coiotes (GONDIM et al., 2004) na forma não esporulada, no ambiente, dentro de vinte e quatro a setenta e duas horas ocorre a esporulação (LINDSAY et al., 1999), se tornando um oocisto infectante, não sendo, portanto, infecciosos em fezes frescas (SOUZA et al., 2001). Os oocistos de *N. caninum* são morfológicamente similares aos oocistos de *Hammondia heydorni* encontrado nas fezes de cães, como também aos oocistos de *T. gondii*, encontrados nas fezes de gatos (GONDIM et al., 2004). A diferenciação entre *H. heydorni* e *N. caninum* pode ser feita por meio de ensaios biológicos, cultura em células ou análises moleculares como a PCR que diferencia os dois agentes, podendo posteriormente ser feito o sequenciamento (MONTEIRO et al., 2007).

Os oocistos apresentam de 10-11 µm de diâmetro e quando esporulados apresentam dois esporocistos e cada um com quatro esporozoítos, são resistentes no meio ambiente e permanecem viáveis por longo período, ainda é desconhecida a sobrevivência desses oocistos no ambiente.

Os taquizoítos representam o estágio proliferativo e causador da doença. Os taquizoítos são ovóides, semilunares ou globulares, dependendo da fase de

divisão, medem de 3 à 7 micrômetros de comprimento por 1 à 5 micrômetros de largura; possuem uma membrana plasmática de três camadas e um complexo apical composto de microtubos, anéis apicais, conóides e um anel polar, além de três organelas secretoras diferentes, que participam da invasão, formação e manutenção do vacúolo parasitóforo, o que permite a sobrevivência e proliferação do parasito (HEMPHILL et al., 1998).

Os cistos, estes tem sido encontrados em células do sistema nervoso como cérebro, medula espinhal, nervos e retina como também em células de tecidos extraneurais, especialmente os músculos (PETERS et al., 2001) caracterizando a cronicidade da infecção, pois estes podem ficar em estado de latência por meses ou anos, por fim restabelecendo o ciclo, quando consumido por um hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 1996). No seu interior encontram-se os bradizoítos responsáveis pelo estágio de multiplicação lenta, ambas as formas são resultantes do processo de infecção disseminada no ciclo extra-luminal assexuado do parasita. Estes apresentam as mesmas organelas encontradas nos taquizoítos, com segmentos membranosos planos e vesículas menores, possui a forma arredondada, sua parede é lisa apresentando ramificação e sua espessura depende do tempo da infecção. São circundados por uma membrana cística que o protege de reações imunológicas e fisiológicas do hospedeiro (GOTTSTEIN et al., 1998).

## **2.4 Transmissão**

### **2.4.1 Transmissão em cães**

A transmissão vertical da neosporose foi primariamente observada em cães, quando três ninhadas sucessivas de uma cadela na Noruega apresentaram problemas neurológicos similares aos ocasionados por *T. gondii* (BJERKAS et al., 1984).

O trato digestivo constitui a estrutura fundamental para a porta de entrada do *N. caninum* no hospedeiro, (transmissão horizontal) ocorrendo pela ingestão de cistos teciduais com bradizoítos viáveis ou a ingestão de água ou alimentos

contaminados pelos oocistos esporulados livres no meio ambiente (BARR et al., 1993).

Oocistos de *N. caninum* foram detectados nas fezes de cães após a ingestão de tecidos de bovinos (DIJKSTRA et al., 2002), bubalinos (RODRIGUES et al., 2004), ovinos (PENA et al., 2007) e cervídeos (VIANNA et al., 2005). Em tecidos de galinhas *N. caninum* já foi detectado por métodos moleculares por Costa et al., (2008), entretanto o agente não foi isolado nesta espécie animal.

A transmissão vertical em cães também ocorre, porém em baixa frequência. Sendo a transmissão horizontal mais freqüente, justificando as elevadas taxas de soroprevalência encontradas em populações caninas (BARBER & TREES, 1998).

#### **2.4.2 Transmissão em bovinos**

##### **Vertical**

A infecção pode ser transmitida da vaca para sua prole pela via transplacentária e pode ocorrer ao longo de sucessivas gestações e desta forma, perpetuar a infecção no rebanho. Segundo Dubey et al. (2002) a infecção pelo *N. caninum* é uma das principais causas de abortos nesta espécie.

Nesse sentido, a neosporose possui uma grande importância econômica, principalmente devido às perdas reprodutivas que produz, incluindo retornos ao cio, com intervalos regulares ou irregulares, abortos, nascimento de animais fracos, com sinais neurológicos, ou sadios persistentemente infectados (DUBEY & LINDSAY, 1996). Os animais jovens persistentemente infectados são muito importantes na epidemiologia da enfermidade e constituem-se nos principais responsáveis pela manutenção do agente no rebanho (DUBEY, 2003), demonstrando a importância das fêmeas bovinas na epidemiologia desta enfermidade (TREES & WILLIAMS, 2005). Esses animais são clinicamente normais, são soropositivos e abrigam o parasito encistado em vários tecidos, sendo considerados portadores do agente. A reativação da infecção em fêmeas prenhas persistentemente infectadas ocorre provavelmente devido à imunossupressão fisiológica da gestação, podendo resultar em transmissão transplacentária do agente ao feto (INNES et al., 2002).

Em bovinos e outros ruminantes não há transferência de anticorpos da mãe para o feto, nem mesmo através de uma placenta que foi lesada por um processo infeccioso (DUBEY et al., 1987). Portanto a presença de anticorpos no soro pré-colostroal indica síntese de anticorpos pelo feto no útero, porém não encontrar anticorpos no feto não é conclusivo de ausência de infecção, pois o feto pode ter sido infectado no final da gestação, sendo o tempo insuficiente para a síntese de anticorpos (DUBEY et al., 2007).

A taxa de infecção transplacentária deste protozoário parece não ser afetada por fatores como: idade da mãe, número de lactações e histórico de problemas reprodutivos (DUBEY et al., 2002). A transmissão vertical também foi observada em ovinos, caprinos e eqüinos (CORBELLINI et al., 2001).

## **Horizontal**

A transmissão horizontal, ou seja, através da ingestão de oocistos é de notável importância, pois se estima que um único hospedeiro definitivo seja capaz de eliminar, aproximadamente, 500.000 oocistos após a ingestão de uma única carcaça contaminada, o que seria suficiente para infectar milhares de animais em um rebanho (GONDIM et al., 2002), este é o único modo de infecção natural demonstrado nos bovinos após o nascimento (GONDIM et al., 2004). Até hoje não foi observada a transmissão do *N. caninum* de bovino para bovino (DUBEY, et al., 2007).

A transmissão horizontal ocorre em consequência da contaminação em pastagens, silagem, cochos ou bebedouros por fezes de cães criados juntamente com o rebanho.

Pesquisas realizadas, nos últimos anos, demonstraram que a presença e o número de cães nas propriedades rurais podem funcionar como fatores de risco para a infecção e a ocorrência de abortos em bovinos, indicando uma associação entre a infecção em ambas as espécies (SÁNCHEZ et al., 2003; CUNHA FILHO et al., 2008).

Outras formas secundárias de transmissão horizontal como a lactogênica, venérea ou inseminação artificial têm sido investigadas. A possibilidade de

transmissão lactogênica foi sugerida após a demonstração de infecção oral em recém-nascidos de vacas soronegativas através de colostro artificialmente contaminado com taquizoítos (HUONG et al., 1998). Moskwa et al. (2007) detectou o DNA do parasito no colostro e leite de vacas soropositivas. O encontro de taquizoítos de *N. caninum* em órgãos genitais de camundongos machos imunodeficientes (MASUDA et al., 2007) e a presença de DNA no sêmen de touros com infecção naturalmente adquiridas (ORTEGA-MORA et al., 2003), indicam a possibilidade de transmissão venérea. Vacas inseminadas após congelamento e descongelamento de sêmen contaminado com taquizoítos de *N. caninum* não adquiriram a infecção (CANADA et al., 2006). É pouco provável a transmissão da neosporose por transferência de embriões, uma vez que embriões de doadora soronegativa quando transferidos para receptor soropositivo resultou em infecção fetal, enquanto que embriões de doadora soropositiva transferidos para receptor soronegativo resultou em feto negativo para a neosporose (BAILLARGEON et al., 2001).

## 2.5 Ciclo Biológico

*N. caninum* é um protozoário que tem ciclo de vida heteróximo, envolvendo de um lado um hospedeiro definitivo carnívoro e de outro lado um hospedeiro intermediário herbívoro.

O ciclo biológico de *N. caninum* ainda não é bem conhecido, principalmente no que diz respeito à fase intestinal, que compreende a fase sexuada de evolução. Sabe-se que o período pré-patente é de cinco a oito dias após a ingestão dos cistos teciduais (LINDSAY e DUBEY, 2000). Devido à sua similaridade taxonômica e biológica com *T. gondii* e por ser um coccídio com carnívoros como hospedeiros definitivos, Dubey (1999) propôs seu ciclo de vida. Inicialmente, o parasito reconhece a célula hospedeira, este atinge as células alvo através da circulação linfática e sangüínea e a morte celular ocorre em decorrência da multiplicação de taquizoítos. A superfície da célula alvo possui proteínas receptoras que mediam a adesão do parasito e a invasão da célula, essa fase é classificada por Hemphill et al.(1996) como extremamente rápida, não exigindo mais que cinco minutos. O

parasito cria um sítio na superfície da membrana para a interação com a célula hospedeira, a junção se expande no sentido circunferencial e progressivo de fechamento das membranas e o parasito completa a invasão ao ser totalmente envolvido pelas membranas e formar um vacúolo parasitóforo. Numa etapa seguinte, esse vacúolo se desloca para o interior do citoplasma (HEMPHILL; GOTTSTEIN; KAUFMANN, 1996). A célula pode ser parasitada por mais de um taquizoíto que se multiplica por endodiogenia, cada um em seu próprio vacúolo. Dentre as estruturas do parasito, o complexo apical é uma das mais importantes sendo responsável pela invasão celular, este envolve receptores da célula hospedeira e uma série de proteínas que são liberadas consecutivamente de micronemas, roptrias e grânulos densos (DUBEY, et al., 2002). Estas proteínas são secretadas dentro do vacúolo, durante e após a penetração. Após a multiplicação intensa de taquizoítos, o vacúolo parasitóforo se desintegra, antes mesmo que a célula hospedeira se rompa. Depois dessa lise, os taquizoítos vão, pela corrente sangüínea ou linfática, infectar novas células, iniciando todo o processo novamente (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2006). Seu estágio latente é representado pelos cistos teciduais, que são constituídos de uma grande parede cística que os protege não sendo circundados por reação do hospedeiro, no seu interior encontram-se os bradizoítos, que são caracterizados pela multiplicação lenta (DUBEY e LINDSAY, 1996), eles podem sobreviver por mais de quatorze dias a quatro graus Celsius (LINDSAY, 1999). Os taquizoítos causam forte resposta inflamatória com destruição tecidual e são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (DUBEY, 2005). Quando a resposta imune é desencadeada, taquizoítos se convertem em bradizoítos estes formam os cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais e musculares podendo persistir durante toda a vida do hospedeiro, esta é a principal maneira de defesa do protozoário contra o sistema imunológico do hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 2003). A formação de granulomas degenerando tecidos ao redor dos cistos e bradizoítos sugere que alguns cistos teciduais se rompam, e que em seguida, a reação do hospedeiro cause um foco inflamatório.

Quando ocorrer a ingestão destes cistos pelo hospedeiro definitivo, os bradizoítos, que são resistentes às soluções pépticas e ácidas responsáveis pela digestão, iniciarão o processo de penetração no epitélio intestinal dando origem às formas resultantes da multiplicação assexuada e sexuada do parasito, e, por fim, à

liberação de oocistos não esporulados (imaturados ou não infectantes) no ambiente, reiniciando o ciclo (DUBEY, 1999). No ambiente, em condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogônia entre 1 e 5 dias, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados (infectantes) que podem permanecer viáveis no solo por longo tempo. Quando os hospedeiros intermediários os ingerem, os esporozoítos são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, transformam-se em taquizoítos que se disseminam por todo o organismo, alguns taquizoítos dão origem a bradizoítos formando novos cistos teciduais (DUBEY, et al., 2003).

## **2.6 Patogenia e Sintomatologia**

O protozoário *N.caninum* é um parasito que causa a doença conhecida por neosporose, que acomete uma série de animais domésticos e silvestres, com maior importância na espécie bovina e canina. O parasita *N. caninum* tem sido encontrado parasitando uma ampla variedade de tecidos como: cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins, membranas fetais e placenta, músculos e pele (PETERS, WAGNERS e SCHARES et al., 2000).

### **2.6.1 Neosporose em cães**

As fêmeas infectadas podem transmitir o *N. caninum* a seus fetos por via transplacentária, e sucessivamente a outras ninhadas (DUBEY, 1999).

A maioria dos casos clínicos ocorre em filhotes infectados congenitamente (DUBEY et al., 1990); caracterizando-se por uma paralisia ascendente, com os membros pélvicos geralmente mais afetados; podendo apresentar hiperextensão rígida ou flácida, decorrente da poliradiculoneurite e miosite causadas pela infecção, dificuldade na deglutição, paralisia de mandíbula, cegueira, convulsões, incontinência urinária e fecal, flacidez e atrofia muscular e falha cardíaca (BASSO et al., 2005).

Sua apresentação é mais variada em cães adultos, além do quadro neuromuscular, podem ocorrer dermatite piogranulomatosa, miocardite fatal e pneumonia (LA PERLE et al., 2001). Os cães podem sobreviver durante meses com paralisia progressiva, meningoencefalite, insuficiência cardíaca, complicações pulmonares e, muitas vezes precisam ser eutanasiados (BARBER et al., 1998).

### **2.6.2 Neosporose em bovinos**

A confirmação da infecção em bovinos ocorreu em 1989, após os relatos de Shivaprasad et al. (1989), que identificaram *N. caninum* na placenta dessa espécie, enquanto que Thilsted & Dubey (1989), também o identificaram em um neonato acometido de paralisia neonatal.

Entre os animais domésticos, os bovinos se destacam por sua maior suscetibilidade, apresentando perdas na esfera reprodutiva como abortamentos, natimortalidade ou nascimento de animais aparentemente sadios, porém cronicamente infectados, ocasionando significativas perdas econômicas para a bovinocultura de todo o mundo (DUBEY, SHARES, ORTEGA-MORA et al., 2007).

A determinação da patogênese nos bovinos, gravidade e distribuição das lesões depende da idade fetal e da condição imunológica por ocasião da infecção, fetos infectados após quatro a cinco meses de idade geralmente apresentam lesões menos acentuadas, apesar de ter sido relatado que lesões cerebrais são menos notadas em fetos bovinos mais jovens, de três a quatro meses de idade, que nos mais velhos. Os taquizoítos foram mais encontrados em fetos mais jovens de até quatro meses (CORBELLINI et al., 2000).

A causa do aborto é de difícil determinação, mas necrose difusa e inflamação podem ser encontradas no coração fetal e na placenta. A morte do feto pode ser devido à miocardite. A placenta pode apresentar necrose focal moderada com acentuada descamação do endotélio vascular ocorrendo a trombose e o aborto (CORBELLINI et al., 2000). O parasito é capaz de produzir lesões macroscópicas de necrose em poucos dias e causar morte celular por multiplicação ativa dos taquizoítos. Pode produzir severa lesão neuromuscular em bovinos, em cães e, provavelmente, em outros hospedeiros, destruindo grandes números de células

nervosas, incluindo do nervo cranial e espinhal, afetando a condutividade das células afetadas (DAVIDSON et al., 1999). A lesão mais característica em fetos é uma encefalite focal caracterizada por necrose e inflamação não supurativa com infiltrado de células mononucleares (MORALES et al., 2001). Os animais infectados que nascem apresentam desvio ou estreitamento da coluna vertebral (DUBEY et al., 2001). No fígado ocorrem degeneração e necrose focais hepatocelulares, associadas a trombos de fibrina intrasinusóides, além de hepatite periportal (WOUDA et al., 1997). Outros órgãos, como músculo esquelético, pulmões, rins além da placenta, podem conter infiltrados inflamatórios.

Em bovinos adultos, a patologia manifesta-se com a indução do aborto pelo parasito (DUBEY et al., 2003), a maioria dos abortos que são induzidos por *Neospora* ocorrem no quinto ou sexto mês de gestação. Abortos anteriores normalmente não são clinicamente percebidos e a fertilidade da vaca não é afetada após o aborto (GONDIM et al., 2007). Vacas de qualquer idade podem abortar a partir de três meses de gestação. O feto pode morrer no útero, ser reabsorvido, mumificado, autolizado, nascer morto, nascer vivo, porém doente, ou nascer normal, mas cronicamente infectado. Animais nascem com pouco peso, incapazes de se levantar e com sintomas neurológicos. Os membros traseiros e dianteiros podem estar flexionados ou hiper-extendidos e, ao exame neurológico pode revelar ataxia e reflexo patelar decrescente. Exoftalmia e aparência assimétrica podem ser observadas (DUBEY e LINDSAY, 1996).

A freqüência de abortos por *N. caninum* pode ser esporádica, usual ou “esperada” no decorrer de um período considerado (endêmico), ou em surtos (epidêmico). Os episódios endêmicos geralmente ocorrem em rebanhos cronicamente infectados. Sendo que após um surto, os animais ficam cronicamente infectados, passando a ocorrer o chamado aborto endêmico (MOEN ET al., 1998).

### **2.6.3 Neosporose em ovinos e equinos**

Dubey, Koestner e Pieper (1990), ao avaliar um cordeiro recém nascido que apresentava alterações neurológicas e veio a óbito com uma semana de vida, estes constataram através da IHQ e análise ultraestrutural dos cistos encontrados, que se

tratava de uma infecção por *N. caninum* pela via transplacentária, sendo este o primeiro caso de *N. caninum* infectando naturalmente esta espécie animal. Em ovinos o *N. caninum* está associado a abortamentos e nascimentos de animais fracos e prematuros (PAPPEN et al. 2006).

Dubey e Porterfield (1990) relataram o primeiro caso de neosporose em um feto eqüino abortado em 1985. A partir deste fato surgiram relatos de neosporose em fetos prematuros, animais recém nascidos e em animais adultos, manifestando as mais diversas lesões e conseqüente sintomatologia clínica.

Locatelli-Dittrich et al., 2006, no sul do Paraná, investigaram a presença de anticorpos contra *N. caninum*, pela IFI com títulos (maior ou igual a 50), em soros sanguíneos de éguas e potros descendentes antes da ingestão do colostro. Anticorpos foram detectados nos soros das éguas e potros, sugerindo a ocorrência de transmissão vertical nesta espécie.

## **2.7 Perpetualização, suscetibilidade e fatores condicionantes**

O protozoário possui algumas habilidades para garantir a sua perpetuação como explorar sua capacidade de responder às alterações, convertendo-se em cistos ou na sua forma infectante novamente (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2006). Além do demonstrado por (DUBEY et al., 1990); que consiste na resistência interior dos cistos à exposição de solução de ácido clorídrico – pepsina, confirmando então, a transmissão de um animal para outro através da ingestão de tecidos contendo tais cistos viáveis.

Em estudos realizados não foram constatados qualquer predisposição racial, etária ou sexual em cães. Mas sabe-se que existe uma discreta superioridade na frequência de ocorrência da doença em cães oriundos de propriedades rurais, onde existe também algum tipo de evidência de sintomatologia em rebanhos.

Considerando as peculiaridades da história natural do *N. caninum*, devemos ficar atentos para alguns fatores de risco capazes de favorecer a disseminação do agente, entre os quais figuram:

*A distribuição da população de hospedeiros:* a criação de espécies diferentes com o mesmo manejo e criados no mesmo ambiente podem aumentar o

risco de exposição aos hospedeiros susceptíveis, principalmente quando as espécies envolvidas são fundamentais ao ciclo biológico do *N. caninum* (WOUDA et al., 1999). Neste sentido (LINDSAY, RITTER e BRAKE, 2002), referem-se ao risco associado à presença de cães, em propriedades rurais, potencializando a ocorrência de sintomas da neosporose em rebanhos bovinos.

*O hábito de alimentação dos cães nessas regiões:* como os resíduos da carcaça de animais abatidos sem o devido tratamento contribuem significativamente para a disseminação do parasita (SOUZA, 2001; CUNHA FILHO et al., 2008).

*O número de fontes de infecção:* capazes de eliminar o agente ao meio externo através de secreções e excreções; o grau de contaminação ambiental, particularmente em casos de resistência do agente como é o caso da forma enteroepitelial da neosporose em cães, cujos oocistos encontram nas fezes sua principal via de eliminação (McALLISTER et al., 1998).

A ocorrência da neosporose pode variar com o tipo de exploração, manejo dos rebanhos e a presença de hospedeiros definitivos. Isso se deve ao tipo de manejo com densidades populacionais mais altas, que aumentam o risco de os animais ingerirem alimentos contaminados com fezes positivas, ou seja, contendo oocistos esporulados de *Neospora*. Em rebanhos com histórico de abortos no Brasil, os rebanhos leiteiros mostram maior ocorrência de anticorpos (35,9%) quando comparados aos de corte (17,9%) (PITUCO et al., 1998). Entretanto, outros autores apontam semelhança nas taxas conforme citações de SARTOR et al. (2003), que constataram 15,9 % em rebanhos leiteiros e de HASEGAWA (2000) com 15,5% em gado de corte, na mesma região.

A neosporose pode causar abortos esporádicos, endêmicos ou epidêmicos, sendo o risco do aborto maior em animais mais velhos ou ainda após a fase inicial de infecção. Tal risco parece ser mais alto durante a primeira gestação do que nas subseqüentes, mas outros fatores, como doenças concomitantes, estresse e tempo de exposição podem também ser importantes no processo devido à diminuição da resistência à infecção. Animais que adquiram a infecção materna, quando soropositivos, apresentam risco de aborto três vezes maior que animais soronegativos (NETA & JUNIOR, 2006).

Bartels et al. (1999) relacionaram a presença de galinhas nas propriedades rurais como um fator de risco para a infecção de cães e ocorrência de abortamentos

em bovinos. Otranto et al. (2003) levantou a hipótese de que as galinhas podem ser potenciais vetores mecânicos de oocistos, ou cães poderiam adquirir a infecção ao ingerirem carne infectada destas aves.

## 2.8 Epidemiologia

No Brasil, o primeiro caso relatado ocorreu numa propriedade leiteira em São Paulo, onde dez fetos abortados com oito meses de gestação foram sorologicamente examinados pela reação de imunofluorescência indireta (IFI), dos quais oito apresentaram títulos considerados positivos (GONDIM, 1999). No Rio Grande do Sul, entre 30 fetos abortados, 20% apresentavam lesões características e, destes, 10% tiveram a infecção confirmada pela técnica de imunohistoquímica. Estes fetos foram provenientes, na sua maioria, de rebanhos leiteiros, em regime de confinamento em "free-stall", com média de 100 vacas da raça holandesa por rebanho (CORBELLINI, 2000).

Do ponto de vista epidemiológico a importância do hospedeiro definitivo no ambiente rural pode ser destacada pela maior ocorrência de cães soropositivos neste ambiente quando comparados aos cães que vivem nos centros urbanos (SHARMA et al., 2008), e pela forte associação entre a presença de cães nas propriedades e a maior soroprevalência de *N. caninum* nos rebanhos bovinos (CORBELLINI et al., 2006).

A partir de estudos sorológicos e isolamento do parasito sabe-se que a infecção por *N. caninum* esta disseminada em várias espécies de animais e ocorre de forma endêmica em diferentes regiões do mundo. No Brasil, valores de ocorrência descritos em revisões de Gennari (2004) variam de 6,8% a 67,8% nos rebanhos bovinos, 36,5% a 70,9% nos bubalinos, 3,3% a 100% nos caprinos, de 0,0% a 30% nos ovinos e 4,3% a 58,9% na população de cães.

## 2.9 Diagnóstico

Desde o isolamento de *N. caninum*, vários testes diagnósticos estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados. Os métodos diretos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *N. caninum* são os exames histopatológicos, Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e a observação dos cistos nos tecidos a fresco (DUBEY, 2003). Primeiramente o diagnóstico era realizado por microscopia eletrônica através da identificação de cistos nos tecidos, a partir da placenta e fetos abortados. Em fetos abortados a pesquisa é realizada em tecidos e líquidos fetais. Porém devido à extensa distribuição de casos de neosporose bovina no mundo, relativamente poucos casos de isolamento com sucesso foram relatados. Isto ocorre porque os fetos estão geralmente autolisados e o número de cistos teciduais é relativamente pequeno (CONRAD et al.; 1993).

A PCR representa uma das mais importantes técnicas da Biologia Molecular e atualmente é utilizada para o diagnóstico de varias doenças, pela amplificação dos fragmentos de DNA de patógenos. A PCR é utilizada como método diagnóstico da neosporose e tem sua importância na identificação de *N. caninum* a partir de fetos abortados, placenta, líquido amniótico e para a identificação de oocistos nas fezes de animais domésticos e silvestres (BASSO et al., 2001). A vantagem dessa técnica é a identificação de pequenas quantidades do agente em grandes áreas teciduais, porém tempo e equipamentos específicos são fatores limitantes para o uso dessa técnica (ANDERSON et al., 2000). A PCR possibilitou a caracterização molecular do parasito (DUBEY & LINDSAY, 1996) e levou a descoberta de que os isolados de *N. caninum* de cães e bovinos pertencem à mesma espécie (MARSH et al., 1998). A pesquisa de oocistos nas fezes dos hospedeiros definitivos é realizada através do método de centrífugo-flutuação em solução de açúcar (Sheather, 1923 MCALLISTER et al., 1998). Basso et al. (2001), realizaram o método de centrífugo-flutuação em solução de açúcar (SHEATHER, 1923) e encontraram pequenos oocistos semelhantes aos de *Hammondia heydorni*. Posteriormente, os oocistos foram confirmados como sendo de *Neospora* por PCR e inoculação em gerbilis.

Entre os métodos indiretos estão a Imunofluorescência indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Teste de aglutinação direta e o ImmunoBlotting que podem detectar anticorpos específicos de *N.caninum* (DUBEY, 2003). Estes testes

sorológicos apresentam como vantagem uma alta sensibilidade e especificidade sendo indicados para avaliar a exposição e o risco de infecção. A infecção por *N. caninum* induz a formação de anticorpos, entretanto, ainda não é possível determinar o início da infecção com base no exame sorológico (MCALLISTER et al., 2000). Em adultos, a detecção de anticorpos específicos para *N. caninum* é realizado no soro sanguíneo ou no soro do leite ou colostro, fluídos vaginais e saliva de vacas infectadas (OOI et al., 2000). Em fetos, a presença de anticorpos indica a ocorrência de infecção transplacentária deste parasita sem interferência da imunidade passiva, porém um resultado negativo não deve ser descartado, pois dependendo do tempo de infecção o feto pode não ter montado uma resposta imune capaz de ser detectada. Esta resposta depende do estágio de desenvolvimento fetal, do nível de exposição e do tempo entre a infecção e a coleta de sangue (DUBEY et al., 2003).

A Imunofluorescência indireta (IFI) foi o primeiro teste diagnóstico desenvolvido para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY et al., 1988). No ano seguinte, Dubey e Lindsay (1989), desenvolveram um teste imunohistoquímico para facilitar o diagnóstico deste parasito, a partir de soros de animais infectados experimentalmente. A IFI vem sendo utilizada como referencia para o desenvolvimento de outros testes diagnósticos, por utilizar os antígenos intactos de superfície, estes são considerados os mais específicos do Filo Apicomplexa, evitando deste modo a ocorrência de reação cruzada entre os parasitos do mesmo filo, principalmente em relação ao *T. gondii* (DUBEY et al., 2003).

Bjorkman et al., (1994) propôs o primeiro teste ELISA padronizado. Os testes ELISA podem utilizar os antígenos na forma de taquizoíto inteiro (WILLIAMS et al., 1997), taquizoíto sonicado (PARE et al., 1995) e proteínas recombinantes (LALLY et al., 1996). Jenkins et al., (2005) propuseram um teste ELISA utilizando a proteína recombinante NcGRA6 purificada por HPLC, o qual apresentou um aumento da sensibilidade e especificidade quando comparados a outros três antígenos brutos. Bjorkman et al., (1999) descreveram um ELISA para a identificação do tempo de infecção em animais inoculados com taquizoítos por via intravenosa e mais recentemente estudaram a avidéz de IgG de animais infectados com oocistos por via oral (BJORKMAN et al., 2005). O desenvolvimento de testes

ELISA, visando distinguir infecções recentes de infecções crônicas em bovinos, parece promissor para a distinção entre abortos endêmicos e epidêmicos (INNES et al., 2002).

Romand et al., (1998) descreveu o teste de aglutinação direta, em que este teste apresenta como vantagem não necessitar de anticorpos secundários. Foram observadas sensibilidade e especificidade semelhantes a da IFI (BJORKMAN et al., 1999).

Outra possibilidade de diagnóstico é o isolamento do parasita em cultivos celulares ou a partir de animais de laboratório, para isto, tecidos de animais suspeitos são inoculados em cultivos celulares ou camundongos imunossuprimidos (GONDIM et al., 2001). O isolamento *in vivo* e *in vitro* foi realizado em amostras de bovinos por Locatelli et al. (2003) e em búfalos por Rodrigues et al. (2004).

Entretanto um diagnóstico laboratorial produzido a baixo custo ainda não se encontra disponível comercialmente. Por isso, sistemas de diagnóstico, assim como alternativas para o controle da infecção, devem ser considerados prioritários para melhorar os índices produtivos do gado de corte e leite no País.

## 2.10 Profilaxia

*N. caninum* é eficientemente transmitido verticalmente, da mãe para o feto, por várias gerações. Entretanto, a transmissão horizontal parece ser necessária para introduzir novas infecções no rebanho. Desde a descoberta de oocistos eliminados no ambiente por cães, a transmissão ambiental de *N. caninum* para vacas foi esclarecida. Cães não devem ingerir restos fetais ou restos de animais mortos. Não existe vacina para prevenir abortos por Neospora nos bovinos ou a eliminação de oocistos pelos cães (DUBEY, 1999). Em relação à vacinação contra *N. caninum*, até o presente momento não há vacina eficiente capaz de induzir completa imunidade protetora em bovinos. Há uma vacina disponível comercialmente constituída de taquizoítos de *N. caninum* inativados, mas não há dados assegurados sobre sua eficácia (WILLIAMS; TREES, 2006).

A remoção de fetos e restos placentários principalmente para longe do alcance dos hospedeiros definitivos deve ser rotina, reduzir a exposição de vacas às

fezes de hospedeiros definitivos, controlar a população de roedores, cães e gatos co-habitando com o rebanho e cobrir os alimentos e produtos destinados aos bovinos são medidas que deverão ser implementadas em rebanhos positivos, como também devem ser utilizados em rebanhos negativos como medidas preventivas para evitar a doença. Para o controle da transmissão vertical, as vacas infectadas devem ser identificadas através de provas sorológicas e gradativamente eliminadas do rebanho, uma vez que tem grande probabilidade de transmitir a infecção à sua progênie além de maior chance de abortar. Porém essa medida se torna impraticável nas propriedades com altas prevalências. Rebanhos que utilizam a prática de transferências de embriões devem ter o cuidado de utilizar receptoras negativas, pois estudos realizados no Canadá e Austrália mostraram que a transferência de embriões de fêmeas infectadas para receptoras soronegativas pode ser uma maneira eficaz e segura de prevenir a transmissão transplacentária do agente (CAMPERO et al., 2003). Devem-se também, realizar testes sorológicos nos animais antes de introduzi-los no rebanho, a fim de evitar a entrada de animais infectados na propriedade (FARIAS, 2001).

## **2.11 Tratamento**

Não há ainda um tratamento eficaz para essa parasitose em bovinos. A eficácia de sulfonamidas combinada com inibidores de dihidrofolato redutase/timidilato sintetase (DHFR/TS) é maior quando comparada à utilização das sulfas (DUBEY & LINDSAY, 1996). O uso de clindamicina demonstrado por Dubey, Knickman e Greene (2005) levou apenas à diminuição dos sinais clínicos, não erradicando a doença. Como tratamento suporte se recomenda a administração de antiinflamatórios não esteroidais, suplementação com vitamina do complexo B para suprir possíveis necessidades (BARBER, 1998).

## 2.12 Imunologia

Sendo *N. caninum* um protozoário intracelular obrigatório, a resposta imune mediada por células desempenha um importante papel frente à infecção. Essa constatação foi inicialmente feita por Innes et al. (1995), quando observaram que células tratadas *in vitro* com IFN gama apresentavam inibição da multiplicação do parasito, quando comparadas com aquelas não tratadas.

O papel dos anticorpos na neosporose não esta suficientemente esclarecido. Acredita-se que atuem em taquizoítos situados extracelularmente (INNES et al., 2002). Uma resposta de anticorpos IgG2 anti-*N. caninum*, foi encontrada em bovinos infectados experimentalmente (WILLIANS et al., 2000).

Estudos mostram que tanto a imunidade inata quanto a adquirida estão envolvidas na resistência a neosporose (NISHIKAWA et al., 2003). Foi demonstrado que enquanto uma resposta Th1 esta relacionada a uma infecção aguda por *N. caninum* (RITTER et al., 2002), uma resposta Th2 esta diretamente relacionada a susceptibilidade a doença (NISHIKAWA et al., 2003).

Durante a gestação a resposta imune se caracteriza de diferentes formas dependendo do estágio gestacional. Na fase inicial da gestação ocorre uma resposta imune ineficaz do feto, porém a mãe é capaz de uma resposta imune celular proliferativa com produção de IFN gama em resposta aos antígenos (INNES et al., 2002). No terço médio inicia uma resposta imune do tipo Th2 proveniente do feto e da placenta, favorecendo a comunicação do feto com sua mãe (INNES et al., 2002). No terço final o feto apresenta uma maturidade do sistema imunológico e por isso, dificilmente a infecção provoca o aborto. Estudos sugerem que uma resposta Th1 compromete a gestação, enquanto uma resposta Th2 localizada pode favorecê-la (INNES et al., 2005).

## 2.13 *Pichia pastoris*

As bactérias são os organismos mais comuns para a expressão de proteínas recombinantes, no entanto, não possuem sistema de endomembranas e não realizam as modificações pós-traducionais, o que pode impedir o correto

processamento de proteínas eucariotas (CREEG et al., 1999). Assim, quando o interesse é produzir proteínas de organismos eucariotos, as leveduras destacam-se como hospedeiras alternativas, por serem unicelulares detêm as vantagens do sistema bacteriano no que diz respeito à facilidade de manipulação e cultivo em escala industrial, além de serem capazes de realizar as modificações pós-traducionais adequadas de várias proteínas (CREEG et al., 1999). Vários estudos estão sendo realizados no sentido de utilizar leveduras alternativas para a produção de proteínas recombinantes. *Pichia pastoris* mostra-se muito eficiente para a síntese e expressão de proteínas heterólogas para aplicações acadêmicas e industriais (COS et al., 2005). Uma das características dessa levedura é que ela não é considerada uma forte fermentadora como *Saccharomyces cerevisiae*, e, portanto rende mais biomassa e não gera etanol como produto, que acumulado atinge rapidamente níveis tóxicos. O sistema *Pichia* apresenta o promotor AOX1 que codifica a enzima álcool oxidase este é reprimido em cultura contendo glicerol e induzido quando as células são transferidas para um meio contendo metanol como única fonte de carbono (BOETTNER et al., 2002). Este sistema apresenta também um segundo promotor funcional para a enzima álcool oxidase, o gene AOX2 que codifica uma proteína que é 97% idêntica e tem a mesma atividade específica do AOX1. Algumas proteínas heterólogas são glicosiladas quando secretadas em leveduras, porém eventos indesejáveis como hiperglicosilação podem ocorrer durante este processo gerando proteínas não funcionais quando utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expressão (NOHR et al., 2003). Outras vantagens que este sistema apresenta além da glicosilação incluem: a alta regulação pelo promotor AOX1, a adaptabilidade de culturas de *Pichia* para altas densidades celulares permitindo alcançar g/l de proteínas recombinantes no meio de cultura, a simplicidade da indução da expressão de proteínas por metanol, o baixo nível de secreção de proteínas nativas, além de crescer em meio simples utilizando metanol como única fonte de carbono (COS et al., 2005). Segundo CHOI et al. (2005) e COS et al. (2005) a aquisição de altas concentrações de proteínas heterólogas no sobrenadante da cultura depende também da estabilidade da proteína as condições ambientais como sua resistência a ação das proteases. Devido à eficiência do sistema *Pichia* de expressão, a levedura *Pichia pastoris* cepa

X33 foi transformada por eletroporação no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal de Pelotas/RS com o gene *ncsr2*.

## 2.14 NcSRS2

A pesquisa de antígenos e o desenvolvimento de proteínas recombinantes de *N. caninum*, fornecem uma série de informações para a obtenção de um melhor diagnóstico, de um tratamento e a diferenciação deste protozoário aos agentes relacionados a ele.

Hemphill, Gottstein (1996), identificaram a proteína NcSRS2 de *N. caninum* como sendo uma proteína imunodominante de membrana de bradizoítos e taquizoítos. Em 2001, foi determinado um domínio antigênico localizado na região C-terminal, envolvendo aminoácidos do segundo e terceiro terço do polipeptídeo (SON et al., 2001). Foi confirmada a ausência de reações inespecíficas com antígenos de *T. gondii* e foi determinada a localização subcelular da proteína através da IFI e imunoeletromicroscopia com partículas de ouro, após a purificação de anticorpos específicos contra a NcSRS2. Em outro estudo, a proteína NcSRS2 foi utilizada para a padronização de um ELISA indireto em que este mostrou não haver reações cruzadas com *T. gondii*, como também se mostrou específica para *N. caninum* frente a soros positivos para *Sarcocystis* spp, *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria bovis*, *Babesia divergens* (SCHARES et al., 2000). Em um trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal de Pelotas foi desenvolvido um teste ELISA com a proteína NcSRS2 expressa na bactéria *Escherichia coli*, este apresentou resultados satisfatórios de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de *N. caninum* em bovinos. Não foi observada reação cruzada com *Toxoplasma gondii*.

## 2.15 Perspectivas

Uma vez que o diagnóstico sorológico é uma estratégia para o controle da neosporose, é necessário que ele se torne acessível ao setor produtivo (LARSON et

al., 2004). Os testes diagnósticos comercializados no País são importados e de alto custo, impedindo a realização dos mesmos de forma ampla.

O Programa de Pós Graduação da Universidade Federal de Pelotas em parceria com a EMBRAPA Gado de Corte Mato Grosso do Sul, desenvolveu um projeto para a produção de antígenos e de um teste sorológico ELISA (Ensaio Imunoenzimático) para o diagnóstico da neosporose em bovinos, permitindo desta forma a redução significativa do custo do teste para oferecimento ao setor produtivo, abrindo novas perspectivas, que poderão resultar em formas de diagnóstico e controle mais eficientes.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e padronizar um ELISA para o diagnóstico da neosporose.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Clonar o gene *ncsrs2* de *N. caninum* em *Pichia pastoris*;
- Expressar a proteína NcSRS2;
- Concentrar a proteína NcSRS2 com diferentes precipitantes;
- Purificar a proteína NcSRS2 obtida;
- Realizar análises imunológicas para a confirmação da proteína NcSRS2 recombinante.
- Padronizar um ELISA com a proteína NcSRS2 recombinante para o diagnóstico da neosporose.

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Parasitos**

As amostras de *N. caninum* do isolado Nc-1 foram propagado em células Vero utilizando DMEM (Dulbecco's modified essential médium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantido à 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, conforme protocolos estabelecidos (DAVISON et al., 1999). Quando 80% das células Vero foram destruídas pelos taquizoítos de *N. caninum*, as monocamadas de células foram retiradas e lavadas duas vezes com uma solução tampão (PBS) e centrifugadas por 1000g a 10 min. As amostras foram cedidas pela EMBRAPA gado de corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, para a obtenção do antígeno *ncsrs2*, onde este se encontrava clonado no vetor pET100.

### **4.2 Obtenção e preparo do gene *ncsrs2***

#### **4.2.1 Síntese dos *primers***

A seqüência do gene *ncsrs2* de *N. caninum* foi obtida no GenBank. Posteriormente, foram desenhados *primers forward* (5' CGG AAT TCC CAA AGA GTG GGT GAC TGG AAC 3') e reverso (5' GCT CTA GAC ATG CAT CTC CTC TTA ACA CGG G 3'), utilizando-se o programa Vector NTI 8.0 (Invitrogen), com a adição de sítios de restrição das endonucleases *EcoRI* e *XbaI*.

#### **4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Com a finalidade de amplificar o gene *ncsrs2*, foi realizada uma PCR. A reação de PCR continha 10 ng de DNA, 150 ng de cada primer, 200 µM de dNTPs e 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). A ciclagem de temperaturas foi de 3 min a

94 °C, seguido de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1min e 30s por 35 ciclos, no volume final de 50 µl.

Para confirmar a amplificação do DNA, 5 µl do produto de cada reação PCR com 2 µl de tampão de amostra 6x e o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad) com tampão TBE a 80 volts por 50 minutos. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultra-violeta.

#### **4.2.3 Purificação dos produtos de PCR**

As purificações dos produtos de PCR foram realizadas seguindo as instruções do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, UK). Inicialmente foram adicionados no tubo de microcentrífuga contendo o DNA 500 µl de tampão de captura (contendo acetato), a seguir foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor e que foi centrifugada por 1 min a 14.000g. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e foi adicionado, na coluna, 500 µl de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA; etanol para concentração final de 80%). A seguir o sistema foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi descartado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e nela foi adicionado 40 µl de tampão de eluição (TE 1X), deixando este sistema incubar a temperatura ambiente por 1 min. Após houve uma nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. Posteriormente, 3 µl do produto foi analisado em gel de agarose 1% e o DNA restante foi armazenado a – 20°C.

#### 4.2.4 Digestão do gene *ncsrs2* e do vetor pPICZαB

Para que as extremidades dos fragmentos amplificados fossem compatíveis com as extremidades dos vetores, foi realizado a digestão do vetor pPICZαB (Invitrogen) e do gene *ncsrs2* com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *XbaI*.

A reação de digestão foi realizada em um volume final de 50 µl. Para tal foram utilizados 20 µl de DNA, 10U de cada enzima, 5 µl do tampão de reação 10X e q.s.p. de água estéril. A reação foi incubada a 37° C, por 16h e 5 µl do produto foi analisado em gel de agarose 1% corado com Gel Red.

Para retirar as impurezas da digestão, foi novamente realizada a purificação do DNA plasmidial com “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, seguindo o protocolo descrito no item 2.2.3.

### 4.3 Clonagem do gene *ncsrs2* no sistema pPICZαB

A metodologia empregada neste trabalho foi baseada no Manual da Invitrogen Tech, Carlsbad, CA.

#### 4.3.1 Ligação do gene *ncsrs2* no vetor pPICZαB

O gene *ncsrs2* foi inserido no vetor pPICZαB utilizando-se o sistema *Pichia* de clonagem (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A reação de ligação do produto de PCR com o vetor pPICZαB (Invitrogen) foi realizada a temperatura ambiente durante 2h. Foram utilizados 400µg do DNA e 200µg do vetor pPICZαB (Invitrogen), 40U/µl de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e tampão de reação 5X, em volume final de 20µl.

#### 4.3.2 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Para a realização deste procedimento, foram utilizadas células de *E. coli* cepa TOP 10 (Invitrogen) e foram preparadas para eletroporação utilizando o protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. Uma alíquota da cultura de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) foi semeada, por esgotamento, em uma placa de LB ágar. A placa foi incubada a 37°C, por um período de 16 a 24 horas (*overnight*). Do crescimento resultante, uma colônia isolada, foi semeada em 2 ml de LB líquido e cultivado *overnight* a 37°C sob agitação de 225 rpm. Posteriormente, o cultivo foi inoculado em um frasco com a capacidade de 500 ml contendo 50 ml de meio LB líquido e cultivado a 37°C, sob agitação de 225 rpm, até a densidade ótica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) atingir entre 0,5 e 0,7 (aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/mL). A seguir o cultivo foi transferido para tubos de centrifuga estéreis com a capacidade de 50 ml e resfriado em banho de gelo por 20 minutos, sendo centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o *pellet* foi ressuscitado em 50 ml de água estéril a 4°C. A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, o *pellet* ressuscitado em 25 ml de glicerol 10% estéril a 4°C, após mais uma centrifugação sob as mesmas condições foi eliminado o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuscitado em 2 ml de glicerol 10% estéril a 4°C para cada 50 ml de meio original. As células eletrocompetentes foram fracionadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml de capacidade (alíquotas de 50 µl) e congeladas a – 70°C para posterior transformação.

#### 4.3.3 Transformação em *E. coli*

O protocolo de transformação em *E. coli* foi realizado conforme Sambrook & Russel (2001), com algumas modificações. As células eletrocompetentes foram removidas do – 70°C e descongeladas em gelo. Para a transformação utilizou-se 100 µl de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) e 0,5 µl do produto de ligação ou DNA plasmidial. Com uma ponteira estéril foram misturadas às amostras, agitou-se gentilmente e transferiu-se para uma cubeta de eletroporação, (31 Gene Pulser Curvette -Bio-Rad Laboratories) de 0,2 cm de largura, 4°C.

Acoplada ao eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories), ajustado para as seguintes condições: 25  $\mu$ FD de capacitância, 200 Ohms de resistência e 2,5 kV de voltagem, a cubeta foi submetida ao pulso elétrico. Imediatamente após o choque elétrico 500  $\mu$ l de meio LB líquido foi adicionado à cubeta, homogeneizado e transferido para um tubo de microcentrífuga estéril com 1,5 ml de capacidade, o qual foi incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37° C por 1 hora.

Após este período de incubação, as células transformadas foram centrifugadas em microcentrífuga a 14000g por 1 min. 400  $\mu$ l do sobrenadante foram removidos e as células ressuspendidas no volume restante, o qual foi semeado em uma placa contendo o meio LB/Zeocina 50 $\mu$ g/ $\mu$ l, o volume depositado sobre a placa foi espalhado por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski e posteriormente as placas foram incubadas a 37° C, *overnight*.

#### **4.3.4 Seleção dos clones recombinantes em *E. coli*.**

Para a análise dos clones recombinantes em *E. coli*, primeiramente, foi realizada uma triagem rápida com fenol:clorofórmio. As colônias bacterianas foram ressuspendidas em um tubo de microcentrífuga contendo 15  $\mu$ l de tampão de amostra 1x contendo 10  $\mu$ g/ml de RNase e 15  $\mu$ l de fenol:clorofórmio (v:v). O tubo de microcentrífuga foi levado ao vortex para homogeneização, centrifugado por 5 min a 14.000g. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% com 15  $\mu$ l do sobrenadante desta reação. As colônias recombinantes foram selecionadas e expandidas em meio de cultura LB líquido estéril com 50  $\mu$ g/ml de zeocina, mantidas sob agitação (225 rpm) *overnight* a 37°C, para posterior extração de DNA plasmidial. Os clones foram caracterizados enzimaticamente com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI.

#### 4.3.5 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*.

Um pré inoculo de 100ul foi semeado em 50ml de LB líquido (Luria Bertani) com 50ug/ml de zeocina durante 18h em agitador orbital. A amostra foi centrifugada a 5000g/5 minutos. O sedimento foi ressuscitado com 14 ml da Solução I e adicionado 3 ml da Solução II para que ocorra a lise celular, homogeneizado lentamente 15X, logo após foi adicionado 6 ml da Solução III e homogeneizado lentamente 15X. A amostra foi centrifugada a 10.000g durante 15 minutos, o sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi separado e adicionado a mesma quantidade de álcool isopropílico 100%, homogeneizado e armazenado -20°C durante 2h. Logo após foi centrifugado e o sedimento lavado com 2 ml de etanol 70% gelado, a amostra foi homogeneizada e centrifugada novamente durante 15 minutos. O sedimento foi ressuscitado com 50ul de água estéril e adicionado 1ul de RNase A, 500ul de fenol-clorofórmio foi adicionado e a amostra foi homogeneizada e centrifugada durante 5 minutos a 10.000g. A solução aquosa foi separada e então adicionada 15ul de acetato de amônia 7,5M e 2,5X o volume de etanol 100%, homogeneizado e armazenado a -20°C durante 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 10.000g/10 minutos e no sedimento foi adicionado 500ul de etanol 70%, foi centrifugado a 10.000g/5 minutos e então o sedimento foi ressuscitado com 50ul de TE 1X. Foi utilizado 10ug do plasmídeo 1 obtido da extração, este foi linearizado através de digestão com 2ul da enzima PME1 (New England Biolabs), 2ul de BSA, 20ul de tampão e 166ul de água destilada totalizando um volume final de 200ul. A reação foi mantida em banho Maria (37°C) durante 2 horas e após em temperatura ambiente por mais 12 horas. Para a purificação foram utilizados 160ul da amostra e adicionado 16ul de acetato de amônia 7,5M e 400ul de etanol absoluto. A amostra foi homogeneizada e colocada a -20°C durante 20 minutos, após foi centrifugada a 5.000g/10 minutos e o sedimento ressuscitado com 30ul de água destilada.

#### 4.4 Transformação de *Pichia pastoris* e seleção de colônias transformantes

##### 4.4.1 Preparo de células competentes de *P. pastoris* e transformação com pPICZ $\alpha$ B/*ncsrs2*

A produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo de *P. pastoris* foi realizada a partir da introdução do plasmídeo pPICZ $\alpha$ B/*ncsrs2* na estirpe de *P. pastoris* X33. Leveduras eletrocompetentes foram eletrotransformadas com aproximadamente 10  $\mu$ g do plasmídeo pPICZ $\alpha$ B/*ncsrs2* linearizado com a enzima *PMEI*. Para recuperação, foi adicionado as células 1ml de sorbitol e incubadas em estufa durante 1 hora/ 30°C e após foi adicionado 1 ml de meio YPD colocado no shaker a 30° C por 1h. Após este tempo, a cultura foi plaqueada em meio sólido (YPDS-Ágar) contendo antibiótico apropriado (zeocina) na concentração de 100  $\mu$ g/ml e colocado na estufa 30°C

Colônias transformantes foram transferidas para outra placa contendo YPD-Ágar e cultivadas a 30°C/24h para a seleção das colônias transformadas.

##### 4.4.2 Dot blotting e PCR das colônias recombinantes de *P. pastoris*

Um Dot Blotting de colônia foi realizado nos meios MM e BMMY para verificar a expressão da proteína recombinante. Como controle positivo usou-se a proteína NcSRS2 expressa em *E. coli* e como controles negativos a cepa x33 de *P. pastoris* e a proteína BSA (Albumina Sérica Bovina). As colônias da levedura recombinante foram induzidas durante 2 dias com 200 $\mu$ l de metanol filtrado. Após foi colocada uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em contato com estas colônias durante 1h. A membrana foi bloqueada com leite em pó em PBS-T a 5% durante 1h sob agitação. Foi adicionado soro de camundongo inoculados com a proteína NcSRS2 purificada a partir de *E. coli* na diluição de 1:200 em PBS-T durante 1h sob agitação. Após foi adicionado o conjugado anti-camundongo IgG (Sigma) na diluição de 1:5000 em PBS-T durante 1h e sob agitação. A membrana foi lavada durante os 3 tempos com PBS-T. A revelação foi feita usando 3,3'-tetrahidrocloro (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A colônia supostamente transformada foi selecionada. Para a confirmação da presença do plasmídeo no genoma de *P. pastoris*, algumas células da colônia foram desnaturadas a 99°C/10 minutos e então realizado o PCR, com 35 ciclos de 94°C por 3 min, 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, 72°C por 1min e meio e 72°C por 7 min. Após a amostra da PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%. O clone selecionado foi armazenado em estoque de glicerol a -70°C.

#### **4.4.3 Cultivo em Erlenmeyer com 25ml de meio**

A colônia transformante foi inoculada em 5 ml de meio YPD com 50µg/ml de zeocina e cultivada em agitador orbital durante 24 h/28°C/100rpm para realização da indução em pequena escala. Após foi adicionado 10ul do pré-inóculo em 25 ml do meio BMGY (meio contendo glicerol para a produção de massa), colocado no shaker 24h/28°C/100rpm. Quando a D.O<sub>600</sub> entre 2-6 foi atingida, a amostra foi centrifugada a 5000g por 5 minutos e o sedimento ressuspendido em 25 ml do meio BMMY (meio contendo metanol para a indução). A amostra foi induzida para expressão da proteína recombinante durante 5 dias com 125µl de metanol filtrado e coletado 100µl de amostra diariamente para posterior análise. No final a amostra foi centrifugada por 10.000g/10 min. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado para o Dot Blotting para verificação da expressão da proteína NcSRS2.

#### **4.4.4 Cultivo em fermentador**

O cultivo de *P. pastoris* recombinantes foi realizada no volume de um litro de meio BMMY em fermentador. Para isso, um pré-inóculo com a colônia 1 transformante foi feito em 5ml de YPD com 50µg/µl de zeocina. Então o inóculo estéril foi adicionado ao fermentador, que foi ligado previamente para promover a aeração e calibração da sonda de oxigênio para 100%.

A fermentação iniciou com agitação de 100rpm. A vazão de ar foi mantida a 1vvm, temperatura e pH foram mantidos constantes: 28°C e 6,0 respectivamente, durante todo o experimento. Amostras de meio fermentado foram coletadas

diariamente durante os 5 dias de fermentação para análise, 1 ml de anti espumante (silicone) e 10 ml de metanol filtrado foram adicionados a cada 24h. Ao final, o meio fermentado foi centrifugado 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante congelado.

#### **4.4.5 Dot Blotting**

Um volume de 5µl de cada amostra foi adicionado em uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada com leite em pó em PBS-T a 5% durante 1h sob agitação. Três anticorpos primários foram testados em diferentes membranas (soro de camundongo imunizado com a proteína NcSRS2 recombinante de *E. coli* na diluição de 1:200 em PBS-T, soro de bovino positivo para *N. caninum* na diluição de 1:200 em PBS-T e anti-histidina (Sigma) na diluição de 1:10.000) e deixado em contato durante 1h sob agitação. Após foi adicionado os conjugados-peroxidase (anti-mouse na diluição de 1:2000 em PBS-T, anti-bovino na diluição de 1:4000 em PBS-T e anti-mouse na diluição de 1:2000 em PBS-T) respectivamente, durante 1h e sob agitação. A membrana foi lavada por 3X com PBS-T. A revelação foi feita usando 3,3'-tetrahidrocloro (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4.5 Precipitação da proteína NcSRS2**

#### **4.5.1 Precipitação com sal**

Para determinar a condição ótima de precipitação foi adicionado sulfato de amônio no sobrenadante a cada 2 horas/4°C, partindo de uma saturação de 20% (500ml de meio/56,5g de sal), 30% (29,5g), 40% (30,5g), 50% (31,5g), 60% (32,5g) até atingir uma saturação de 70% onde foi adicionado 33,5g do sal. Amostras foram coletadas em todas as saturações para posterior Dot Blotting, conforme descrito no item 2.4.5

#### 4.5.2 Precipitação com solventes orgânicos

Para a precipitação com Acetona foram utilizadas 4 diluições (30%, 50%, 60%, 70% de acetona no meio do cultivo de *P. pastoris* recombinante obtido em fermentador).

Para a precipitação com Álcool etílico foram feitas 7 diluições (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80% e 100% de álcool etílico no meio de cultivo de *P. pastoris* recombinante obtido em fermentador).

As amostras foram deixadas em refrigeração durante 3h, centrifugada por 30 segundos e o sedimento ressuspendido no mínimo de água. As amostras foram submetidas ao Dot Blotting, conforme descrito no item 2.4.5.

#### 4.5.3 Diálise e liofilização da proteína

Cada amostra precipitada foi colocada dentro de uma membrana semipermeável para diálise (Viskase corporation Dry 21MM) individual. Cada membrana foi colocada em um Becker diferente contendo 1 litro de água destilada, estes foram levados para câmara fria a 4°C durante 3 dias, sob agitação. A troca de água foi realizada a cada 8h. Após, as amostras foram congeladas a -70°C para posterior liofilização. As amostras foram liofilizadas durante 24 horas.

#### 4.6 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford

Um total de 10mg da proteína obtida por concentração com sulfato de amônio foi diluída em 1000µl de TE e 5mg das proteínas obtidas pela concentração com solventes orgânicos foram diluídas em 500µl de TE.

O procedimento utilizado corresponde ao método “standart” descrito no artigo de Bradford (1976). O reativo foi preparado dissolvendo 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad) em 50ml de etanol v/v (Merck), a esta solução adicionou-se 100ml de ácido fosfórico a 85% p/v diluindo-se em proveta até 1L com água destilada. Esta solução foi filtrada em sistema Millipore e armazenada em

geladeira em frasco âmbar, sendo estável por um mês. Como padrão foi utilizado uma curva de BSA 1mg/ml (Albumina Sérica Bovina) pura e nas diluições 1µg/µl; 0,5µg/µl; 0,25µg/µl; 0,125µg/µl. As amostras das proteínas recombinantes foram utilizadas puras e diluídas em PBS 1X 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. A leitura das amostras foi realizada no leitor de ELISA a 610nm. A comparação dos resultados das absorbâncias com a curva padrão permite a determinação da concentração das proteínas.

#### **4.6.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel de poliacrilamida 12%. Antes da aplicação no gel as amostras foram fervidas durante 10 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X em uma voltagem constante de 60V. As bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após incubação deste por 12h na solução corante preparada com *Coomassie Blue*, seguida pela descoloração em solução descorante até o aparecimento das bandas.

#### **4.6.2 Western Blotting**

Nesse método, as proteínas foram submetidas a um SDS-PAGE 12% conforme item 2.6.1., e eletrotransferida para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada com leite em pó em PBS-T a 5% durante 1h sob agitação. Soros positivos testados por Imunofluorescência Indireta de bovinos naturalmente infectados a campo por *N. caninum* foram utilizados na diluição de 1:200 em PBS-T e deixado em contato durante 1h sob agitação. Após foi adicionado o conjugado anti-bovino (Sigma) na diluição de 1:4000 em PBS-T durante 1h e sob agitação. A membrana foi lavada por 3 vezes com PBS-T. A revelação foi feita usando 3,3'-tetrahidrocloro (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.7 Padronização e avaliação do ELISA com NcSRS2

Para a padronização do ELISA com a proteína recombinante NcSRS2, diluições ótimas do antígeno, soros, conjugado e tampões utilizados no ensaio, assim como o tempo de parada da reação enzimática foram avaliados. Amostras de soros de bovinos e ovinos negativos e positivos para *N. caninum* por IFI foram testados. Um total de 139 amostras de soros de bovinos e 40 de soros de ovinos foram testados no ELISA com NcSRS2 recombinante. Os soros testados foram provenientes de 2 regiões distintas do Brasil: Rio Grande do Sul (cedidos pelo Laboratório de Protozoologia da UFPel) e Mato Grosso do Sul (cedidos pela EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande). Esses soros estão estocados a -20°C, na soroteca do Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal de Pelotas, e foram escolhidos baseados na disponibilidade dos mesmos. Placas de poliestireno de 96 cavidades (Nunc), foram sensibilizadas com 50ng/orifício da proteína NcSRS2 recombinante precipitada com Sulfato de Amônio diluída em Tampão Carbonato-Bicarbonato pH= 9,6, as placas foram incubadas à 37°C durante 1 hora e trinta minutos e após lavadas 3X com PBS-T. Para o bloqueio foi utilizado leite em pó 5% (100uL/orifício) por uma hora a 37°C. Após três lavagens com PBS-T, os soros testes, controles positivos e negativos, diluídos 1:100 em PBS-T (100uL/orifício), foram adicionados e as placas incubadas por uma hora a 37°C. Após mais três lavagens, 100ul/orifício do conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Sigma) e anti-IgG ovino/peroxidase (Sigma) foi adicionado na diluição de 1:4000 em PBS-T, seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após cinco lavagens o cromógeno/substrato ortofenil-enodiamina (OPD; Sigma)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100uL/orifício) foi adicionado. A reação enzimática foi parada após quinze minutos pela adição H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (50uL/orifício). Os resultados de absorbância obtidos foram lidos em espectrofotômetro para microplacas (TermoPlate), com comprimento de onda de 492nm.

#### **4.8 Análise estatística**

Para determinar a especificidade, sensibilidade, ponto de corte e valor preditivo do ensaio de diagnóstico os resultados dos 139 soros de bovinos e 40 soros de ovinos foram submetidos a análise ROC (Receiver Operating Characteristic), utilizando o pacote estatístico MedCalc (version 10.3.0.0) ([www.medcalc.be](http://www.medcalc.be)).

## 5 Resultados

### 5.1 Construção do Vetor pPICZ $\alpha$ B/*ncsrs2*

O gene *ncsrs2* foi amplificado por PCR, utilizando-se *primers* com homologia às regiões flanqueadoras deste gene com a adição de sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *XbaI*. Este gene possui aproximadamente 732 pb. Tal número foi compatível com o tamanho do fragmento amplificado na reação de PCR como pode ser observado na **figura 1**.

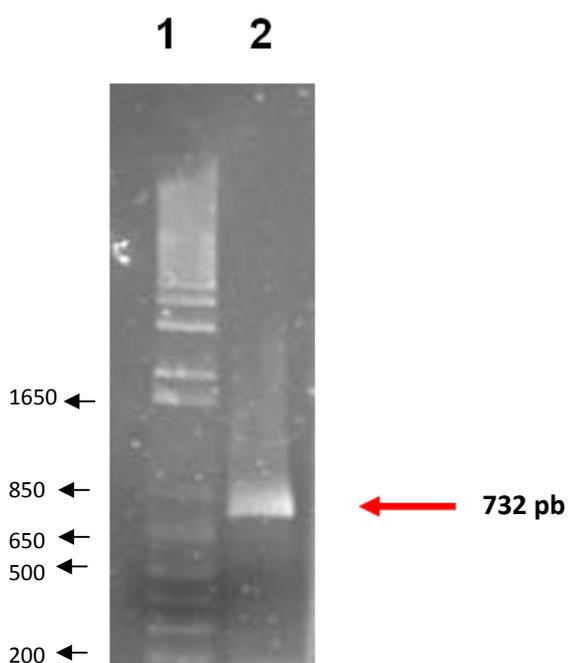


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% do Produto de amplificação do gene *ncsrs2* de *Neospora caninum*. Linha 1) Marcador 1Kb, Linha 2) Gene *ncsrs2* amplificado.

Após a PCR, os fragmentos obtidos foram purificados e a seguir, realizou-se digestão do gene *ncsrs2*, bem como do DNA do vetor pPICZ $\alpha$ B com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *XbaI*, Estas enzimas foram selecionadas por estarem presentes nos sítios de clonagem no vetor de expressão a ser utilizado

(pPICZ $\alpha$ B) e, ao mesmo tempo, por não existirem estes sítios de restrição dentro do gene a ser amplificada (*ncsrs2*).

O material obtido no final do processo de digestão e purificação foi suficiente para a realização das etapas posteriores de clonagem.

O vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZ $\alpha$ B possui múltiplos sítios de clonagem com 10 sítios de restrição únicos que permitem uma eficiente inserção do gene no vetor de expressão. Este vetor possui também uma cauda de polihistidina C-terminal que permite a detecção da proteína de fusão através de anticorpos anti-His tag e a purificação através de resina de níquel, apresenta um gene de resistência a zeocina, além de apresentar uma sequência sinal denominada fator alfa que permite que a proteína produzida seja transportada para o exterior da membrana citoplasmática. As características deste vetor de expressão estão sumarizadas na figura 3. A ligação do gene *ncsrs2* ao vetor pPICZ $\alpha$ B resultou no plasmídeo denominado de pPICZ $\alpha$ B/*ncsrs2*. O mapa do vetor pode ser observado na **figura 2**.

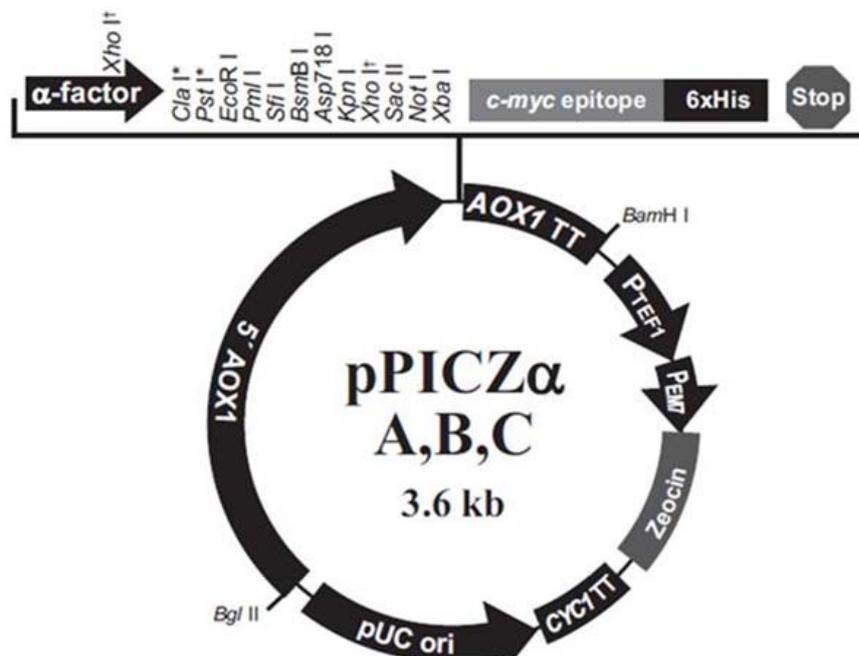


Figura 2 - Mapa do vetor de expressão pPICZ $\alpha$ B, mostrando a origem de replicação em *Escherichia coli*, pUC; fragmento contendo o promotor AOX1; região de múltiplos sítios de clonagem; myc epitopo tag para detecção da proteína através de anticorpos; cauda de 6x Histidina para detecção e purificação da proteína; terminador de transcrição AOX1 TT; promotor de *transcription elongation factor 1* (TEF1) que dirige a expressão do gene de resistência a zeocina, e terminador de transcrição CYC1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para detectar quais as colônias que apresentavam o gene *ncsrs2* ligado ao vetor pPICZαB foi realizado uma triagem rápida com fenol:clorofórmio (SANDRA et al., 2007). Uma das colônias, que apresentou DNA plasmidial maior que o DNA plasmidial do controle, foi cultivada e submetida à extração de DNA plasmidial. Após a confirmação da presença do gene *ncsrs2* ligado ao vetor pPICZαB, o plasmídeo recombinante foi digerido com a enzima *PMEI* para a sua linearização (figura 3).

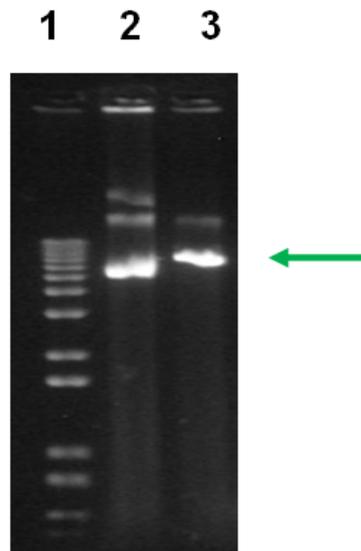


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão do plasmídeo pPICZαB/*ncsrs2* com a enzima de restrição *PMEI*. Linha 1, marcador 1Kb; Linha 2, plasmídeo não digerido; Linha 3, plasmídeo digerido. pPICZαB/*ncsrs2* com a enzima de restrição *PMEI*.

## 5.2 Transformação de *Pichia pastoris* X33 com pPICZαB/*ncsrs2*

O plasmídeo recombinante pPICZαB/*ncsrs2* foi linearizado com a enzima *PMEI* e utilizado para transformar *P. pastoris* X33 eletrocompetentes. Com as colônias supostamente recombinantes foi realizado um “Dot Blotting e PCR de colônia” para verificar a presença do gene *ncsrs2* no genoma de *P. pastoris*.

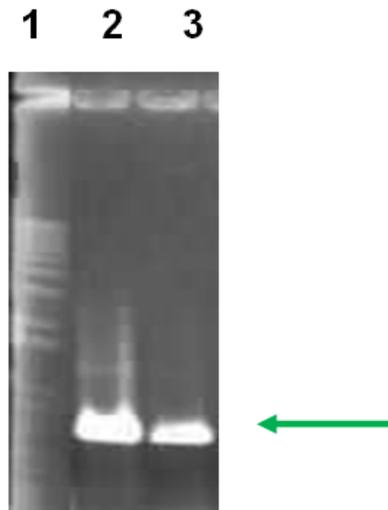


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do fragmento *ncsrs2* por PCR de colônia. Linha 1, marcador 1 Kb; Linha 2, controle positivo pPICZαB/pET100; Linha 3, amplificação do fragmento *ncsrs2* da colônia transformada.

Das 97 colônias que cresceram na placa contendo YPDS todas foram positivas no Dot Blotting de colônia, destas a colônia com maior expressão foi submetida ao PCR de colônia em que esta apresentou uma banda única e de tamanho correspondente ao esperado de 732pb, como mostra a **figura 4**. O clone positivo para o PCR de colônia foi utilizado para os ensaios de indução da expressão da proteína NcSRS2.

### 5.3 Teste de Expressão das proteínas recombinantes

Inicialmente foi realizado um teste em pequena escala e o nível de expressão da proteína recombinante em meio líquido foi monitorado durante 5 dias. A cada 24 h uma alíquota do sobrenadante do cultivo era coletada e avaliada quanto à expressão através de Dot Blotting. Através desta avaliação, confirmou-se que a expressão da proteína NcSRS2 recombinante ocorreu na forma secretada (sobrenadante do cultivo), porém a expressão foi visualizada somente no 5º e 6º dia de indução. Desta forma partiu-se para um teste em grande escala em fermentador, neste a expressão da proteína NcSRS2 recombinante foi visualizada já nas primeiras 24h se mantendo crescente até o 6º de indução como mostra a figura 5.

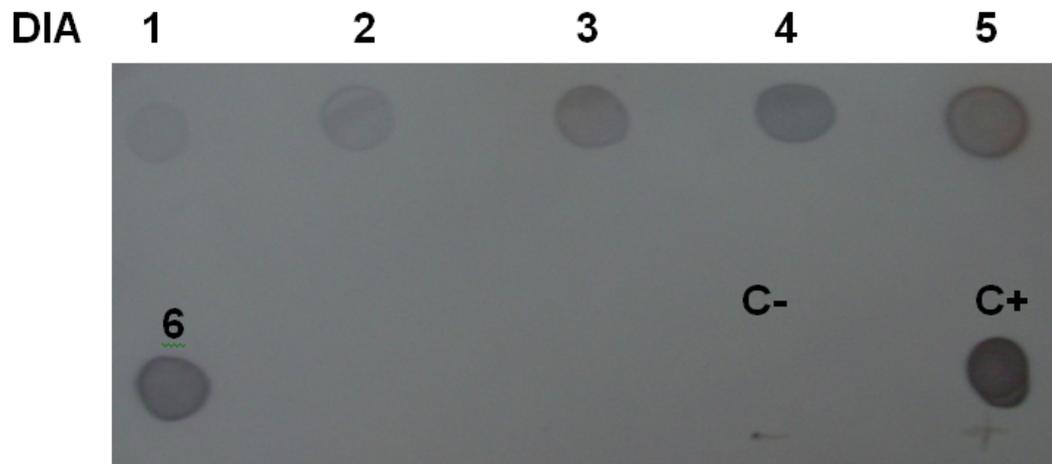


Figura 5 - Dot Blotting do sobrenadante da cultura em fermentador. Controle positivo (C+) e controle negativo (C-): proteína NcSRS2 produzida em *Escherichia coli* e sobrenadante da cultura de *Pichia pastoris* cepa X33 não transformada respectivamente.

#### 5.4 Precipitação com Sal e Solventes Orgânicos

O sobrenadante do cultivo de seis dias foi submetido à precipitações sucessivas com diferentes tipos de solventes utilizados em quantidade crescente de saturação, a fim de determinar em qual fração precipitada estaria concentrada a maior quantidade de proteína recombinante. Os resultados de precipitação com Sulfato de Amônio, Acetona e Álcool Etilico estão nas figuras, 6, 7 e 8, respectivamente.

Observa-se que a precipitação da proteína NcSRS2 se manteve constante em todas as diluições, porém a precipitação com acetona e álcool apresentou as maiores concentrações de proteína em relação ao sulfato de amônio. Escolheu-se a precipitação com sal por esta apresentar uma maior quantidade de amostra (800ml) enquanto que as precipitações com solventes orgânicos foi separada uma alíquota de apenas 200ml. A identidade da proteína precipitada foi determinada por Dot Blotting utilizando três anticorpos primários testados em diferentes membranas (soro de camundongo imunizado com a proteína NcSRS2 recombinante de *E. coli* na diluição de 1:200 em PBS-T, soro de bovino positivo para *N. caninum* na diluição de 1:200 em PBS-T e anti-histidina (Sigma) na diluição de 1:10.000), como mostra as

figuras 6, 7 e 8. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as análises (Figura 9).

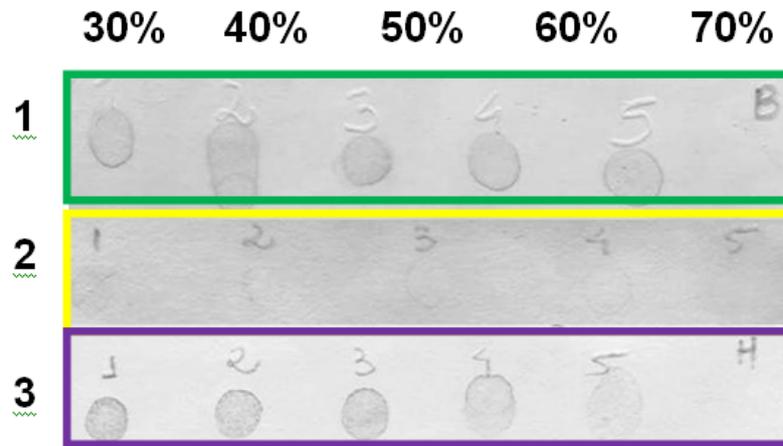


Figura 6 - Dot Blotting da proteína NcSRS2 precipitada com Sulfato de Amônio. Linha 1) Soro de Bovino; Linha 2) Soro de camundongo; Linha 3) Anti Histidina.

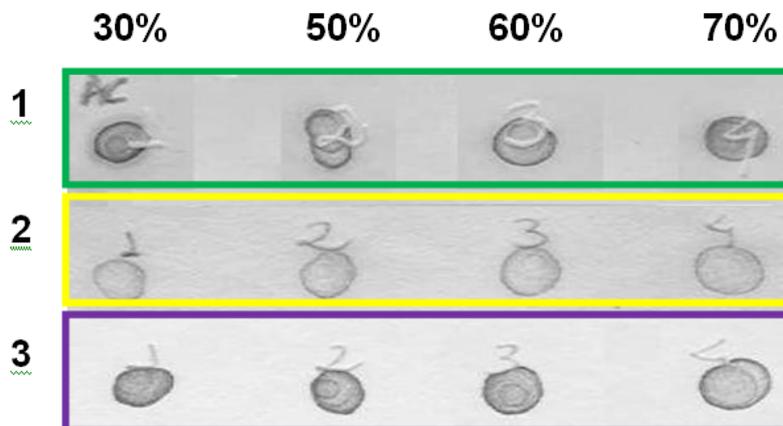


Figura 7 - Dot Blotting da proteína NcSRS2 precipitada com Acetona. Linha 1) Soro de Bovino; Linha 2) Soro de camundongo; Linha 3) Anti Histidina.

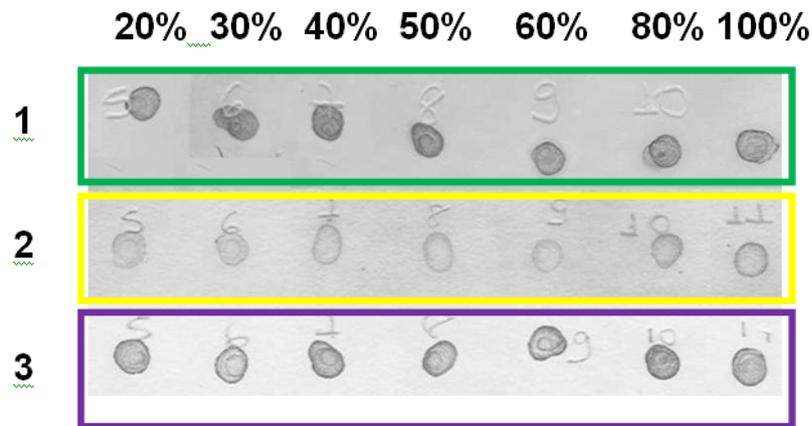


Figura 8 - Dot Blotting da proteína NcSRS2 precipitada com Álcool Etílico. Linha 1) Soro de Bovino; Linha 2) Soro de camundongo; Linha 3) Anti Histidina.

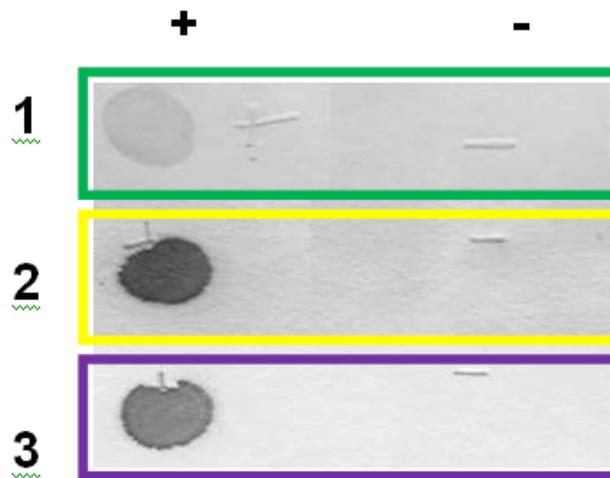


Figura 9 - Controle positivo e controle negativo: proteína NcSRS2 produzida em *Escherichia coli* e sobrenadante da cultura de *P. pastoris* cepa X33 não transformada respectivamente. Linha 1) Soro de Bovino; Linha 2) Soro de camundongo; Linha 3) Anti Histidina.

### 5.5 Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford

As proteínas precipitadas foram liofilizadas e ressuspensas para a quantificação pelo Método de Bradford. Os resultados obtidos durante o preparo de uma curva padrão para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina foram:

- Concentração da proteína obtida com Sulfato de Amônio:  $0,718\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;
- Concentração da proteína obtida com Acetona:  $0,592\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;

c) Concentração da proteína obtida com Álcool Etílico: 0,484 $\mu$ g/ $\mu$ l.

A expressão da proteína recombinante NcSRS2, foi confirmada através de *Western blot* utilizando soro bovino positivo para *N. caninum*. As bandas se apresentaram na altura esperada de 30KDa. Porém, não foi reconhecida nenhuma banda significativa com a proteína recombinante expressa em *E. coli*. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 10.

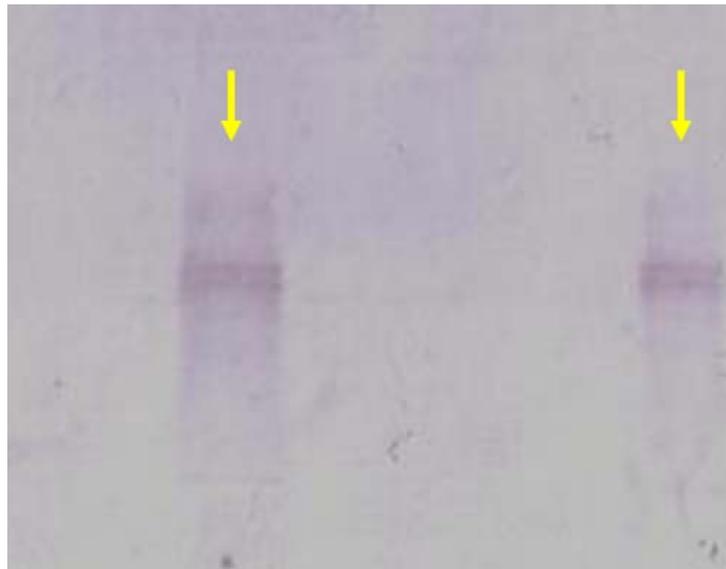


Figura 10 - Western blotting das proteínas NcSRS2/*Pichia* e NcSRS2/*E.coli* na mesma concentração, porém em quantidades diferentes. Em que a NcSRS2/*E.coli* reagiu muito fraco não aparecendo no teste.

## 5.6 ELISA

Na figura 11a observamos a distribuição da frequência das amostras positivas e negativas por IFI em bovinos. Baseado na análise ROC (Figura 11b), o ponto de corte de DO=0,42 para as amostras de bovinos foi escolhido como o limiar para distinguir entre amostras positivas e negativas, produzindo uma especificidade de 97,8% e uma sensibilidade de 100%. Utilizando este ponto de corte (DO  $\leq$  0,42), o valor negativo do teste preditivo foi de 100% (10% a 90% de prevalência) e o valor preditivo positivo variou de 83,4% para 99,7%, dependendo da prevalência da doença em uma determinada área. Nos ovinos o ponto de corte estabelecido pela análise ROC foi de DO=0,27 (Figura 12b), apresentando especificidade e

sensibilidade de 95,2% e 100% respectivamente. O valor preditivo negativo foi de 100% (10% a 90% de prevalência) e o valor preditivo positivo variou de 69,8% para 99,4% (Figura 12a).

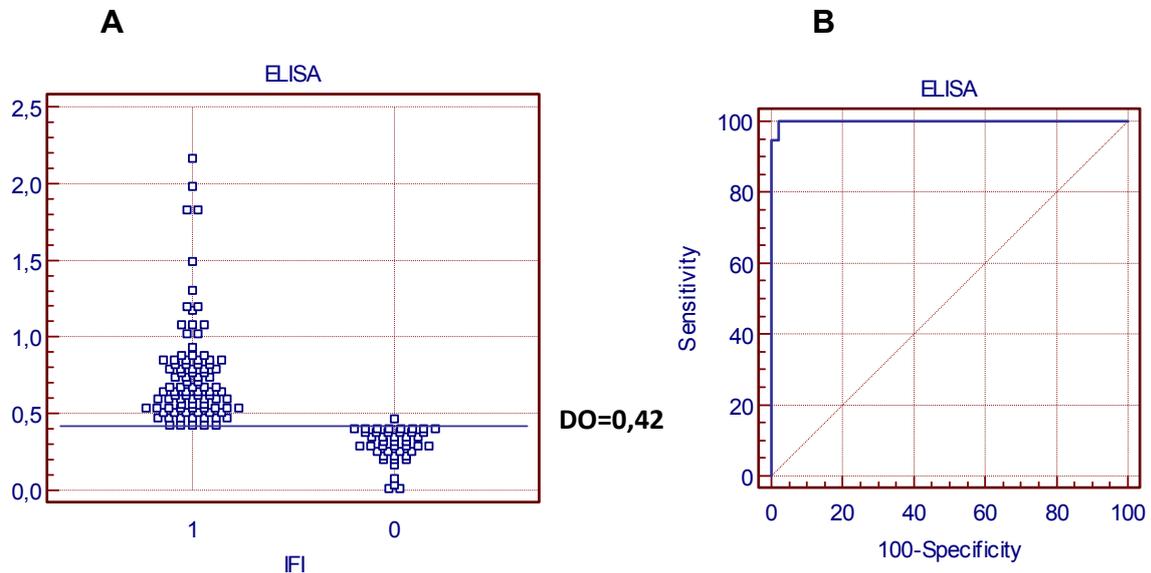


Figura 11 - Soros Bovinos: A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) do ELISA-NcSRS2 94 soros positivos de bovinos e 45 negativos confirmados por IFI. (A) Distribuição das frequências dos resultados positivos confirmados (1), com resultados negativos dos soros (0). As amostras foram consideradas positivas quando o valor de cut-off foi maior ou igual a 0,42DO para bovinos dos valores médios do ELISA. (B) gráfico ROC. Área sob a curva = 0,999 (0,003), intervalo de confiança 95% entre 0,971 a 1,000 para bovinos.

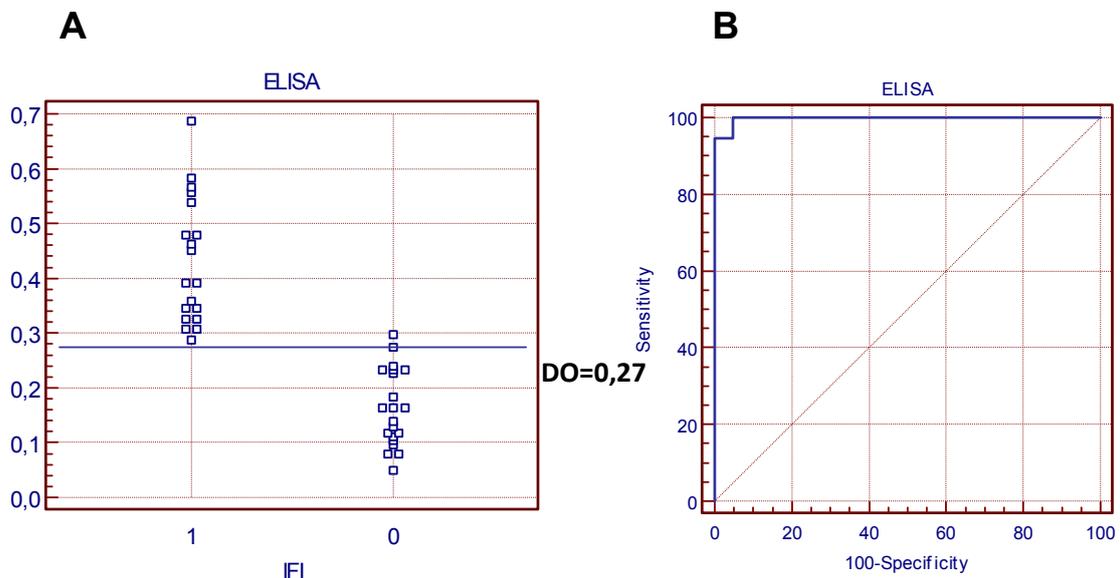
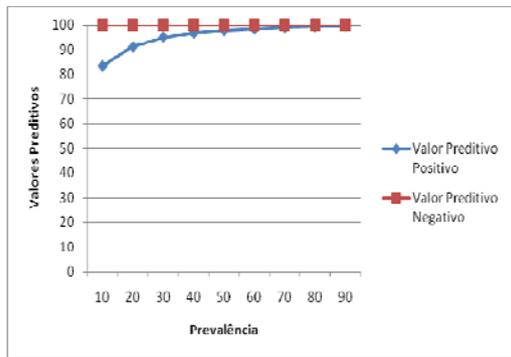


Figura 12 - Ovinos: A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) do ELISA-NcSRS2 19 soros positivos de ovinos e 21 negativos confirmados por IFI. (A) Distribuição das frequências dos resultados positivos confirmados (1), com resultados negativos dos soros (0). As amostras foram consideradas positivas quando o valor de cut-off foi maior ou igual a 0,27DO para ovinos dos valores médios do ELISA. (B) gráfico ROC. Área sob a curva = 0,997 (0,008), intervalo de confiança 95% entre 0,906 a 1,000 para ovinos.

A



B

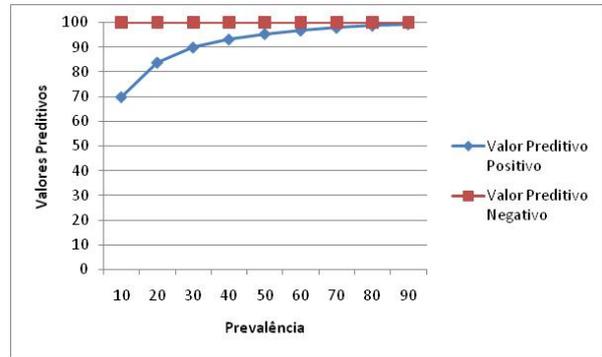


Figura 13 - Valores Preditivos Positivo e Negativo: Valores preditivos negativo (quadrados) e positivo (diamantes) associados com ELISA-NcSRS2 para diferentes níveis de prevalência da neosporose. Os valores foram determinados por análise de ROC com base em uma média de absorbância de 0,42 e 0,27 para bovinos (A) e ovinos (B) respectivamente, para os valores médios do ELISA.

## 6 Discussão

Atualmente há uma necessidade de um teste diagnóstico padronizado para a detecção de *N. caninum* principalmente em bovinos. Vários métodos sorológicos têm sido desenvolvidos, incluindo o teste padrão IFI (DUBEY et al., 1988) e vários formatos de ELISA empregando taquizoítos inteiros ou proteínas recombinantes de *N. caninum* (AHN et al., 2003; DUBEY & SCHARES, 2006; GATURAGA et al., 2005; GHALMI et al., 2009; HEMPHILL et al., 1999). Embora estes ensaios permitam a detecção de animais infectados, todos eles têm algum grau de limitação inerente à sua especificidade, sensibilidade e confiabilidade.

Um teste de diagnóstico sorológico baseado em antígenos de *N. caninum* para a detecção de anticorpos específicos contra *N. caninum* parece oferecer diversas vantagens sobre o uso de uma mistura de antígenos lisados, em termos de sensibilidade e especificidade (DUBEY & SCHARES, 2006).

A fim de aumentar a sensibilidade, kits comerciais de ELISA e IFI utilizam formulações com taquizoítos intactos, o que pode levar à diminuição da especificidade, com resultados falso-positivos devido à reação cruzada com outros coccídeos (HIGA et al., 2000). Também a presença de anticorpos contra *N. caninum* no soro fetal bovino utilizado nas culturas de células para preparação de antígenos podem levar a resultados falso-positivos (Dubey & Schares, 2006). A utilização de um único antígeno, especialmente se recombinante, poderia aumentar a especificidade, e desta maneira desenvolver um teste diagnóstico utilizando um antígeno com maior potencial. O antígeno imunodominante NcSRS2 é reconhecido por soros de animais infectados por *N. caninum* e é identificado em diferentes isolados de *N. caninum* (HOWE, 1998). Em outros trabalhos (GATURAGA et al., 2005; LIU et al., 2007), a proteína recombinante NcSRS2 foi utilizada para o desenvolvimento de testes de ELISA para diagnóstico da infecção por *N. caninum*. Na maioria destes, a proteína foi expressa em sistemas procariotos (LIU et al., 2007). Testes ELISA utilizando baculovírus como sistema de expressão da proteína

NcSRS2 também foi testado para sorodiagnóstico da neosporose (NISHIKAWA et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2002). Neste trabalho, nós demonstramos, pela primeira vez, a expressão com êxito da proteína NcSRS2 na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, mostrando que as propriedades antigênicas da proteína nativa NcSRS2 são conservadas na proteína recombinante. Esse sistema de expressão confere varias vantagens como: a capacidade de promover modificações pós-traducionais como formação de pontes dissulfeto, -O e -N glicosilação além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, além de permitir a produção de proteína recombinante em escala industrial (CEREGHINO; CREGG, 1999).

Quando expressamos a proteína NcSRS2 em fermentador obtivemos um rendimento de ~ 100 mg / L após concentração com 70% de sulfato de amônio. Este procedimento nos permitiu avaliar a aplicabilidade de uma forma mais simples de purificação a baixo custo, como a precipitação com sulfato de amônio e dessalinização por diálise (HEBERT et al. 1973).

Embora a infecção por *N. caninum* ser diagnosticada pela IFI, o teste é complexo e subjetivo, o que limita seu uso em investigações de grande escala. A disponibilidade de um ELISA a baixo custo para detecção de anticorpos específicos contra *Neospora*, que é facilmente implementável em vários laboratórios seria importante para a indústria pecuária.

O ELISA NcSRS2 desenvolvido no presente trabalho foi aplicado para o diagnóstico de neosporose em bovinos e ovinos. Os resultados de especificidade e sensibilidade foram satisfatórios, de 97,8% e 100% para bovinos respectivamente, e de 95,2% e 100%, para ovinos, respectivamente. Os resultados do ELISA foram comparados com os resultados da IFI realizada com os mesmos soros.

A taxa de prevalência de *N. caninum* em bovinos tem sido relatada como variando de 10 a 60% em diferentes países (DUBEY et al., 2007), e de 6% a 58% no Brasil (GONDIM et al., 1999; MUNHOZ et al., 2006; OSHIRO et al., 2007). Levando em conta essa taxa de prevalência o ELISA-NcSRS2 apresentou 97,8% de especificidade e a sensibilidade foi de 100%, o ponto de corte foi de 0,42, com valores preditivos positivos e negativos de 91% e 100%, respectivamente, em uma taxa de 20% do nível de prevalência na população de bovinos.

No Brasil há poucos levantamentos sorológicos de neosporose em ovinos. No estado do Paraná foi observado 9,5% de animais soro reagentes (ROMANELLI et al., 2007), no Distrito Federal, a prevalência é de 8,81% de animais reativos (UENO et al., 2005). Considerando uma taxa de 10% do nível de prevalência na população ovina, o ELISA-NcSRS2 apresentou como valores preditivos positivos e negativos 69,8% e 100% respectivamente. A especificidade e a sensibilidade foram respectivamente de 95,2% e 100% com ponto de corte de 0,27DO. Esta soroprevalência média é considerada como um possível risco e esta associada com o aumento das perdas reprodutivas (BARTELS et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado que vacas soropositivas cronicamente infectadas têm um risco de aborto de duas a três vezes maior que as soronegativas (PARE *et al.*, 1997; PFEIFFER *et al.*, 2002; THURMOND & HIETALA, 1997; WOUDA *et al.*, 1998). A detecção de animais infectados (ou seja, animais jovens, animais de reposição ou touros) é essencial não apenas para isolá-los dos rebanhos e evitar a introdução de novas portadoras (HALL et al. 2005), mas também para excluir fêmeas infectadas do procedimento de transferência de embriões (BAILLARGEON al., 2001; LANDMANN et al., 2002).

## 7 Conclusões

- Neste estudo relata-se que a levedura metilotrófica *P. pastoris* foi um conveniente sistema heterólogo para a expressão pela primeira vez da proteína NcSRS2 de *N. caninum* na forma secretada.
- A proteína NcSRS2 recombinante apresenta as características antigênicas da proteína nativa o que permite o seu reconhecimento por soros de diferentes espécies de animais com neosporose, através do ELISA-NcSRS2. O mesmo apresenta resultados satisfatórios de sensibilidade e especificidade.

Futuros estudos ainda serão necessários para otimizar a expressão desta proteína e suas formas de purificação.

### Referências Bibliográficas

AHN HJ, KIM S, KIM DY, & NAM HW. 2003. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean J Parasitol* 41, 175-177.

ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO, A.G., CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, n. 2, p. 417-431, 2000.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.L.; SOCCOL, V.T.; PAIVA, F. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. Campo Grande: Embrapa, (Documentos 136), 2003. 51p.

BAILLARGEON P, FECTEAU G, PARE J. 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. *JAVMA*, 2001; 218:1803-1806.

BARBER, J.S. Trees AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J.Parasitol.* 28: 57-64, 1998.

BARR, B. C., P. A. CONRAD, R. BREITMEYER, K. SVERLOW, M. L. ANDERSON, J. REYNOLDS, A. E. CHAUVET, J. P. DUBEY, and A. A. ARDANS. 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202:113-117.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation*, v.71, p. 236-242, 1994.

BARTELS, C. J. M.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, New York, v. 52, n. 2, p. 247-257, 1999.

BARTELS CJ, VAN MC, VAN DER MEULEN AM, DIJKSTRA T, & WOUDA W. 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet Parasitol* 131, 235-246.

BASSO, W., VENTURINI, L., VENTURINI, M.C., MOORE, D.P., RAMBEAU, M., UNZAGA, J.M., CAMPERO, C., BACIGALUPE, D., DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 4, p. 906-907, 2001.

- BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; KIENAST, M.; UNZAGA, J. M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, Netherlands. V.131, n.3/4, p.299-303, 2005.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. *Acta Vet. Scand.*, v.35, p.445-447, 1994.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.29, p.1497-1507, 1999.
- BOETTNER M., PRINZ B., HOLZ C., STAHL U., LANG C. 2002. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris* *J. Biotechnol.* 99: 51–62.
- BRADFORD, M. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254, 1976.
- CAMPERO C.M., MOORE D.P., ODEON A.C., CIPOLLA A.L. & ODRIUZOLA E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.* 27:359-369.
- CANADA N, MEIRELES CS, FERREIRA P. Artificial insemination of cows with semen *in vitro* contaminated with *Neospora caninum* tachzoites failed to induce neosporosis. *Vet Parasitol*, 2006; 129:32-40.
- CÂNON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 123, n. 3-4 , p. 275 – 277, 2004.
- CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, p. 422-427, 1999.
- CEREGHINO, G.P.L.; CREGG, J.M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 422-427.
- CHOI D.B., PARK, E.Y. Enhanced production of mouse  $\alpha$ -amilase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* - In press- 2005.
- COLE R.A., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., SORJONEN D.C., DUBEY J.P. 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Journal of Parasitology*, 81, 208.211.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M. L.; ROWE, I. D.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. A.; DUBEY, J. P.; DUHAMIEL, G.; BARR, B. C. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.5, n.4, p.572-578, 1993.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M.M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*. Santa Maria. v.30 n.5 p.863-868, 2000.

CORBELLINI, L. G. Infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros no estado do Rio Grande do Sul: diagnóstico, avaliação sorológica e aspectos epidemiológicos, 81 p., Porto Alegre. 2001.

CORBELLINI, L.G.; SMITH, D.R.; PESCADOR, C.A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 74, n. 2-3, p. 130-141, 2006.

COS, O., SERRANO, A., MONTESINOS, J.L., FERRER, P., CREEG, J.M., VALERO, F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *P. pastoris* fed-batch culture *Journal of Biotechnology*, 116: 321 – 335, 2005.

COSTA, G.H.N. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.22, p.57-62, 2001.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F.: Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 38: 157-159, 2008.

CUNHA FILHO, N.C.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; RAGOZO, A.M.; GENNARI, S.M.; JUNIOR, T.L.; FARIAS, N.A.R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 17, n1. p.301-306, 2008.

DAMASCENO, L. M. Produção de estreptavidina em *Pichia pastoris* e sua imobilização em sílica biotinizada. Dissertação. Viçosa, UFV, 2001.

DAVISON, H. C.; GUY, F.A.; TREES, J.; RYCE, C.; ELLIS, J. T.; OTTER, A. JEFFREY, M. SIMPSON, V. R.; HOLT, J. J. In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the United Kingdom. *Research in Veterinary Science*, v. 6, p. 7103–105, 1999.

DIJKSTRA T.H., BARKEMA H.W., BJORKMAN C. & WOUDA W. 2002. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd with out an obvious increased incidence of abortions. *Vet. Parasitol.* 109:203-211.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in goats. *Agri-practice*, v. 8, n. 3, p. 43-52, 1987.

- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.
- DUBEY JP: 1989, Congenital neosporosis in a calf. *Vet Rec* 125: 486.
- DUBEY JP, KOESTNER A, PIPER RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 197: 857-860, 1990.
- DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v.76, n.5, p.732-734, 1990.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v.67, n.1, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v.84, p.349-367, 1999.
- DUBEY J.P. (2001). Neosporosis in cattle. III Congresso Iberico de Reprodução Animal, proceedings. 73-78. Porto. Portugal.
- DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *International Journal Parasitology*, v. 32, p. 929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Veterinary Parasitology*, v.67, n.1, p. 1-59, 2003.
- DUBEY, J.P., KNICKMAN, E., GREENE, C.E., 2005. Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. *Acta Parasitol.* 50, 176–179.
- DUBEY JP & SCHARES G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 140, 1-34.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, n.2, p.323-367, 2007.
- FARIAS, N. A. R. Neosporose - Uma Enfermidade a ser estudada. Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Parasitologia - Pelotas/RS, 2001.
- FURUTA, P. I.; MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; GODOY, G. S.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z.: *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology* 134: 1931-1939, 2007.
- GATURAGA I, CHAHAN B, XUAN X, HUANG X, LIAO M, FUKUMOTO S, HIRATA H, NISHIKAWA Y, TAKASHIMA Y, SUZUKI H, FUJISAKI K, & SUGIMOTO C. 2005. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with truncated NcSRS2 expressed in *Escherichia coli*. *J Parasitol* 91, 191-192.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 54, p. 741-750, 2000.

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, supl. 1, p.21-28, 2004.

GEORGIEVA D. A., PRELEZOV, P. N., KOINARSKI, V. T. 2006. *Neospora caninum* and neosporosis in animals – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. Stara Zagora, Bulgaria. 9:1-26.

GHALMI F, CHINA B, KAIDI R, & LOSSON B. 2009. Evaluation of a SRS2 sandwich commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine and canine sera. *J Vet Diagn Invest* 21, 108-111.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 86, n. 1, p. 71-75, 1999.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M. MEYER, R. McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Veterinary Parasitology*, v.101, n.1, p.1-7, 2001.

GONDIM, L.F.P., GAO, L., McALLISTER, M.M., 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.* 88, 1159–1163.

GONDIM LF, McALLISTER MM, PITT WC, ZEMLLICKA DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34: 159-161, 2004.

GONDIM L. F. P.; PINHEIRO A. M., ALMEIDA M. A. O. Frequência de anticorpos anti-*Neospora* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde Produção Animal*, Salvador, v. 8, n. 2, p. 92 96, 2007.

GOTTSTEIN, B., HENTRICH, B., WYSS, R., THÜR, B., BUSATO, A., STÄRK, K.D., MÜLLER, N., 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 4, 679–691.

GUIMARÃES, J. S.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASCHI, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of north of Parana state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.124, n.1-2, p. 1-8, 2004.

HALL CA, REICHEL MP, & ELLIS JT. 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol* 128, 231-241.

HASEGAWA, M.Y. Soroprevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em bovinos de corte e em cães rurais da região de Avaré – SP. 2000. 50f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2000.

- HÄSLER, B.; REGULA, G.; STÄRK, K. D.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, v.77, n.3-4, p. 230-253, 2006.
- HEMPHILL, A. & GOTTSTEIN, B. (1996). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol Res* 82, 497-504.
- HEMPHILL, A.; FELLEISEN, R.; CONNOLLY, B.; GOTTSTEIN, B.; HENTRISH, B.; MULLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology* 115 p.581-590, 1997.
- HEMPHILL, A., GAJENDRAN, N., SONDA, S., Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, v.28, p.429-438, 1998.
- HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.1175-1188, 1999.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. (2006) *Neospora caninum* and neosporosis — recent achievements in host and parasite cell biology and treatment. *Acta Parasitologica* 51:1, 15-25 Online publication date: 1-Mar-2006.
- HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and Milk production in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 219, p. 632-635, 2001.
- HIGA Ac, MACHADO Rz, TINUCCI-COSTA M, DOMINGUES Lm, & MALHEIROS Eb. 2000. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. *Rev Bras Parasitol Vet* 9, 91-95.
- HOWE DK & SIBLEY LD. 1999. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 29, 1489-1496.
- HUONG, L.T.T.; LJUNGSTROM, B.L.; UGGLA, A. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Vet. Parasitol.*, v.75, Amsterdam, p.53-57, 1998.
- INNES, E.A., PANTON, W.R., MARKS, J., TREES, A.J., HOLMDAHL, J. & BUXTON, D. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology* 113, 95-100.
- INNES, E.A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, v.18, p.497- 504, 2002.
- INNES, E. A. et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 108, n. 1-2, p. 29-36, 2005.
- JENKINS M.C., FETTERER R., SCHARES G., BJOERKMAN C., WAPENAAR W., McALLISTER M., DUBEY J.P. 2005. HPLC purification of recombinant NcGRA6

antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 131, 227–234.

KAUFMANN, H., M. YAMAGE, I. RODITI, D. DOBBELAERE, J. P. DUBEY, O. J. M. HOLMDAHL, A. Trees, and B. Gottstein. 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridisation and PCR. *Mol. Cell. Probes* 10:289–297.

LALLY, N.C., JENKINS M.C. and DUBEY J.P. 1996. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3, 275-9.

LANDMANN JK, JILLELLA D, O'DONOGHUE PJ, & MCGOWAN MR. 2002. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust Vet J* 80, 502-503.

LA-PERLE, K. M.; DEL-PIERO, F.; CARR, R. F.; HARRIS, C.; STROMBERG, P. C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. *Journal of veterinary diagnostic investigation official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* v13, p. 252-5, 2001.

LARSON, R.L.; HARDIN, D.K.; PIERCE, V.L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.224,n.10, p.1597-1604. 2004.

LINDSAY, D. S., J. P. DUBEY, and R. B. DUNCAM Jr.. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82:327–333.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Canine neosporosis. *J. Vet. Parasitol.*, v.14, p.1-11, 2000.

LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology*. V.87, n.4, p. 909-911, 2002.

LIU J, YU J, WANG M, LIU Q, ZHANG W, DENG C, & DING J.2007. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle using a recombinant tNcSRS2 protein-based ELISA. *Vet Parasitol* 143, 358-363.

LOBATO, J. 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R., RICHARTZ, R.R.T.B., GASINO-JOINEAU, M.E., PINCKNEY, R.D., SOUSA, R.S., LEITE, L.C., THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. *Veterinary Record*, v.153, n. 20, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J. R.; RICHARTZ, G. M. E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R. D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D. C. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and precolostral foals from Paraná State, Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.135, n.3/4, p.215-221, feb. 2006.

LUCAS, A.S. *Neospora caninum* em bovinos da bacia leiteira de Pelotas, RS: soroprevalência e associação com fatores de risco. 2007. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MARSH, E.A.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species. *Journal of Parasitology*, v.84, p. 983-991, 1998.

MASUDA, T.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; OMATA, Y. Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 *scid* mice. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.149, n 1-2, p. 130-133, 2007.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Internacional Journal for Parasitology*, v.28, n.9, p.1473-78, 1998.

McALLISTER M.M., BJORKMAN C., ANDERSON-SPRECHER R., ROGERS D.G. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217, 881–887.

McCANN, C. M. et al. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 6, p. 978-980, 2008.

MOEN, A. R.; WOUDA, W.; MUL, M. F.; GRAAT, E. A. M.; WERVEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*, v. 49, p.1301-1309, 1998.

MOORE, D.P., 2004. Neosporosis in South America. *Vet. Parasitol.* 127, 87–97.

MONTEIRO, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.; SOUZA, S.L.P.; FUNADA, M.R.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KEID, L.B.; SOARES, R.M. Molecular phylogenetic analysis in Hammondia-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. *Parasitology*, v. 134, p.1195–1203, 2007.

MORALES, E.; TRIGO, F. J.; IBARRA, F.; PUENTE, E.; SANTACRUZ, M. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v. 13, n. 5, p. 413-415, 2001.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W.: The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitology Research* 100: 633-636, 2007.

MUNHOZ, A. D. et al. Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em vacas, no rebanho leiteiro do município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro: dados

preliminares. In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais*. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROM.

MUNHOZ AD, FLAUSINO W, SILVA RT, ALMEIDA CR, & LOPES CW. 2006. Distribution of anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy cows at Municipalities of Resende and Rio Claro in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 15, 101-104.

NETA, A.V.C.; JÚNIOR, J.R.S.T. Neosporose: emergente causa de perdas reprodutivas em bovinos de corte. BeefPoint, Campinas, jul. 2006. Disponível em: <<http://beefpoint.com.br/?actA=7&areaID=60&secaoID=183&noticialID=30030>>.

NISHIKAWA Y, KOUSAKA Y, TRAGOOLUA K, XUAN X, MAKALA L, FUJISAKI K, MIKAMI T, & NAGASAWA H. 2001. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *J Clin Microbiol* 39, 3987-3991.

NISHIKAWA Y, CLAVERIA FG, FUJISAKI K, & NAGASAWA H. 2002. Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. *J Vet Med Sci* 64, 161-164.

NISHIKAWA, Y., INOUE, N., MAKALA, L. & NAGASAWA, H. 2003. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology* 116, 175-84.

NOHR, J., KRISTIANSEN K., KROGSDAM, A., M. Protein expression in yeasts. *Methods Molecular Biology*, 232: 111-25, 2003.

OOI, H.K., HUANG, C.C., YANG, C.H., LEE, S.H. serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Veterinary Parasitology*. 2000. 90: 47-55.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G.: Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology* 117: 301-308, 2003.

OSHIRO LM, MATOS MFC, OLIVEIRA JM, MONTEIRO LARC, & ANDREOTTI R. 2007. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Parasitol Vet* 16, 133-138.

OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; REGALBONO, F. DI; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary Parasitology*, v.118, n 1-2, p. 7-18, 2003.

PAPPEN, F.; CUNHA, N. A.; RUAS, J. L.; FARIAS, N. A. R. Relação entre a ocorrência de aborto e a soroprevalência de *Neospora caninum* em rebanho bovino leiteiro no sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2006. Pelotas. *Resumos*. UFPel, 2006. 1 CD-ROM.

PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, n.2, p.273-275, 1995.

PARÉ J, THURMOND MC, & HIETALA SK. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 83, 82-87.

PENA, H. F., GENNARI, S. M., DUBEY, J. P., SU, C. 2006. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*. Article in press 2007.

PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitology Research*, v. 86, n.1, p. 1-7, 2000.

PETERS, M. SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.1144-1148, 2001.

PFAFF, A. W.; VILLARD, O.; KLEIN, J. P.; MOUSLI, M.; CONDOLFI, E. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric production and polyamine biosynthesis. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 35, n. 14, p. 1569-1576, 2005.

PFEIFFER DU, WILLIAMSON NB, REICHEL MP, WICHTEL JJ, & TEAGUE WR. 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev Vet Med* 54, 11-24.

PITUCO, E. M.; SOARES, J. A. G.; OKUDA, L. H.; STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. *Arquivos Instituto Biológico*, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 70, 1998.

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.12, n.1, p.33-37, 2003.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Veterinary Parasitology*, v.142, n.1-2, p.23-34, 2006.

RITTER, D. M. et al. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *Journal of Parasitology*, v. 88, n. 2, p. 271-280, 2002.

RODRIGUES, A.A.R. et al. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.124, n.3-4, p.139-150, 2004.

RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; PAULA, V.S.O.; AGUIAR, D.M.; FUJII, T.U.; STARKE-BUZETI, W.; MACHADO, R.Z.; DUBEY, J.P. Serological responses to

*Neospora caninum* in experimentally and naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, v.129, n.1/2, p.21-24, 2005.

ROMAND S., THULLIEZ P. & DUBEY J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnose of *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 84:50-53.

ROMANELLI, P. R.; et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana' State, Brazil. *Research in Veterinary Science*, Curitiba, v. 82, p. 202–207, 2007.

SAMBROOK J & RUSSEL DW. 2001. *Molecular Cloning - A laboratory Manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor, New York.

SANCHEZ GF, MORALES SE, MARTINEZ MJ, TRIGO JF. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can J Vet Res* 67: 142-145, 2003.

SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M. Y.; CANAVESSI, A. M. O.; PINCKNEY, R. D. Ocorrência de anticorpos de *Neospora caninum* em vacas leiteiras avaliados pelos métodos ELISA e RIFI no município de Avaré, SP. *Semina*, Londrina, v. 24, n. 1, p. 3-10, 2003.

SARTOR, I. F.; FILHO, A. G.; VIANNA, L. C.; PITUCO, E. M.; DAL PAI, V.; SARTOR, R. Ocorrência de anticorpos Anti-*Neospora Caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.4, p. 413-418, 2005.

SCHARES, G.; RAUSER, M.; SÖNDGEN, P.; REHBERG, P.; BÄRWALD, A.; DUBEY, J. P.; EDELHOFER, R.; CONRATHS, F. J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 30, p. 1123-1130, 2000.

SHARMA, S., M.S. BAL, MEENAKSHI, K. KAUR, K.S. SANDHU and J.P. DUBEY (2008) Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs in India. *J. Parasitol.* 94(1), 303-304.

SHIVAPRASAD, H.L.; ELY, R.; DUBEY, J.P. *Neospora*- like protozoan found in na aborted bovine placenta. *Veterinary Parasitology*, v. 34, p. 145-148, 1989.

SON, E. S.; AHN, H. J.; KIM, J. H.; KIM, D. Y.; NAM, H. W. Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 39, n. 3, p. 241-246, 2001.

SOUZA, S.L.P. et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de São Paulo, Brasil. *Semina*, v.22, p.39-48, 2001.

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

- THURMOND MC & HIETALA SK.1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* 58, 1381-1385.
- TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento*, v. 12, p. 20-22, 2000.
- TRANAS, J. et al. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.
- TREES, A.J., WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, v.21, p.558-561, 2005.
- UENO, T. E. H. Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.
- VIANNA, M.C.B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Veterinary Parasitology*, v. 129, n. 3-4, p. 253 – 257, 2005.
- WILLIAMS, D.J.L., McGARRY J., GUY F., BARBER J. and TREES A.J. 1997. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*. 140, 328-331.
- WILLIAMS, D. J., C. S. GUY, J. W. McGARRY, F. GUY, L. TASKER, R. F. SMITH, K. MacEACHERN, P. J. CRIPPS, D. F. KELLY, and A. J. TREES. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: The time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121:347–358.
- WILLIAMS, D. J. L., and A. J. TREES. 2006. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetal infection in *Neospora caninum* infected cattle. *Parasite Immunol.* 28:61–67.
- WOUDA, W.; MOEN, A.R.; VISSER, I.J.R.; VAN KNAPPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different ge classes with regards to lesion severity and immunohistochemical identification in brain, heart and liver. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigations*, v. 9, p. 180-185, 1997.
- WOUDA W, MOEN AR, & SCHUKKEN YH.1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311-1316.
- WOUDA W, DIJKSTRA T, KRAMER AM, MAANEN C. Sero epidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninu* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol* 29:1677-1682, 1999.

ZHANG, H., et al. *Neospora caninum*: Application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* (2010).

## **ANEXOS**

## MATERIAIS UTILIZADOS

### 1) Microorganismos utilizados:

#### 1.1) Bactérias:

*Escherichia coli* linhagem TOP 10 (Invitrogen)

#### 1.2) Leveduras:

*Pichia pastoris* linhagem X33 (Invitrogen)

### 2) Enzimas:

T4 DNA Ligase (New England Biolabs), RNase A, Taq DNA Polimerase (Invitrogen), Eco RI (Invitrogen), XbaI (Invitrogen), PME1 (New England Biolabs)

### 3) Marcadores:

#### 3.1) Marcadores de DNA:

1 Kb *Ladder* Promega

#### 3.2) Marcadores de Proteína:

*Bench Marker* (Invitrogen)

### 4) Vetores;

**Vetor para clonagem de *P.pastoris***

pPICZ $\alpha$ B (Invitrogen)

### 5) Meios de culturas e soluções:

Os meios e soluções foram preparados com água destiladas e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C. Algumas soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração. Quando necessário foram adicionados os devidos antibióticos nas concentrações: 50ug/ml zeocina para bactérias e 100ug/ml zeocina para leveduras.

#### 5.1) Meios para bactérias:

##### ✓ Meio LB (Luria Bertani)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)
pH ajustado para 7,2	

✓ **Meio LB-Ágar**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico 1,5% (p/v)

**5.2) Meios para leveduras:**

✓ **Meio YPD**

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

✓ **Meio YPD-Ágar**

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico 2% (p/v)

✓ **Meio MM (Meio mínimo)**

YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4X10<sup>-5</sup>%

Metanol 0,5%

✓ **Meio BMGY (Meio complexo tamponado com glicerol)**

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Tampão fosfato pH 6 100mM

YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4X10<sup>-5</sup>%

Glicerol 1%

✓ **Meio BMMY (Meio complexo tamponado com metanol)**

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Tampão fosfato pH 6 100mM

YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4X10<sup>-5</sup>%

Metanol 0,5%

**6) Soluções**

✓ **Extração de DNA plasmidial**

**Solução I**

Tris-HCl pH 8,0 25mM

EDTA 10mM

Glicose 50mM

**Solução II**

NaOH	0,2M
SDS	1% (p/v)
<b><u>Solução III</u></b>	
Acetato de sódio	3M
Ácido acético	2M
pH ajustado para 5,0	
✓ <b>Análise de DNA em gel de agarose</b>	
<b>Tampão Tris-acetato EDTA 10X</b>	
Tris-acetato	40mM
EDTA	1mM
pH ajustado para 8,0	
Análise de proteína em gel de poliacrilamida	
✓ <b>Tampão de corrida Tris-glicina 5X</b>	
Trizma base	125mM
Glicina	0,96M
SDS	0,5% (p/v)
✓ <b>Gel concentrador 5% (2ml)</b>	
Água destilada	1,4ml
Acrilamida 30%	330ul
Tris 1.0M pH 6,8	250ul
SDS 10%	20ul
Persulfato de amônio 10%	20ul
TEMED	2ul
✓ <b>Gel separador 12%</b>	
Água destilada	3,3ml
Acrilamida 30%	4ml
Tris 1.0M pH 8,8	2,5ml
SDS 10%	100ul
Persulfato de amônio 10%	100ul
TEMED	4ul
✓ <b>Solução corante</b>	
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

✓ <b>Solução descorante</b>	
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)
✓ <b>TE</b>	
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1mM
✓ <b>Solução para quantificação de proteína</b>	
<b>Reagente de BRADFORD</b>	
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,05% (p/v)
Etanol	25% (v/v)
Ácido fosfórico 17M	50% (v/v)
✓ <b>Solução de lavagem PBS-T 10X</b>	
NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g
Tween-20	2ml
Água qsp 1000ml	
pH ajustado para 7,2.	