

Situação atual das estratégias para desenvolvimento de antígenos para o controle da neosporose em bovinos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 229

Situação atual das estratégias para desenvolvimento de antígenos para o controle da neosporose em bovinos

Renato Andreotti
Renan Eugênio Araújo Piraine
Alceu Gonçalves dos Santos Junior
Rodrigo Casquero Cunha
Vitória Sequeira Gonçalves
Francisco Denis Souza Santos
Fábio Pereira Leivas Leite

Embrapa
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS, 79106-550

Fone: (67) 3368 2000

Fax: (67) 3368 2150

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Alexandre Romeiro de Araújo, André Dominghetti Ferreira, Andréa Alves do Egito, Kadijah Suleiman Jaghub, Liana Jank, Lucimara Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Rodney de Arruda Mauro, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Imagens da capa: *Josimar Lima*

1ª edição

Versão online (2017)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Gado de Corte.**

Situação atual das estratégias para desenvolvimento de antígenos para o controle da neosporose em bovinos [recurso eletrônico] / Renato Andreotti... [et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2017.

48 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 229).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC229.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 7 de agosto de 2017).

Outros autores: Renan Eugênio Araújo Piraine; Renan Eugênio Araújo Piraine; Alceu Gonçalves dos Santos Junior; Rodrigo Casquero Cunha; Vitória Sequeira Gonçalves; Francisco Denis Souza Santos; Fábio Pereira Leivas Leite.

1. *Neospora caninum*. 2. Neosporose. I. Andreotti, Renato. II. Piraine, Renan Eugênio Araújo. III. Santos Jr, Alceu Gonçalves dos. IV. Cunha, Rodrigo Casquero. V. Gonçalves, Vitória Sequeira. VI. Santos, Francisco Denis Souza. VII. Leite, Fábio Pereira Leivas.

591.2 (21. ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2017

Autores

Renato Andreotti

Médico-Veterinário, Doutor em Biologia Molecular, Pós-doutorado na ARS/USDA, Kerrville, Texas nos Estados Unidos, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Renan Eugênio Araújo Piraine

Biotecnologista, Mestre em Biotecnologia, Doutorando em Biotecnologia na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Alceu Gonçalves dos Santos Junior

Médico-Veterinário, Doutor em Veterinária Preventiva pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Rodrigo Casquero Cunha

Médico-Veterinário, Doutor em Ciência Animal, Bolsista Pós-Doc PNP/DCAPES na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Vitória Sequeira Gonçalves

Biotecnologista, Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Francisco Denis Souza Santos

Médico-Veterinário, Mestre em Ciências Veterinárias, Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Fábio Pereira Leivas Leite

Médico-Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Pós-doutorado na University of Idaho, Professor Associado 2 na Graduação e Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Discussão analítica	12
Mecanismos de invasão de <i>N. caninum</i>	12
Proteínas de superfície (SAGs)	15
Proteínas dos Micronemas (MICS)	16
Antígenos dos Grânulos Densos (GRAs)	17
Proteínas das Róptrias (ROPs).....	17
<i>Neospora caninum</i> e Imunidade.....	19
Medidas de controle baseadas em vacinação	22
Vacinas vivas	24
Vacinas utilizando vetores biológicos	26
Vacinas de DNA	27
Vacinas de subunidades recombinantes	28
Vacinologia reversa	30
Considerações finais	32
Referências	36

Situação atual das estratégias para desenvolvimento de antígenos para o controle da neosporose em bovinos

Renato Andreotti

Renan Eugênio Araújo Piraine

Alceu Gonçalves dos Santos Junior

Rodrigo Casquero Cunha

Vitória Sequeira Gonçalves

Francisco Denis Souza Santos

Fábio Pereira Leivas Leite

Resumo

Neospora caninum, parasito causador da neosporose, é conhecido mundialmente como um dos principais responsáveis por abortos em rebanhos bovinos, causando prejuízos econômicos à pecuária. As infecções e transmissões do parasito entre os animais são de difícil combate, assim, métodos de diagnóstico e controle devem ser aplicados para reduzir a disseminação do patógeno nas propriedades. A vacinação de rebanhos seria uma alternativa para o controle, contudo, a falta de uma vacina segura e eficaz impede a aplicação deste método de controle. O parasito possui importantes proteínas estruturais que auxiliam no processo de infecção como proteínas de superfície, proteínas dos micronemas, antígenos dos grânulos densos e proteínas das rôptrias. Antígenos dessas organelas e da superfície do parasito estão sendo atualmente estudados como imunógenos, aplicados isolados ou em associações, com o objetivo de avaliar a resposta imunológica induzida em modelos animais. No estudo de vacinas experimentais, diferentes abordagens são utilizadas nas formulações, como vacinas vivas, vacinas de DNA, vacinas utilizando vetores biológicos e vacinas de subunidades recombinantes, geralmente desenvolvidas com o auxílio da vacinologia reversa. O contraste observado nos níveis de citocinas e taxas de proteção da transmissão vertical em animais de laboratório vacinados e, posteriormente, desafiados com *N. caninum*, revela a complexidade em torno de seus mecanismos de

invasão e que muito mais deve ser estudado na busca de uma vacina eficaz com capacidade de proteger a bovinocultura. Dessa forma, o objetivo desta revisão é abordar os alvos vacinais e estratégias experimentais empregadas atualmente no controle da infecção por *N. caninum*.

Palavras-chave: neosporose, antígenos, imunógenos, vacinas, perspectivas

Abstract

*Neospora caninum, a parasite that causes neosporosis, is known worldwide as one of the main responsible for abortions in cattle herds, causing economic losses to livestock. Infections and transmissions of the parasite between the animals are difficult to combat, so methods of diagnosis and control should be applied to reduce the spread of the pathogen on the properties. Vaccination of herds would be an alternative to control, however, the lack of a safe and effective vaccine prevents the application of this control method. The parasite has important structural proteins that assist in the infection process such as surface proteins, microneme proteins, dense-granules proteins and rhoptries proteins. Antigens of these organelles and the surface of the parasite are currently being studied as immunogens, applied alone or in associations, with the objective of evaluating the immune response induced in animal models. In the study of experimental vaccines, different approaches are used in formulations, such as live vaccines, DNA vaccines, vaccines using biological vectors and recombinant subunit vaccines, generally developed with the aid of reverse vaccinology. The observed contrast in cytokine levels and protection rates of vertical transmission in laboratory animals vaccinated and subsequently challenged with *N. caninum* reveals the complexity surrounding their invasion mechanisms and that much more must be studied in the search for a Vaccine capable of protecting bovine animals. Thus, the objective of this review is to address the vaccine targets and experimental strategies currently employed in the control of *N. caninum* infection.*

Keywords: Neosporosis, antigens, immunogens, vaccines, look out.

Introdução

Neospora caninum, agente causador da neosporose, é um protozoário intracelular pertencente ao filo Apicomplexa, identificado inicialmente em doenças neuromusculares em cães (BJERKAS et al., 1984) e, posteriormente, descrito por Dubey et al. (1988). É reconhecido mundialmente como um dos principais causadores de abortos em bovinos (DUBEY et al., 2006), sendo responsável por perdas econômicas globais em torno de US\$ 2 bilhões/ano na indústria leiteira e de gado de corte (REICHEL et al., 2013).

Além dos custos com a perda de animais no rebanho, são relatados prejuízos econômicos com a diminuição da produção de leite (HERNANDEZ et al., 2001) e menor ganho de peso após o desmame (BARLING et al., 2001). A neosporose está amplamente distribuída, com relatos de casos em países como Argentina, Austrália, Brasil, Espanha, Estados Unidos, Nova Zelândia, entre outros países produtores de bovinos (REICHEL et al., 2013).

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo, contando com mais de 209 milhões de cabeças, o que o torna um dos maiores produtores de leite e carne bovina (IBGE, 2011). Estima-se que, no país, as perdas relacionadas à neosporose na indústria leiteira atinjam em torno de US\$ 50 milhões/ano enquanto que, na produção de carne, este valor pode chegar até US\$ 100 milhões/ano (REICHEL et al., 2013).

Barros et al. (2011) avaliou as perdas resultantes da neosporose criando cenários com o software *Gerenpec Embrapa Beef Cattle* para sistemas de produção com diferentes níveis tecnológicos e comparando-os com um sistema livre da doença, destacando como resultado a possibilidade de perdas econômicas de até 34% no intervalo de 10 anos em propriedades que apresentam nos seus rebanhos animais soropositivos.

O parasito, em seu ciclo biológico, possui como hospedeiros definitivos o cão (*Canis familiaris*) (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2006) e o coioote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004) e como hospedeiros intermediários, principalmente, ovinos, equinos, cervídeos, caninos, bubalinos e bovinos (DUBEY; SCHARES, 2011).

Em humanos, já foi evidenciada a soropositividade e possibilidade de infecção em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência (HIV) e pacientes com desordens neurológicas, revelando o parasito como um patógeno oportunista e demonstrando o potencial zoonótico em indivíduos imunocomprometidos (LOBATO et al., 2006).

Nos caninos, ocorrem as fases sexuadas e assexuadas do ciclo de vida de *N. caninum* (DUBEY et al., 2002). Sendo hospedeiros definitivos, os cães infectam-se por ingerir cistos teciduais, liberando em suas fezes oocistos não esporulados no ambiente, os quais esporulam para dois esporocistos (figura 1).

Infecção aguda

Infecção persistente

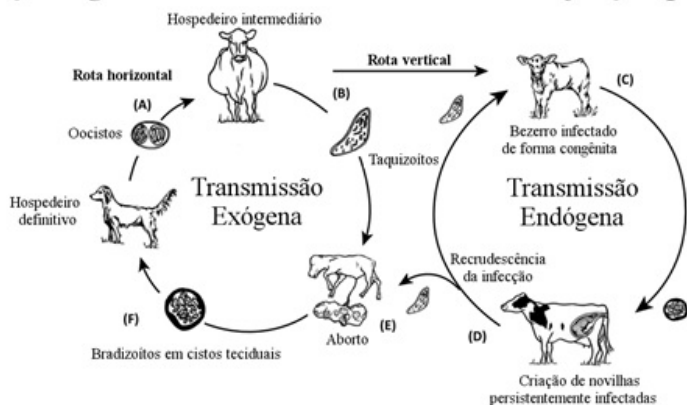


Figura 1. Ciclo de vida heterógeno de *N. caninum*. A) No hospedeiro intermediário (ex: bovinos, ovinos, equinos...), a infecção pode ocorrer horizontalmente, por meio da ingestão de comida ou água contaminadas com oocistos, liberados anteriormente por canídeos (ex: cães e coiotes) infectados pelo parasito. Ou B) verticalmente, da mãe para o feto, através da placenta. Esse tipo de transmissão pode ocorrer de forma exógena, quando há a ingestão de oocistos durante a gestação, ou de forma endógena, quando ocorre a recrudescência da infecção persistente. Células altamente infectadas rompem-se, liberando taquizoítos, os quais se multiplicam de forma intracelular protegidos pelo vacúolo parasitóforo, gerando uma parasitemia aguda que atinge diversos tecidos, como nervoso, linfático e vascular. C) após a rápida proliferação do parasito, há a diferenciação em bradizoítos, resultando em uma infecção de longa duração na forma de cistos teciduais. D) Durante a gestação, modificações no balanço da resposta imune estimulam a reativação em taquizoítos, podendo acarretar na transmissão transplacentária para o feto. E) a transmissão vertical pode ocorrer com a recrudescência de infecções persistentes, impactando em gestações consecutivas que resultarão em abortos (principal manifestação clínica da neosporose em bovinos) ou em bezerros saudáveis porém congenitamente infectados. F) o ciclo se completa quando o hospedeiro definitivo ingere cistos com bradizoítos em tecidos de hospedeiros intermediários, o que pode ocorrer, por exemplo, quando cães alimentam-se da carcaça de animais infectados descartada a campo. Adaptado de: Guido et al. (2016).

Cada esporocisto contém quatro esporozoítos. Dessa forma, hospedeiros intermediários ingerem oocistos esporulados e, por ação química, ocorre a liberação de esporozoítos que invadem a parede intestinal. Nesse momento ocorre a conversão para o estágio de taquizoítos (GOODSWEN et al., 2013), os quais se multiplicam de forma intracelular e, após o rompimento das células parasitadas, provocam uma parasitemia aguda que atinge diversos tecidos, como nervoso, linfático e vascular (MONNEY; HEMPHILL, 2014). Protegidos em vacúolos parasitóforos (VP) nos citoplasmas de células infectadas, mantêm-se em franca multiplicação (DUBEY et al., 2002).

Para obter sucesso na invasão da célula hospedeira, o *N. caninum* faz uso de organelas e conjuntos de proteínas especializadas no desempenho desta função. Antígenos de superfície (SAGs), proteínas dos micronemas (MICs), proteínas das rôptrias (ROPs) e proteínas dos grânulos densos (DGs) são alguns dos componentes da maquinaria celular que são especializados neste processo de invasão (figura 2) (HEMPHILL et al., 2013).

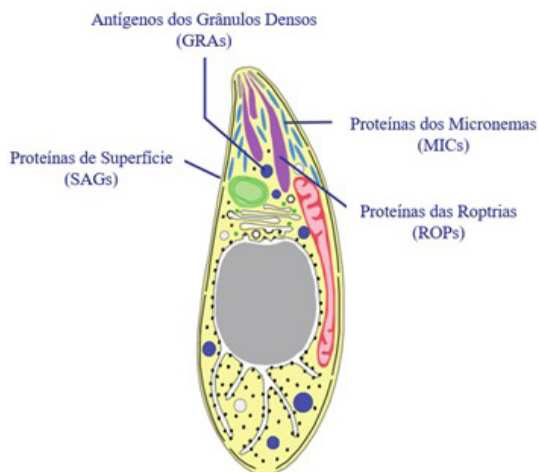


Figura. 2. Taquizoíto de *N. caninum* e proteínas envolvidas no processo de invasão da célula hospedeira. As proteínas pertencentes aos micronemas (MICs), rôptrias (ROPs), grânulos densos (GRAs) e que circundam a superfície do parasito (SAGs) são conhecidas como os principais componentes envolvidos na adesão, invasão e proteção do parasito em células hospedeiras, possuindo padrões de expressão que variam de acordo com o estágio do ciclo de vida e condição ambiental em que *N. caninum* se encontra. Imagem adaptada de Reid et al. (2012).

Conhecendo a localização destes antígenos e a sua importante participação durante o processo, entende-se que possuem aspectos fundamentais nesta interação parasito-hospedeiro (como a indução de uma resposta imune celular ou humoral, modulada pelo estágio gestacional do hospedeiro), garantindo suas escolhas como imunógenos no desenvolvimento de vacinas (HECKER et al., 2012).

Uma vacina comercial, composta por taquizoítos inativados, teve sua eficácia analisada em diferentes países. Entretanto, além de resultar na redução de taxas de aborto acima de 50%, foi verificada uma possível relação com o aumento no risco de morte embrionária, fazendo com que a vacina fosse retirada do comércio em determinados mercados (WESTON et al., 2012; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Com o propósito de disponibilizar ao setor agropecuário uma alternativa mais eficaz, segura e econômica para controlar a neosporose, vacinas recombinantes são amplamente estudadas em centros de pesquisa pelo mundo, com os mais diversos alvos e formulações (NISHIKAWA et al., 2002; HECKER et al., 2012; HEMPHILL et al., 2013; OJO et al., 2014).

Discussão analítica

Mecanismos de invasão de *N. caninum*

Sendo pertencente ao filo Apicomplexa, *N. caninum* é um parasito obrigatoriamente intracelular que possui diferentes mecanismos direcionados ao processo de invasão, como o “complexo apical” característico e que dá nome ao filo, o qual é composto por uma coleção de filamentos proteicos e organelas secretórias (COWPER et al., 2012). A literatura disponível que aborda padrões de expressão relacionados a fatores de virulência pertencentes ao *N. caninum* revela alterações ao longo dos seus estágios do ciclo de vida e em diferentes condições ambientais, evidenciando a importância do conhecimento destes padrões para o desenvolvimento de vacinas de subunidades e das respostas que esta poderá induzir no sistema imune (WASTLING et al., 2009; REID et al., 2012; GOODSWEEN et al., 2014).

Taquizoítos movimentam-se na matriz extracelular e buscam o reconhecimento do melhor local para a invasão celular. No momento inicial da relação entre *N. caninum* e a célula hospedeira, há um contato de baixa afinidade com a membrana superficial da célula-alvo, seguido por um processo de adesão mais estável entre as partes (figura 3).

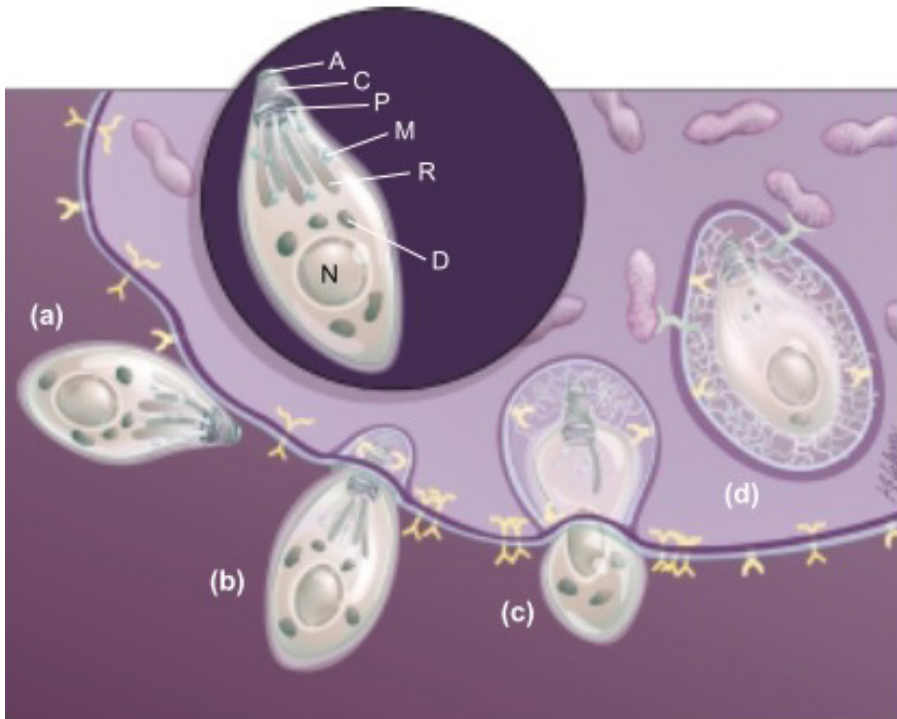


Figura 3. Processo de invasão da célula hospedeira pelo taquizoíto de *N. caninum*. a) Aneação: o parasito é orientado aleatoriamente no momento inicial de ligação à superfície da célula. b) Início da invasão: o taquizoíto reorienta-se para que sua extremidade apical esteja em contato com a célula. Nesse momento o conteúdo das organelas é liberado no espaço que antecede a formação do vacúolo parasitóforo (VP). c) Ingresso: a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) é criada pela inversão da membrana plasmática da célula hospedeira, formando-se paralelamente uma rede túbulo-vesicular de lipídios, considerada como a matriz do VP. d) Estabilização do VP: a MVP é separada da membrana da célula hospedeira, enquanto proteínas do parasito expandem-se através da membrana do vacúolo e criam uma associação com organelas da célula. Abreviações: A, anel apical; C, conóide; D, grânulos densos; M, micronemas; N, núcleo; P, anel polar; R, róptrias.

Adaptado de: Buxton et al. (2002).

Nesta etapa destacam-se as proteínas do tipo SAG, que mantém este contato de forma reversível (BUXTON et al., 2002). Para que haja a invasão da célula, os taquizoítos reorientam-se perpendicularmente à membrana superficial da célula, onde organelas secretórias pertencentes ao complexo apical, micronemas e roptrias liberam, por exocitose, proteínas adesivas na superfície celular que irão se ligar a receptores de glicanos para estabelecer um contato forte e específico. Neste momento há um aumento de Ca^{2+} citosólico no parasito, responsável por este e outros eventos importantes na relação parasito-hospedeiro (BUXTON et al., 2002; POLLO-OLIVEIRA et al., 2013). Proteínas dessas organelas tem a capacidade de mediar interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato, pois possuem domínios como *lectin-like*, *integrin (I)-like*, *thrombospondin (TSP)-like* e *epidermal growth factor (EGF)-like* (POLLO-OLIVEIRA et al., 2013).

ROPs e MICs inserem-se na membrana plasmática possibilitando a formação do receptor para AMA-1, proteína conservada dos micronemas que está relacionada com a montagem da “junção motora”, responsável pelo trânsito de *N. caninum* até o interior do citoplasma (COWPER et al., 2012; LI et al., 2015).

A junção motora é translocada por meio da superfície do parasito até o polo posterior enquanto proteínas MIC são liberadas via atividade proteásica romboide, o que acaba forçando o engolfamento do parasito pela célula. Nesta invasão há a formação do Vacúolo Parasitóforo (VP), que protege o parasito de ações externas de defesa da célula e que possui a Membrana do Vacúolo Parasitóforo (MVP) constituída pela própria membrana da célula hospedeira resultante da entrada do patógeno (BUXTON et al., 2002).

O VP é responsável por impedir a ação de lisossomos, permitindo assim que *N. caninum* se multiplique até alcançar uma massa crítica intracelular que acaba provocando a ruptura da célula hospedeira. Proteínas dos

Grânulos Densos (GRA) modificam a MVP e participam da formação de uma rede túbulo-vesicular intravacuolar, considerada a matriz do VP e formada por lipídeos. Mitocôndrias e retículo endoplasmático da célula hospedeira encontram-se adjacentes ao vacúolo parasitóforo (HEMPHILL et al., 2006; POLLO-OLIVEIRA et al., 2013).

Proteínas de superfície (SAGs)

O contato inicial na interação parasito-célula é mediado, em partes, por dois antígenos imunodominantes principais: NcSAG1 (*surface antigen-1*) e NcSRS2 (*SAG1-related sequence*) (HEMPHILL, 1996). Estas famílias de proteínas possuem papel fundamental na virulência do parasito. A família de proteínas SAG1 é constituída de componentes cruciais para a virulência, sendo caracterizada pela presença de dois domínios SRS dissulfídicos unidos (SOLTANI et al., 2013a). NcSRS2 está localizada tanto na membrana externa como também na membrana interna de taquizoítos de *N. caninum* (HEMPHILL, 1996), além de estar associada aos grânulos densos e roptrias, o que a relaciona ao processo de ligação e entrada na célula hospedeira. A partir de análises *in silico*, a proteína é predita com 43 kDa, contendo 401 aminoácidos e o sítio Arg-Gly-Asp (RGD) essencial na interação com receptores da superfície celular (SOLTANI et al., 2013a).

NcSAG1 é um dos antígenos mais estudados e comprovadamente imunogênico, é expresso por taquizoítos e sofre uma diminuição nos níveis de expressão durante a conversão do parasito para bradizoíto (TAKASHIMA et al., 2013). Dentre os antígenos expressos de forma heteróloga e testados em formulações vacinais, rNcSAG1 destaca-se como um dos que induzem maiores níveis de proteção (RAMAMOORTHY et al., 2007).

Ncp29 e Ncp35, similares a NcSAG1 e NcSRS2, respectivamente, foram demonstrados por Howe et al. (1998) como dois antígenos exclusivamente associados a membrana de taquizoítos do parasito, possuindo alta imunogenicidade e sendo bem conservados, características que os tornam interessantes na busca por novos imunógenos para vacinas e testes de diagnóstico. Supõe-se que antígenos de superfície expressos pelos bradizoítos, como NcBSR4, atuam como barreiras protetoras, sendo

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

Proteínas dos Micronemas (MICS)

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

Dentre as MICS já estudadas, é possível destacar NcMIC1, proteína secretada pelo parasito como molécula solúvel capaz de interagir com a superfície celular da célula hospedeira, através da ligação com glicosaminoglicanos específicos, fazendo parte de uma “ponte molecular” onde participam diferentes MICS, estando relacionada com o início do processo de invasão (KELLER et al., 2002; ALAEDDINE et al., 2005; BLUMENSCHNEIN et al., 2007).

Além desta, outra proteína, NcMIC2, foi analisada por Lovett et al. (2000) em cultivos celulares infectados pelo parasito, cujo estudo demonstrou um aumento gradual na indução da secreção da proteína durante a elevação de temperatura de cultivo (25°C para 37°C) e, quando utilizados agentes que promovem o aumento de cálcio intracelular, também foi observada uma maior expressão de NcMIC2. Essa pertence a uma família de proteínas que possui sítios *integrin-like* e TSP (trombospondina) tipo I, relacionados a ligação parasito-célula.

A proteína imunodominante NcMIC3 está distribuída pela superfície do parasito com a função de ajustar a interação com moléculas da super-

fície da célula hospedeira e, por meio de sua possível interação física com actina/miosina, oferece ao parasito a maquinaria e força motora para invadir a célula de forma ativa (NAGULESWRAN et al., 2001).

Antígenos dos Grânulos Densos (GRAs)

Grânulos Densos são vesículas delimitadas por membranas que contém grande quantidade de conteúdo granular armazenado, variam de tamanho, forma e número entre os apicomplexas, sendo algumas vezes confundidos com micronemas e róptrias em seções de microscopia eletrônica (SOLTANI et al., 2013b). Possuem antígenos que são secretados para o VP durante o desenvolvimento intracelular de taquizóitos de *N. caninum*, que estão relacionados com a absorção de nutrientes e excreção de resíduos e, ainda, com a estimulação da imunidade humoral pelo hospedeiro (WALSH et al., 2001). Como exemplo destas proteínas, NcGRA2 é encontrada associada com a rede tubular do VP em taquizóitos e fazendo parte da parede celular de bradizoítos (STROHBUSCH et al., 2008). Tão importante quanto, NcGRA7 é altamente imunogênica, relacionada inicialmente ao desenvolvimento parasitário intracelular, mas também tem sua importância reconhecida durante o processo inicial de invasão da célula hospedeira (SOLTANI et al., 2013b).

A proteína NcMAG1 foi descrita por Guionaud et al. (2010), principalmente em bradizoítos, inserida nos grânulos densos, compondo a parede do cisto ou dispersa em sua matriz, destacando-se por conter porções altamente imunogênicas, que estão relacionadas com a estimulação de resposta por células B.

Proteínas das Róptrias (ROPs)

As róptrias são organelas presentes em número superior às demais, com formato de “clava”, que possuem ductos que as conectam ao polo extremo do parasito (ALAEDDINE et al., 2013). As proteínas das róptrias, tendo como base estudos utilizando *T. gondii*, *N. caninum* e outros parasitos apicomplexas, foram divididas em: grupo das proteínas *rhoptyr necks* (RONs), conservadas no filo Apicomplexa, que auxiliam na formação do VP; grupo de quinases, fosfatases e proteases, comuns a células eucarióticas; e grupo de proteínas do bulbo das róptrias

(ROPs), que apresentam homologia apenas em gêneros estritamente relacionados, como *Neospora*, *Toxoplasma* e *Sarcocystis* (ALAEDDINE et al., 2013; TALEVICH; KANNAN, 2013).

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

Sugere-se que as ROPs participam do processo da biogênese do VP e na modulação de propriedades funcionais da MVP. Após a secreção, estas podem permanecer no lúmen do VP, associadas a MVP, ou então serem liberadas no citoplasma da célula hospedeira, com a intenção de que atinjam diferentes pontos, como, por exemplo, o núcleo. Na família das ROPs, todos precursores possuem peptídeos sinais e grande parte depende da clivagem de uma pró-região durante a maturação, possivelmente estando relacionadas a migração do parasito e a localização do VP próximo ao núcleo da célula infectada (HAKANSSON et al., 2001; ALAEDDINE et al., 2013).

Semelhante à família das ROPs de *T. gondii* (TgROPs), a família das NcROPs de *N. caninum* é um grupo de proteínas das roptrias com alguns homólogos de quinases, os quais possuem todos os resíduos necessários para desempenhar esta função (DEBACHE et al., 2008). Além disso, possui sítios expostos ao citosol da célula hospedeira que estão relacionados a interação do VP com elementos do retículo endoplasmático (NOLAN et al., 2015). NcROP2 é altamente conservada, imunodominante, desempenha papel fundamental durante a invasão e manutenção de taquizoítos e já teve, a partir de diferentes estudos, a sua capacidade de induzir proteção demonstrada (DEBACHE et al., 2008; DEBACHE et al., 2009). Sendo assim, a mesma apresenta-se como um antígeno com grande potencial de utilização para o desenvolvimento de vacinas contra *N. caninum* e testes de imunodiagnóstico.

***Neospora caninum* e Imunidade**

O aborto é a principal manifestação clínica da neosporose em bovinos, tanto em rebanhos leiteiros quanto de corte (DUBEY et al., 2006; GIBNEY et al., 2008). Não há momento específico da gestação para que ocorra o aborto, porém, em sua maioria, ocorrem entre o quinto e o sexto mês de gestação (DUBEY; SCHARES, 2011).

As consequências aos embriões e fetos podem ser variadas, como a morte, a reabsorção, a mumificação e o nascimento clinicamente normal com a persistência da infecção (DUBEY et al., 2006; DUBEY; SCHARES, 2011). As consequências mais severas surgem quando a gestação ainda está nos seus primeiros meses, o que pode ser explicado pela imaturidade do sistema imune do feto que é incapaz de combater com eficácia a infecção, visto que apenas aos 100 dias de gestação há o início do desenvolvimento de imunocompetência fetal e somente depois de 150 dias que o feto é capaz de reconhecer e desenvolver uma resposta imune a antígenos (HADDAD et al., 2005; DEBACHE et al., 2009).

Sugere-se que linfócitos T citotóxicos e citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, gerados por uma exacerbada resposta imune na defesa contra o parasito, são capazes de impedir a distribuição vascular de nutrientes, provocar danos à placenta e, principalmente, às células do trofoblasto levando ao aborto (ROSBOTTOM et al., 2011; CANTÓN et al., 2014).

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

IFN γ é responsável por aumentar a expressão de MHC de classe I, favorecendo a apresentação de antígenos e aumentando a chance de

que as células infectadas sejam reconhecidas por uma resposta citotóxica. De modo sinérgico pode atuar TNF- α , ativando macrófagos e células *Natural killer* (NK) (GOODSWEEN et al., 2014). Neste processo há também um aumento na expressão de IL-12, que induz um aumento na proliferação e produção de IFN γ por linfócitos T e células NK estimuladas por antígenos do parasito (BASZLER et al., 1999).

IFN γ também apresenta função regulatória na produção de IL-17, citocina importante no combate a infecção por *N. caninum*. Peckham et al. (2014) demonstraram que linfócitos T $\gamma\delta$ 17 promovem a morte de células em coculturas infectadas com *N. caninum*, corroborando com Flynn; Marshall (2011), que relacionaram o aumento de expressão de IL-17A com a imunopatologia encontrada durante a neosporose.

A importância da resposta imune baseada nesta citocina foi observada em camundongos IL17R-deficientes infectados por *T. gondii*, onde foi detectado o aumento da carga parasitária e a diminuição do número de neutrófilos. De modo geral, a presença exacerbada de células produtoras de IL-17 aumenta o dano tecidual, revelando seu papel na proteção e efeitos patológicos da doença (MATSUSAKI; UMEMURA, 2007).

No entanto, durante a prenhez, o sistema imune é modulado para que haja uma tolerância materna ao feto (ENTRICAN, 2002). A interface materno-fetal mantém citocinas como a interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4) e o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) que atuam a partir de uma resposta imunológica direcionada a Th2 e participam da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (figura 4) (INNES et al., 2001; INNES et al., 2002).

Um dos principais hormônios da gestação, a progesterona (LIANG et al., 2006), que tem seus níveis aumentados progressivamente no decorrer da gestação, inibe, durante a segunda parte da gestação, a secreção de TNF- α e de fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B (fator nuclear *kappa* B), induz o aumento de expressão de seus próprios receptores e estimula a produção de IL-10 em linfócitos T, além de favorecer o desenvolvimento de células do tipo Th2, responsáveis pela

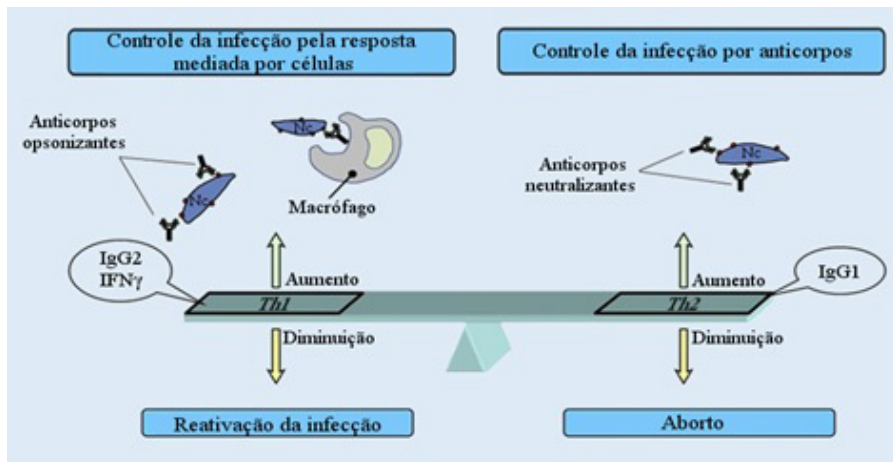


Figura 4. O balanço das respostas imunes Th1 e Th2 durante a gestação em bovinos infectados por *N. caninum*. Com o aumento da resposta Th1, citocinas pró-inflamatórias como o IFN γ e TNF- α provocam uma resposta imunológica necessária para limitar a proliferação do parasito, sendo responsáveis por aumentar a expressão de MHC1 e ativar macrófagos e células NK, o que favorece a apresentação de antígenos por células infectadas e a sua destruição. Ainda, há a estimulação de células B para secreção de anticorpos opsonizantes, que “marcam” os taquizoítos circundantes para serem destruídos. Porém, essa resposta pode também levar ao impedimento da distribuição vascular de nutrientes, provocar danos à placenta e, principalmente, às células do trofoblasto, acarretando em abortos [54-57]. Durante a gestação, o sistema imune é modulado para que haja uma tolerância materna ao feto [61], momento no qual hormônios (ex: progesterona) e citocinas (ex: IL-10, IL-4 e TGF- β) estimulam uma resposta imunológica Th2, provocando a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 [56,62]. A diminuição da resposta Th1 acaba permitindo que infecções latentes sejam reativadas. Adaptado de Goodswen et al.

produção de IL-5 e IL-4, contribuindo para a polarização de uma resposta do tipo Th2 (DORIA et al., 2006; ENNINGA et al., 2014).

Em camundongos, foi observada a participação da progesterona na modulação da diferenciação, da maturação e das funções de células dendríticas, levando a produção maior destas células na forma imatura, as quais expressam em níveis menores ligantes de receptores de linfócitos T e moléculas coestimulatórias (LIANG et al., 2006). Logo, este tipo de imunomodulação não é eficiente na proteção contra a infecção

exógena e transmissão vertical, favorecendo a invasão pelo parasito e a infecção do feto (ENTRICAN, 2002; INNES; VERMEULEN, 2006; KANO et al., 2007).

Medidas de controle baseadas em vacinação

Procurando obter uma resposta imune que proteja e seja duradoura contra *N. caninum*, capaz de estimular de forma correta um balanço entre Th1/Th2, diferentes protótipos de vacinas já foram e estão sendo testados (figura 5). Como descrito por Monney et al. (2011), uma vacina eficiente é dependente de alguns requisitos, como: 1) prevenir a proliferação de taquizoítos e sua disseminação no rebanho durante a gestação, 2) prevenir/reduzir a excreção de oocistos pelos hospedeiros definitivos e 3) impedir a formação de cistos teciduais em hospedeiros intermediários. Ao longo de mais de 15 anos, protótipos de vacinas inativadas, vivas atenuadas, recombinantes, de DNA, em vetores biológicos e com diferentes adjuvantes, já foram testados (INNES et al., 2002; HECKER et al., 2012; WESTON et al., 2012; MONNEY; HEMPHILL, 2014; LI et al., 2015).

Adrianarivo et al. (1999) realizaram experimentos com taquizoítos inativados em formulações com diferentes adjuvantes, como Havlogen[®], Polygen[®], Havlogen + Bay R-1005 e Montanide ISA 773, apresentando assim um dos primeiros trabalhos relacionados ao controle do parasito a partir da vacinação.

A única vacina já disponível no mercado era composta por lisado de taquizoítos e apresentou resultados como a diminuição em torno de 50% dos casos de aborto em estudo na Costa Rica (ROMERO et al., 2004). No entanto, em estudos subsequentes, esta vacina apresentou aumento da chance de morte embrionária e não impediu a infecção fetal ou placentária em vacas vacinadas (WESTON et al., 2012; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Com base nestes e outros estudos, a vacina foi removida do mercado em alguns países (MONNEY; HEMPHILL, 2014; LI et al., 2015). Os problemas relacionados a uma vacina contendo o patógeno inativado

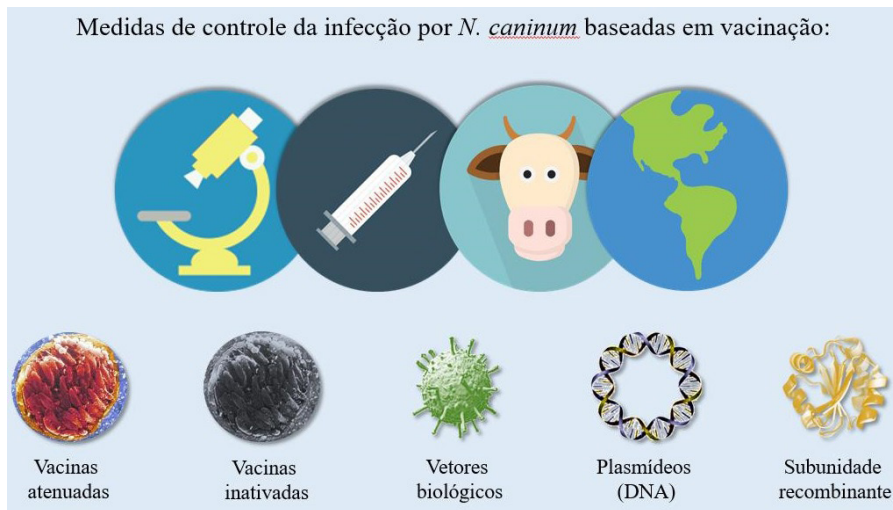


Figura 5. Medidas de controle da infecção por *N. caninum* atualmente em estudo, baseadas na imunização de modelos animais. A constante busca de novos alvos vacinais e formas de apresentação dos imunógenos de *N. caninum* representa a necessidade de desenvolver uma alternativa eficaz, segura e econômica capaz de proteger rebanhos bovinos ao redor do mundo, os principais hospedeiros intermediários do parasito. Para a agropecuária, a disponibilidade de uma vacina confiável representa a diminuição de perdas que somam mais de US\$ 1.3 bilhão ao ano na economia mundial [4], as quais estão relacionadas ao aborto, custos de tratamento veterinário, e ao menor rendimento no ganho de peso e produção de leite pelos animais infectados.

podem ser explicados pela variedade de antígenos presentes em *N. caninum* e, ainda que alguns antígenos sejam responsáveis por modular uma resposta imune protetora, outros possuem efeito contrário, favorecendo a invasão pelo parasito e causando danos ao hospedeiro (HEMPHILL et al., 2013).

Este fato foi evidenciado quando vacinas experimentais utilizando a proteína NcMIC4 nativa (purificada do parasito) e recombinante demonstraram-se incapazes de induzir proteção e, além disso, foram responsáveis pelo aumento da susceptibilidade em camundongos à infecção por *N. caninum* (SRINIVASAN et al., 2007).

Após imunização de novilhas com taquizoítos inativados, sem a obtenção de uma resposta imune protetora, foi sugerido que epítomos mantiveram-se ausentes ou modificados devido a alterações provocadas durante o processo de inativação e, dessa forma, sendo apresentado ao sistema imune uma variedade de epítomos não tão relevantes para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (ADRIANARIVO et al., 1999).

Vacinas vivas

Na busca por vacinas contra a neosporose, são estudadas também vacinas vivas, as quais apresentam cepas menos virulentas do parasito ou geneticamente modificadas em sua formulação. Como destacado por Hecker et al. (2012), a proteção fornecida por este tipo de vacinas as tornam importantes ferramentas no combate à doença, contudo, encontram-se limitações pela possibilidade de gerarem infecções crônicas com posterior transmissão vertical.

A dificuldade e o risco no cultivo de determinados microrganismos, a possível diferença nos padrões de expressão *in vitro* e *in vivo* e as diferenças dos perfis de expressão de proteínas dos diferentes estágios do ciclo de vida do patógeno são algumas das dificuldades e limitações encontradas nos laboratórios para o desenvolvimento de vacinas eficazes (GOODSWEEN et al., 2012). Na utilização de vacinas atenuadas, há uma grande preocupação com as cepas utilizadas e com os métodos de atenuação, pois pode haver o risco de transmissão de *N. caninum* para o feto, resultando no nascimento de um animal congenitamente infectado (INNES et al., 2011). Ainda, estas vacinas tendem a ser instáveis e possuir tempo de prateleira relativamente curto (KNOX; REDMOND, 2006).

Dois isolados, Nc-Nowra (MILLER et al., 2002) e Nc-Spain 1H (ROJO-MONTEJO et al., 2009), foram identificados como menos virulentos e, quando testados em camundongos, não foram observados sinais clínicos ou mortes resultantes da doença (ROJO-MONTEJO et al., 2009; HECKER et al., 2012). A cepa naturalmente atenuada Nc-Spain 1H foi analisada por Rojo-Montejo et al. (2012) como vacina experimental, na prevenção da transmissão congênita da cepa Nc-Liv em fêmeas de camundongos BALB/c. Enquanto o grupo de animais não vacinados

apresentou uma taxa de 84% para mortalidade pós-natal nas ninhadas, o grupo imunizado com duas doses de Nc-Spain 1H (na concentra o de 5×10^5 taquizoítos vivos) apresentou uma taxa de 2,4%. Na avalia o por rea o em cadeia da polimerase (PCR), não foi detectada a presença de DNA do parasito no cérebro dos animais imunizados. Em rela o a transmissão vertical, o grupo de animais não imunizados apresentou uma taxa de 89,1%, enquanto que o grupo de animais que receberam as doses da cepa atenuada, apenas 2,3% (ROJO-MONTEJO et al., 2012).

Outras abordagens como o isolamento de mutantes sensíveis a temperatura, a irradia o de taquizoítos por raios gama, a atenua o por sucessivas passagens em cultura celular e a manipula o genética do parasito, resultam em candidatos ao seu controle (RAMAMOORTHY et al., 2006; MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011a).

N. caninum cepa NC-1 foi atenuada por radia o γ e inoculada em duas doses na concentra o de 1×10^6 taquizoítos para imuniza o de camundongos C57BL6. Estes foram posteriormente desafiados com taquizoítos na concentra o de 2×10^7 . Na sorologia dos animais vacinados foi detectada resposta de anticorpos tanto do isotipo IgG1 quanto IgG2a, sugerindo um equilíbrio entre Th1/Th2. Na cultura de esplenócitos, foram observados níveis significativamente aumentados de IFN- γ e IL-10, enquanto IL-12 e IL-4 não foram detectados. Acompanhados por 25 dias após o desafio, nenhum camundongo do grupo vacinado havia morrido ou apresentado sinais de neosporose, enquanto no grupo controle isto já ocorrera aos 7 dias pós desafio (RAMAMOORTHY et al., 2006).

Utilizando engenharia genética, Marug n-Hernandez et al. (2011b) apresentaram uma abordagem interessante, na qual obtiveram taquizoítos que expressam constitutivamente NcSAG4, um importante e específico antígeno de bradizoítos. Dessa forma, obtiveram uma cepa com baixa persistência no cérebro de ratos e capaz de induzir resposta imune contra NcSAG4 anteriormente ao estágio encistado do parasito (MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011b). Mesmo assim, as desvantagens das vacinas vivas atenuadas, como o alto custo e a dificuldade para produ o de taquizoitos, assim como a persistência de infec o cr nica nos animais vacinados, ainda existem.

Vacinas utilizando vetores biológicos

Vetores biológicos como Herpesvírus e Vacciniavírus carreadores de sequências proteicas recombinantes despertam o interesse de pesquisadores por terem demonstrado eficácia contra infecções por protozoários (HECKER et al., 2012).

Nishikawa et al. (2001a) construíram vetores (Vacciniavírus) expressando NcSRS2 e NcSAG1, utilizados para a vacinação de camundongos BALB/c, os quais apresentaram altos níveis de anticorpos IgG1 antes e durante o desafio com *N. caninum* (concentração de 4×10^4 taquizoítos vivos). Os mesmos foram sacrificados aos 5, 8 e 10 dias pós-infecção para a detecção, pela técnica de PCR, de DNA do parasito no DNA total extraído de cérebros e fígados. Não foi detectado DNA de *N. caninum* nos cérebros de animais vacinados com o vetor expressando NcSRS2, diferentemente do observado naqueles vacinados com o vetor expressando NcSAG1 e na análise dos fígados, em que ambos os vetores utilizados não foram capazes de promover diferença significativa do grupo controle (NISHIKAWA et al., 2001a; NISHIKAWA et al., 2001b).

Brucella abortus atenuado (cepa RB51) também foi utilizado como vetor expressando cinco antígenos imunodominantes de *N. caninum*: NcMIC1, NcMIC3, NcGRA2, NcGRA6 e NcSRS2. Naquele estudo, com a vacinação e posterior desafio de camundongos C57BL/6, estas proteínas testadas individualmente ou em associação apresentaram resultados satisfatórios, como a proteção a níveis de 90% com RB51-SRS2 e 100% para RB51-GRA6 (RAMAMOORTHY et al., 2007). Foi evidenciada, também, a capacidade de induzir uma resposta imune predominantemente celular e considerada uma abordagem interessante, pois associa antígenos de *N. caninum* e *B. abortus*, objetivando o controle de duas doenças bovinas abortivas importantes (RAMAMOORTHY et al., 2007). Porém, para a utilização de vetores biológicos, principalmente os vírus, é necessário um alto nível de segurança biológica e que estes vetores tenham sua patogenicidade eliminada ou reduzida, sendo incapazes de desenvolver danos ao organismo imunizado (URA et al., 2014).

Vacinas de DNA

Vacinas baseadas em plasmídeos contendo seq ncias gênicas de antígenos de patógenos se unem a lista de alvos para o desenvolvimento de um método de controle de neosporose. Monney et al. (2011) montaram associa es (quimeras) de seq ncias gênicas parciais de três diferentes proteínas, NcMIC1, NcMIC3 e NcROP2, utilizando regiões preditas como mais imunogênicas e construindo quatro diferentes seq ncias para expressão: NcMIC3E-NcMIC1E, NcROP2E-NcMIC3E-NcMIC1E, NcMIC3E-NcROP2E-NcMIC1E, NcMIC3E-NcMIC1E-NcROP2E. Mesmo contendo as mesmas partes destes antígenos, a associa o na forma NcMIC3E-NcMIC1E-NcROP2E apresentou uma resposta imune capaz de proteger 100% dos animais após o desafio com *N. caninum*, a qual não foi alcançada da mesma forma pelas outras quimeras, que não induziram prote o acima de 70%. Ambas as constru es estimularam uma resposta baseada em IL-4 com baixos níveis de IFN- γ (tipo Th2) durante a vacina o e, posteriormente ao desafio com o parasito, os níveis de IL-4 foram menores que aqueles para IFN- γ , semelhante ao encontrado no grupo controle (MONNEY et al., 2011).

Cannas et al. (2003), a partir da vacina o de camundongos com vacinas de DNA contendo NcSRS2 ou NcSAG1, seguidos de um *boost* com SRS2 (rSRS2) e SAG1 (rSAG1) recombinantes obtiveram prote o com níveis de 60% e 75% de camundongos desafiados com *N. caninum*, respectivamente. Em outra pesquisa, também foi desenvolvida uma vacina de DNA contendo a seq ncia g nica de NcSRS2 para imuniza o de camundongos BALB/c com posterior cultivo de esplenócitos (ZHAO et al., 2009). Nesta última, os pesquisadores relatam uma baixa resposta específica para a proteína em ELISA, porém, observaram um aumento nas concentra es de óxido nítrico, IL-2 e IFN- γ nos cultivos celulares estimulados com NcSRS2 recombinante.

Liddell et al. (2003) construíram plasmídeos para expressão de duas diferentes proteínas: NcGRA7, pertencente aos grânulos densos de taquizoítos, e NcSHSP (*small heat shock protein*), ambas relativamente pouco estudadas, porém com expressão altamente regulada duran-

te o desenvolvimento do parasito. Testes *in vitro* utilizando células de fibroblastos humanos transformadas com os plasmídeos pCMVi-NcGRA7 e pCMVi-NcsHSP comprovaram a expressão destas proteínas, enquanto a vacinação realizada com as proteínas recombinantes em camundongos BALB/c fêmeas gestantes conferiu proteção parcial para a transmissão congênita do parasito. Os animais vacinados com os plasmídeos foram posteriormente desafiados com *N. caninum* e, em comparação com os controles, deram origem a ninhadas que possuíam em torno de 50% menos filhotes PCR positivos para o parasito.

Vacinas de subunidades recombinantes

A expressão de peptídeos/proteínas recombinantes em sistemas de expressão tais como plantas, vírus, fungos, bactérias, células de inseto e de animais, desperta o interesse de pesquisadores para sua utilização como vacinas de subunidade (DINIZ; FERREIRA, 2010).

A utilização de peptídeos isolados (que contenham epítomos importantes para a resposta imunológica) em vacinas pode estimular a proteção sem efeitos ou reações imunes antagônicas causadas por outras estruturas do patógeno, havendo uma resposta de acordo com cada peptídeo testado. Quando associados (frações peptídicas fusionadas), estes podem levar a respostas melhores na proteção de determinada doença ou dirigir a imunização para mais de um tipo de cepa ou sorotipo de patógeno (HANSSON et al., 2000; MONNEY et al., 2011; HEINSON et al., 2015). A imunização de animais de experimentação com peptídeos do parasito expressos de forma recombinante tornou-se uma das principais ferramentas para análises de proteção e soroconversão a partir destas frações (HECKER et al., 2012; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Três diferentes proteínas recombinantes de *N. caninum* foram expressas em *E. coli*: rNcPDI, rNcROP2 e rNcMAG1. Estas proteínas foram inoculadas pelas vias intranasal e intraperitoneal em camundongos C57B1/6, buscando avaliar qual destas seria a melhor para estimular uma resposta protetora frente ao desafio. A análise destes dados sugere que a via de imunização exerce um papel importante na indução de imunidade específica, pois aos 28 dias após a infecção, rNcPDI admi-

nistrada pela via intraperitoneal apresentou 20% de proteção, enquanto que a via intranasal, conferiu proteção de 90%. De maneira inversa, rNcMAG1 apresentou neste mesmo período proteção de 10% quando inoculada via intranasal e 50% quando aplicada via intraperitoneal. Independente da via de administração, a proteína rNcROP2 conferiu níveis de proteção que se mantiveram acima de 60% após 28 dias do desafio (DEBACHE et al., 2010).

Foram desenvolvidas vacinas experimentais utilizando as proteínas recombinantes rNcROP2, rNcROP40, rNcGRA7, rNcNTPase e associações destas, expressas em *E. coli*, para avaliar a resposta imune humoral e a proteção conferida no processo de transmissão vertical em fêmeas de camundongos BALB/c. Os animais foram vacinados com estes antígenos e desafiados com a cepa Nc-Liverpool, anteriormente ao período de gestação, possibilitando a avaliação da transmissão congênita do parasito. A proteína rNcROP2 representou um aumento de 6,3% na taxa de sobrevivência da prole, enquanto a quimera rNcROP2/NcROP40 exibiu 16,2% de aumento, contrastando com os demais grupos vacinados com rNcROP40, rNcGRA7, rNcNTPase e rNcGRA7/NcNTPase, que, até os 30 dias do período pós-natal, apresentaram 100% de mortalidade nas ninhadas. Todos os grupos de camundongos exibiram uma resposta imune baseada em IgG1 e, a partir de esplenócitos dos animais dos grupos vacinados, o grupo inoculado com rNcROP2 apresentou produção significativamente maior de IFN- γ quando comparado aos demais (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2015).

A partir de bibliotecas de fagos, foram isoladas e expressas duas proteínas de ligação com a célula hospedeira, NcGRA7 e, pela primeira vez descrita, NcP78, uma proteína de 78 kDa, as quais foram inoculadas separadamente em camundongos BALB/c em 3 doses com 2 semanas de intervalo. Após a primeira imunização, níveis de IgG1 eram significativamente maiores em ambos os grupos vacinados com NcGRA7 e NcP78, enquanto os níveis de IgG2a aumentaram significativamente após a 3ª imunização nestes grupos. Além disso, utilizando soros dos animais imunizados, foi avaliado o efeito inibitório na invasão de células

Vero por *N. caninum*, demonstrando que soros do grupo imunizado com NcGRA7 foram mais eficazes neste processo de inibição *in vitro* (LV et al., 2015).

O mesmo sistema de expressão (*E. coli*) foi utilizado para obter quatro proteínas recombinantes de bradizoíto: rNcBAG1, rNcBSR4, rNcMAG1 e rNcSAG4. Camundongos foram vacinados com duas doses em grupos separados com formulações contendo a proteína testada mais adjuvante óleo-em-água e, após cinco semanas, foram desafiados com taquizoítos de *N. caninum*. Os grupos vacinados com rBAG1, rMAG1 e rNcSAG4 demonstraram poucos ou moderados sinais clínicos da doença, enquanto aqueles vacinados com NcBSR4 desenvolveram a doença de forma severa (UCHIDA et al., 2013).

Vacinologia reversa

Uma abordagem *in silico* para a busca por frações imunogênicas de subunidades pode ser mais interessante do que a busca de efetividade em vacinas tradicionais atenuadas ou inativadas. Com este tipo de análise é possível prever quais proteínas, dentre as diversas presentes no parasito, serão capazes de estimular uma atividade desejada pelo sistema imune a partir de epítomos de linfócitos T que possam se ligar ao complexo de histocompatibilidade (MHC) ou a partir de proteínas de superfície ou secretadas que contenham epítomos de linfócitos B (figura 6) (GOODSWEEN et al., 2014).

O sequenciamento do genoma e transcriptoma de taquizoítos de *N. caninum* cepa Liverpool auxiliaram no estudo de novos peptídeos-alvo para síntese ou expressão recombinante a partir da comparação com sequências de *T. gondii* em busca de similaridades e diferenças (REID et al., 2012). A vacinologia reversa pan-genômica analisa diferentes genomas de uma mesma espécie de patógeno buscando padrões de variabilidade genética que possam ser levados em consideração durante a construção de uma vacina. O pan-genoma pode ser definido como um repertório global genético pertencente à espécie, dividido em partes como "*core-genome*", aquele que concentra genes invariáveis e conservados, "*dispensable genome*", para genes que estão presentes em

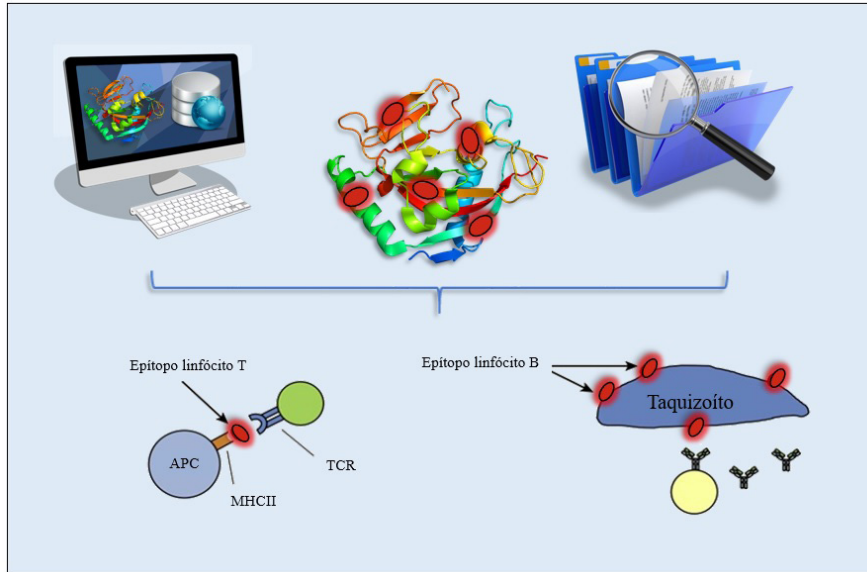


Figura 6. Identificação de proteínas antigênicas que possuam epítomos para linfócitos B e T. A busca por epítomos em imunógenos para o controle da neosporose tem sido abastecida por inúmeros estudos de predição *in silico* [22] e resultados disponíveis na literatura, que abordam proteínas e seus determinantes antigênicos de forma isolada, frente à indução de proteção contra a infecção por *N. caninum* em modelos biológicos [68,69]. Adaptado de Goodswen et al. (2014). MHCII, Major Histocompatibility Complex II; TCR, T cell receptor; APC, Antigen-Presenting Cell.

algumas, mas não em todas as cepas, e genes *“strain-specific”*, aqueles presentes em um único isolado (SERRUTO et al., 2009).

A disponibilização de sequências gênicas de microrganismos em bancos de dados possibilitou a utilização da “Vaciniologia Reversa” que, utilizando análises *in silico*, pode prever proteínas-alvo que contenham epítomos importantes para a indução de uma resposta imune protetora pelo hospedeiro, demonstrando-se como uma alternativa à aplicação de vacinas atenuadas ou inativadas (RAPPUOLI, 2001).

O potencial dos “-omas” (genoma, transcriptoma, proteoma e metabo- loma) é reconhecido e utilizado como ferramenta no entendimento de

patógenos e na busca de vacinas e alvos para medicamentos. As informações disponíveis sobre o parasito revelam que cepas de *N. caninum* são extremamente similares, contudo possuem diferenças significativas no comportamento do parasito, principalmente relacionadas a virulência (GOODSWEEN et al., 2013).

No entanto, não foi encontrado, até o momento, relato sobre a utilização de peptídeos desenhados e sintetizados por vacinologia reversa com o objetivo de estimular uma resposta imune contra *N. caninum* em bovinos.

Considerações finais

A principal problemática da neosporose em bovinos é sua manutenção pela transmissão vertical em animais assintomáticos, principalmente na ausência do hospedeiro definitivo. Além disso, o impacto econômico da neosporose se dá, principalmente, em função desta doença provocar abortos em consequência desta característica (CANTÓN et al., 2014). Isso porque ainda não existem outros prejuízos considerados, como despesas com programas de controle, o descarte de fêmeas infectadas dos rebanhos de matrizes, nem com o próprio tratamento da mesma.

Buscando um método que controle a infecção e a transmissão do patógeno nos rebanhos bovinos, diversas vacinas experimentais estão sendo desenvolvidas com formulações contendo o parasito vivo (ROJO-MONTEJO et al., 2009; WEBER et al., 2013), vacinas utilizando vetores biológicos (JIA et al., 2013; PENARETE-VARGAS et al., 2010), vacinas de DNA (ZHAO et al., 2009; MONNEY et al., 2011) e vacinas compostas por subunidades recombinantes, geralmente proteínas relacionadas ao processo de invasão da célula hospedeira (UCHIDA et al., 2013; LV et al., 2015).

Ensaio baseados na imunização de modelos animais – normalmente camundongos – concluem sobre a capacidade de estas vacinas induzirem uma resposta protetora que impeça a infecção pelo parasito e, principalmente, sua transmissão vertical através da sua capacidade de

estimular a produ o de citocinas fundamentais para a resposta imune mediada por células (por exemplo IFN- γ e TNF- α) e para a resposta imune humoral (por exemplo: IL-4 e IL-10).

Na literatura,   possível observar diferentes níveis de prote o induzidos pela vacina o. Algumas vacinas conferem até 100% de prote o, em que todos os animais de um grupo desafiado permanecem sem apresentar sinais clínicos da doença (MONNEY et al., 2011). No entanto, outras não são capazes de estimular o sistema imune a impedir de forma eficaz a infec o e transmissão cong nita de taquizoítos (ADRIANARIVO et al., 1999).

Contudo,   importante destacar que estes estudos diferem quanto   concentra o de proteína por dose, ao número de imuniza es,   via de inocula o, ao adjuvante vacinal, ao modelo animal,   cepa de desafio e   concentra o de taquizoítos, entre outros fatores relevantes ao processo de análise de eficácia de uma vacina para o controle da neosporose. Assim, há uma dificuldade na compara o entre os níveis de prote o conferidos pelas vacinas testadas, demonstrando que este tipo de estudo deve ser feito de forma criteriosa e considerando as variáveis citadas (GOODSWEEN et al., 2014). Além disso, mesmo que uma vacina testada em modelos murinos apresente eficácia na prote o contra a neosporose, essa ainda deverá ser testada e validada em modelos animais bovídeos. Sendo assim, entende-se que há uma grande lacuna entre os protótipos vacinais pesquisados hoje e a disponibiliza o de um produto capaz de controlar a neosporose bovina.

A busca de candidatos para vacinas experimentais por meio da vacinologia convencional, baseada na cultura de patógenos e posterior purifica o de suas estruturas proteicas, ainda   um campo ativo na pesquisa (HEINSON et al., 2015). No entanto, a disponibiliza o de anota es de sequências gen micas, proteômicas e transcriptômicas em bancos de dados possibilitou, por meio de bioinformática, a predi o de antígenos com maior potencial imunogênico, iniciando uma abordagem chamada de vacinologia reversa (SERRUTO et al., 2009).

Análises *in silico* foram executadas por Monney et al. (2011) para predição de peptídeos importantes para indução de uma resposta imune protetora e, após definição das sequências aminoácídicas, os autores desenvolveram quimeras para imunização de modelos murinos. Assim como esses cientistas, o grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia do Carrapato da Embrapa Gado de Corte, em parceria com o grupo do Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, estuda vacinas experimentais e testes de imunodiagnóstico que utilizam regiões imunodominantes e quimeras de proteínas como NcROP2 e NcSRS2 (LIMA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008; PINHEIRO et al., 2013), cujos envolvimento no processo de infecção da célula hospedeira já estão descritos, associadas a proteínas moduladoras de resposta imune, como LTB (subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli*) e Opr1 (lipoproteína da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*).

A LTB é uma alternativa válida para a função de molécula carreadora já que é composta por cinco polipeptídios idênticos (com peso molecular de 11,6 kDa cada), sendo capaz de modular a resposta do sistema imunológico e caracterizada como um potente adjuvante de mucosas (DA HORA et al., 2011). Opr1 é um ligante TLR2, com características de modulação da resposta imune humoral e celular, com potencial uso como adjuvante de mucosas (CORNELIS et al., 1996; LOOTS et al., 2008; BASTO et al., 2012; BASTO et al., 2014).

Na busca por uma diminuição do impacto econômico, é comum se fazer referência a diminuição de casos de aborto no rebanho como uma resposta positiva da vacina. Porém, é preciso considerar que o aborto impede a propagação de *N. caninum* e que a diminuição da taxa de aborto não significa, necessariamente, que a transmissão vertical não ocorreu, mas sim que esta vacina influenciou na infecção do feto, podendo ter inibido a ação de alguma molécula responsável por sua patogenicidade durante esta infecção, reduzindo o seu potencial infeccioso.

A vacinação via mucosas poderia ser uma solução, inibindo a invasão intestinal pelos esporozoítos, pela atuação do sistema imune de mu-

cosas com a participação de células e IgAs secretoras. Porém, mesmo que se consiga uma vacina capaz de proteger os bovinos contra a infecção por esporozoítos, os animais infectados teriam que ser descartados da reprodução e ir para abate. Só assim se teria uma redução na disseminação do parasito.

Alternativas simples como a utilização de diferentes adjuvantes também poderiam auxiliar nesta busca. Com a utilização de Montanide, que são microemulsões de água em óleo composta de esqualeno estabilizado com surfactante (XU et al., 2009), teríamos, possivelmente, uma alta secreção de anticorpos, alta proliferação de células T e um perfil equilibrado de citocinas Th1/Th2, estimulando-se uma resposta imune eficiente contra a propagação de *N. caninum*. Esse adjuvante também é conhecido por aumentar o recrutamento, a atividade e a migração de células apresentadoras de antígenos para os linfonodos, além de interagir com as membranas celulares, favorecendo a captação de antígenos (MATA et al., 2013).

Dessa forma, uma vacina eficaz deverá não somente diminuir o aborto, mas sim, inibir a infecção e reduzir a propagação de *N. caninum*. Como consequência, a doença seria controlada e os casos de aborto por neosporose reduzidos sem impacto nos plantéis de fêmeas bovinas reprodutoras.

Mais pesquisas são necessárias para se aumentar o leque de opções de antígenos hoje existentes. Além disso, se faz necessário testar vacinas promissoras diretamente em bovinos. Porém, antes de se testar, é preciso que haja a determinação de um sistema seguro para tal, com a padronização dos desafios, tornando os estudos comparáveis entre si e possibilitando interpretações mais conclusivas.

A lacuna existente pela falta de vacinas de alta eficácia e confiabilidade no mercado pode ser preenchida com o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de características comerciais atrativas que possam atender a cadeia produtiva da bovinocultura como alternativa eficaz no combate à neosporose.

Referências

- ADRIANARIVO, A. G.; CHOROMANSKI, L.; MCDONOUGH, S. P.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1613-1625, 1999.
- ALAEDDINE, F.; KELLER, N.; LEEPIN, A.; HEMPHILL, A. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in C57BL/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NcMIC1. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 657-665, 2005.
- ALAEDDINE, F.; HEMPHILL, A.; DEBACHE, K.; GUIONAUD, C. Molecular cloning and characterization of NcROP2Fam-1, a member of the ROP2 family of rhopty proteins in *Neospora caninum* that is targeted by antibodies neutralizing host cell invasion in vitro. **Parasitology**, v. 140, p. 1033-1050, 2013.
- BARLING, K. S.; LUNT, D. K.; SNOWDEN, K. F.; THOMPSON, J. A. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 1259-1262, 2001.
- BARROS, J. C. Impacto econômico da neosporose no sistema produtivo de gado de corte no estado de Mato Grosso do Sul. **Tese (Mestrado em Administração)** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. p. 1-70, 2011.
- BASTO, A. P.; PIEDADE, J.; RAMALHO, R.; ALVES, S.; SOARES, H.; CORNELIS, P.; MARTINS, C.; LEITÃO, A. A new cloning system based on the OprI lipoprotein for the production of recombinant bacterial cell wall-derived immunogenic formulations. **Journal of Biotechnology**, v. 157, p. 50-63, 2012.
- BASTO, A. P.; LEITÃO, A. Targeting TLR2 for vaccine development. **The Journal of Immunology**, v. 1, e619410, 2014.
- BASZLER, T. V.; LONG, M. T.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1635-1646, 1999.
- BECK, J. R.; CHEN, A. L.; KIM, E. W.; BRADLEY, P. J. RON5 is critical for organization and function of the *Toxoplasma* moving junction complex. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1004025, 2014.

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

BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, p. 11-25, 2001.

BLUMENSCHNEIN, T. M.; FRIEDRICH, N.; CHILDS, R. A.; SAOUROS, S.; CARPENTER, E. P.; CAMPANERO-RHODES, M. A.; SIMPSON, P.; CHAI, W.; KOUTROUKIDES, T.; BLACKMAN, M. J.; FEIZI, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; MATTHEWS, S. Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 2808-2820, 2007.

BUXTON, A.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 546-552, 2002.

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

CANTÓN, G. J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; BENAVIDES-SILVÁN, J.; PALAREA-ALBALADEJO, G. J. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. **Veterinary Research**, v. 45, p. 11-16, 2014.

CORNELIS, P.; SIERRA, J. C.; JUNIOR, A. L.; MALUR, A.; TUNGPRADABKUL, S.; TAZKA, H.; LEITÃO, A.; MARTINS, C. V.; DI PERNA, C.; BRYLS, L.; DE BAETSELLER, P.; HAMERS, R. Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 203-208, 1996.

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

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

DEBACHE, K.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; MEVISSSEN, M.; HEMPHILL, A. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1455-1463, 2008.

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

DEBACHE, K.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; HEMPHILL, A. Intraperitoneal and intranasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology**, v. 137, p. 229-240, 2010.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 19-30, 2010.

DORIA, A.; IACCARINO, L.; ARIENTI, S.; GHIRARDELLO, A.; ZAMPIERI, S.; RAMPUDDA, M. E.; CUTOLO, M.; TINCANI, A.; TODESCO, S. Th2 immune deviation induced by pregnancy: The two faces of autoimmune rheumatic diseases. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 234-241, 2006.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

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

ENNINGA, E. A. L.; HOLTAN, S. G.; CREEDON, D. J.; DRONCA, R. S.; NEVALA, W. K.; OGNJANOVIC, S.; MARKOVIC, S. N. Immunomodulatory effects of sex hormones:

requirements for pregnancy and relevance in melanoma. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, p. 520-535, 2014.

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

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

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

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 134, p. 159-161, 2004.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Evaluating high-throughput discover proteins encoded in eukaryotic pathogen ab initio gene finders to genomes missed by laboratory techniques. **PLoS One**, v. 7, p. e50609, 2012.

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

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

GONÇALVES, K. N.; ANDREOTTI, R.; PAIVA, F.; PONTES, E. R.; LIMA JUNIOR, M. S.; MATOS, L. M. Interleukin-12 response to NcSRS2 immunization of BALB/c mice against *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 215-219, 2008.

GUIONAUD, C.; HEMPHILL, A.; MEVISSSEN, M; ALAEDDINE, F. Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. **Parasitology**, v. 137, p. 1605-1619, 2010.

HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 230-243, 2005.

HAKANSSON, S.; CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* vacuoles: two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 3132-3144, 2001.

HANSSON, M.; NYGREN, P.; STAHL, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, p. 95-107, 2000.

HECKER, Y. P.; VENTURINI, M. C.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C.; MOORE, D. P. Avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis bovina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, p. 216-230, 2012.

HEINSON, A. I.; WOELK, C. H.; NEWELL, M. The promise of reverse vaccinology. **International Health**, v. 7, p. 85-89, 2015.

HEMPHILL, A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4279-4287, 1996.

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

HEMPHILL, A.; DEBACHE, K.; MONNEY, T.; SCHORER, M.; GUIOUNAUD, C.; ALAEDDINE, F.; MUELLER, N.; MUELLER, J. Proteins mediating the *Neospora caninum* - host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 23-36, 2013.

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.

HOWE, D. K.; CRAWFORD, A. C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L. D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5322-5328, 1998.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011.

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M.; BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1523-1534, 2001.

INNES, E. A.; ADRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 467-504, 2002.

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

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; ROCCHI, M.; BENAVIDAS-SILVAN, J.; BURRELS, A.; HOTCHKISS, E.; CHIANINI, F.; CANTON, G.; KATZER, F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: Dead or alive? **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 155-163, 2011.

JIA, L.; ZHANG, S.; QIAN, N.; XUAN, X.; YU, L.; ZHANG, X.; LIU, M. Generation and immunity testing of a recombinant adenovirus expressing NcSRS2-NcGRA7 fusion protein of bovine *Neospora caninum*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, p. 247-253, 2013.

KANO, R.; KUDO, A.; KAMIYA, H.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; OMATA, Y. C57BL/6 Mice infected with *Neospora caninum* during administration of progesterone show bias toward Type 2 immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 69, p. 1095-1097, 2007.

KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ M.; BJÖRKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPHILL, A. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3187-3198, 2002.

KNOX, D. P.; REDMOND, D. L. Parasite vaccines-recent progress and problems associated with their development. **Parasitology**, v. 133, p. 1-8, 2006.

LI, W.; LIU, J.; WANG, J.; FU, Y.; NAN, H.; LIU, Q. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2893-2902, 2015.

LIANG, J.; SUN, L.; WANG, Q.; HOU, Y. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 830-838, 2006.

LIDDEL, S.; PARKER, C.; VINYARD, B.; JENKINS, M.; DUBEY, J. P. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 496-500, 2003.

LIMA, M. S. D. C.; ANDREOTTI, R.; CAETANO, A. R.; PAIVA, F.; MATOS, M. D. F. C. Cloning and expression of an antigenic domain of a major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 61-66, 2007.

LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W.; AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 84-89.

LOOTS, K.; REVETS, H.; GODDEERIS, B. M. Attachment of the outer membrane lipoprotein (Opr1) of *Pseudomonas aeruginosa* to the mucosal surfaces of the respiratory and digestive tract of chickens. **Vaccine**, v. 26, p. 546-551, 2008.

LOVETT, J. L.; HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 107, p. 33-43, 2000.

LV, Q.; XING, S.; GONG, P.; CHANG, L.; BIAN, Z.; WANG, L.; ZHANG, X.; LI, J. A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 56-65, 2015.

MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; TOMLEY, F.; HEMPHILL, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. Identification of novel rhoptry proteins in *Neospora caninum* by LC/MS-MS analysis of subcellular fractions. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 629-642, 2011a.

MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; AGUARDO-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites. **Parasitology** 138: 472-480, 2011b.

MATA, E.; SALVADOR, A.; IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R. M.; PEDRAZ J. L. Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical research. **Bio-Med Research International**, v. 1, p. e282913.

MATSUSAKI, G.; UMEMURA, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. **Microbiology and Immunology**, v. 51: 1139-1147, 2007.

MILLER, C. M.; QUINN, H. E.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterization of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, p. 620-625, 2002.

MONNEY, T.; DEBACHE, K.; HEMPHILL, A. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* infection. **Animals**, v. 1, p. 306-325, 2011.

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

NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; KELLER, N.; VONLAUFEN, N.; SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; BJÖRKMAN, C.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6483-6494, 2001.

NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. **Vaccine**, v. 19, p. 1710-1716, 2001a.

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v. 19, p. 1381-1390, 2001b.

NISHIKAWA, Y.; MIKAMI, T.; NAGASAWA, H. Vaccine development against *Neospora caninum* infection. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 1-5, 2002.

NOLAN, S.; ROMANO, J.; LUECHTEFELD, T.; COPPENS, I. *Neospora caninum* recruits host cell structures to its parasitophorous vacuole and salvages lipids from organelles. **Eukaryot Cell** 14: 454-473, 2015.

OJO, K. K.; REID, M. C.; SIDDARAMAIAH, L. K.; MÜLLER, J.; WINZER, P.; ZHANG, Z.; KEYLOUN, K. R.; VIDADALA, R. S. R.; MERRITT, E. A.; HOL, W. G. J.; MALY, D. J.; FAN, E.; VAN VOORHIS, W. C.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* calcium-dependent protein kinase 1 is an effective drug target for neosporosis therapy. **PLoS One**, v. 9, p. e92929, 2014.

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

PECKHAM, R. K.; BRILL, R.; FOSTER, D. S.; BOWEN, A. L.; LEIGH, J. A.; COFFEY, T. J.; FLYNN, R. J. Two distinct populations of Bovine IL-17 + T-cells can be induced and WC1 + IL-17 + $\gamma\delta$ T-cells are effective killers of protozoan parasites. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5431-5436, 2014.

PENARETE-VARGAS, D. M.; MÉVÉLEC, M. N.; DION, S.; SÈCHE, E.; DIMIER-POISSON, I.; FANDEUR, T. Protection against lethal *Neospora caninum* infection in mice induced by heterologous vaccination with a MIC1 MIC3 knockout *Toxoplasma gondii* strain. **Infection and Immunology**, v. 78, p. 651-660, 2010.

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

POLLO-OLIVEIRA, L.; POST, H.; ACENCIO, M. L.; LEMKE, N.; TOORN, H.; TRAGANTE, V.; HECK, A. J. R.; ALTELAAR, A F M.; YATSUDA, A. P. Unravelling the *Neospora caninum* secretome through the secreted fraction (ESA) and quantification of the discharged tachyzoite using high-resolution mass spectrometry-based proteomics. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 335-349, 2013.

RAMAMOORTHY, S.; LINDSAY, D. S.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S. M.; DUNCAN, R. B.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N. Vaccination with γ -irradiated *Neospora caninum* tachyzoites protects mice against acute challenge with *N. caninum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53: 151-156, 2006.

RAMAMOORTHY, S.; SANAKKAYALA, N.; VEMULAPALLI, R.; JAIN, N.; LINDSAY, D. S.; SCHURIG, G. S.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *N. caninum* protective antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1531-1538, 2007.

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

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, M. A.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What

is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013.

REID, A. J.; VERMONT, S. J.; COTTON, J. A.; HARRIS, D. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: coccidia differing in host range and transmission strategy. **PLoS Pathogens**, v.8, p. e1002567 2012.

RISCO-CASTILLO, V.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ZABALLOS, A.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; HEMPHILL, A.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Molecular characterisation of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 887-896, 2007.

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

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; LÓPEZ-PÉREZ, I.; RISCO-CASTILLO, V.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M.. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. **Veterinary Research**, v. 43, p. 62-72, 2012.

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

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

SERRUTO, D.; SERINO, L.; MASIGNANI, V.; PIZZA, M. Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens. **Vaccine**, v. 27, p. 3245-3250, 2009.

SOLTANI, M.; SADREBAZZAZ, A.; NASSIRI, M.; TAHMOORESPOOR, M. Cloning, nucleotide sequencing and bioinformatics study of NcSRS2 Gene, an immunogen from Iranian isolate of *Neospora caninum*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, p. 114-127, 2013a.

SOLTANI, M.; NASSIRI, M.; SADREBAZZAZ, A.; TAHMOORESPOOR, M. Cloning, nucleotide sequencing and bioinformatics study of NcGRA7, an immunogen from *Neospora caninum*. **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 5, p. 03-12, 2013b.

SRINIVASAN, S.; MUELLER, J.; SUANA, A.; HEMPHILL, A. Vaccination with microneme protein NcMIC4 increases mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 1046-1055, 2007.

STROHBUSCH, M.; MULLER, N.; HEMPHILL, A.; GREIF, G. NcGRA2 as a molecular target to assess the parasitocidal activity of toltrazuril against *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 135, p. 1065-1073, 2008.

TAKASHIMA, Y.; TAKASU, M.; YANAGIMOTO, I.; HATTORI, N.; BATANOVA, T.; NISHIKAWA, Y.; KITOH, K. Prevalence and dynamics of antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 antigens of *Neospora caninum* in cattle during the gestation period. **Parasitology**, v. 75, p. 1413-1418, 2013.

TALEVICH, E.; KANNAN, N. Structural and evolutionary adaptation of rhoptyr kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 117-134, 2013.

UCHIDA, M.; NAGASHIMA, K.; AKATSUKA, Y.; MURAMAKI, T.; ITO, A.; IMAI, S.; IKE, K. Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite antigens, NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic infection. **Parasitology Research**, v. 112, p. 655-663, 2013.

URA, T.; OKUDA, K.; SHIMADA, M. Developments in viral vector-based vaccines. **Vaccines**, v. 2, p. 624-641, 2014.

WALSH, C. P.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N.; ZAJAC, A. M.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 253-258, 2001.

WASTLING, J. M.; XIA, D.; SOHAL, A.; CHAUSSEPIED, M.; PAIN, A.; LANGSLEY, G. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa – Where's the message? **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 135-143, 2009.

WEBER, F. H.; JACKSON, J. A.; SOBECKI, B.; CHOROMANSKI, L.; OLSEN, M.; MEINERT, T.; FRANK, R.; REICHEL, M. P.; ELLISB, J. T. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p. 99-105, 2013.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed

tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, p. 136-144, 2012.

XU, X.; ZHANG, D.; SUN, W.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; XUE, X.; SHEN, L.; PAN, W. A *Schistosoma japonicum* chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 54-68, 2009.

ZHAO, Z.; DING, J.; LIU, Q.; YU, J.; WANG, M. Immunogenicity of a DNA vaccine expressing the *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 in mice. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 57, p. 51-62, 2009.

Embrapa

Gado de Corte

CGPE 13881



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

