

PABLO ALENCAR PRATES PATARROYO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E ANÁLISE DE LINFONODOS DE OVINOS
DESLANADOS (*Ovis aries*) IMUNIZADOS COM AS SUB UNIDADES
RECOMBINANTES rsNcSAG4 e rsNcGRA1 DERIVADOS DE *Neospora caninum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória

Coorientadores: Joaquin H. Patarroyo Salcedo
Fabrício Luciani Valente

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P294a
2020

Patarroyo, Pablo Alencar Prates, 1992-

Avaliação da resposta imune e análise de linfonodos de ovinos deslanados (*Ovis aries*) imunizados com as sub unidades recombinantes rsNcSAG4 e rsNcGRA1 derivados de *Neospora caninum* / Pablo Alencar Prates Patarroyo. – Viçosa, MG, 2020. 40 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilória.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 34-37.

1. Ruminantes - Doenças. 2. *Neospora caninum*.
3. Resposta imunológica. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896636

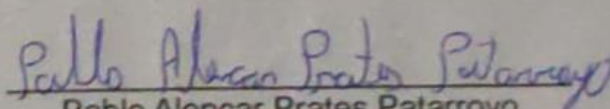
PABLO ALENCAR PRATES PATARROYO

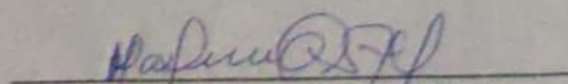
**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E ANÁLISE DE LINFONODOS DE
OVINOS DESLANADOS (*Ovis aries*) IMUNIZADOS COM AS SUB UNIDADES
RECOMBINANTES rsNcSAG4 e rsNcGRA1 derivados de *Neospora caninum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de fevereiro de 2020.

Assentimento:


Pablo Alencar Prates Patarroyo
Autor


Marlene Isabel Vargas Vitoria
Orientadora

*Dedico este trabalho "in memoriam" de minha Mãe Aline Alencar Prates,
Médica Veterinária*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa;

A professora e minha orientadora, Marlene Isabel Vargas Vilória, por todos os ensinamentos durante essa jornada de dois anos;

Ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, que me encorajou a seguir o mestrado e esteve sempre disponível a prestar os mais diversos tipos de auxílios que lhe foram solicitados durante a construção do presente trabalho;

Ao Professor Ricardo Seiti Yamatogi pela ajuda e disposição em colaborar com meus dados;

Aos técnicos do laboratório de patologia veterinária, Adão e Cláudio, pelos ensinamentos práticos sobre o feitiço de lâminas de microscopia;

A empresa Nowavet pela oferta e manutenção dos animais usados durante o experimento;

Ao Médico Veterinário Arthur Neves Passos por todo o auxílio prestado durante as cirurgias de remoção de linfonodo;

A Rosi, secretaria da Pós-Graduação da Veterinária, por sempre me lembrar das mudanças de formulários e data de entrega dos mesmos;

A Cintia, Marcos, Marcio e Matheus que sempre se dispuseram a me ajudar nas partes em que possuía dúvidas ou pouca experiência;

A todos de forma geral, os citados aqui e também os amigos cujos nomes não foram citados, meu grandíssimo agradecimento por me auxiliarem durante todos os percalços dessa jornada que findou-se.

RESUMO

PATARROYO, Pablo Alencar Prates, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Avaliação da resposta imune e análise de linfonodos de ovinos deslanados (*Ovis aries*) imunizados com as sub unidades recombinantes rsNcSAG4 e rNcGRA1 derivados de neospora caninum.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Coorientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Fabrício Luciani Valente.

O *Neospora caninum* é um protozoário parasita intracelular cujo interesse tem aumentado principalmente devido a sua distribuição cosmopolita e pelo impacto econômico relacionado a infecção no rebanho bovino. As principais perdas relacionadas à neosporose bovina estão associadas a abortos e também a redução dos índices produtivos dos animais portadores. Atualmente, não há tratamento ou vacina disponível para o controle desse agente. Dentre as possíveis metodologias de controle, a vacinação é considerada a melhor alternativa para deter o avanço dessa doença, sendo que o desenvolvimento de vacinas de subunidades tem sido visto como uma das tecnologias mais promissoras. Dentre os principais antígenos imunogênicos estão as proteínas NcGRA1 e NcSAG4. Neste estudo foi utilizada a imunização em modelo ovino para avaliar parcialmente a resposta imune de duas subunidades proteicas recombinantes (rsNcSAG4 e rsNcGRA1) construídas através da metodologia de genética reversa de epítomos antigênicos. A resposta a cada imunógeno foi avaliada pela mensuração da cinética de anticorpos, histologia e imuno-histoquímica dos linfonodos após 3 imunizações. Análises histológicas confirmaram a imunogenicidade e capacidade de apresentação dos peptídeos pela formação de centros germinativos, hiperplasia de cordões medulares e presença de células positivas para imuno-histoquímica. Pôde-se também observar, através de ELISA, que a formulação conjunta foi capaz de induzir a produção de anticorpos, o que nos leva a inferir que podem ser usados como candidatos vacinais anti *N. caninum*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*. Neosporose. Resposta Imune.

ABSTRACT

PATARROYO, Pablo Alencar Prates, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Evaluation of the immune response and analysis of lymph nodes of disheveled sheep (*Ovis aries*) immunized with the recombinant subunits rsNcSAG4 and rsNcGRA1 derived from *neospora caninum*.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-advisers: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo and Fabrício Luciani Valente.

Neospora caninum is an intracellular parasitic protozoan whose interest has increased mainly due to its cosmopolitan distribution and the economic impact related to infection in the bovine herd. The main losses related to bovine neosporosis are associated with abortions and also the reduction of the productive indexes of the carrier animals. There is currently no treatment or vaccine available to control this agent. Among the possible control methodologies, vaccination is considered the best alternative to stop the progress of this disease, and the development of subunit vaccines has been seen as one of the most promising technologies. Among the main immunogenic antigens are the proteins NcGRA1 and NcSAG4. In this study, immunization in a sheep model was used to partially assess the immune response of two recombinant protein subunits (rsNcSAG4 and rsNcGRA1) constructed using the antigenic epitope reverse genetics methodology. The response to each immunogen was assessed by measuring the kinetics of antibodies, histology and immunohistochemistry of the lymph nodes after 3 immunizations. Histological analyzes confirmed the immunogenicity and the ability to present peptides through the formation of germinal centers, spinal cord hyperplasia and the presence of positive cells for immunohistochemistry. It was also possible to observe, through ELISA, that the joint formulation was able to induce the production of antibodies, which leads us to infer that they can be used as vaccine candidates against *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*. Neosporosis. Immune Response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	16
Figura 2 – Resumo dos candidatos vacinais testados para prevenção da infecção por <i>N. caninum</i> de 2011 a 2016.	18
Figura 3 – Predição automatizada da estrutura secundária do peptídeo rsNcSAG4, com sítios antigênicos definidos separados em quadrantes vermelhos (acima, onde H: α -hélice; S: folhas- β ; C: coil) e graus de acessibilidade a solventes. Plataforma I-TASSER.....	24
Figura 4 – Predição automatizada da estrutura secundária do peptídeo rsNcGRA1, com sítios antigênicos definidos separados em quadrantes vermelhos (acima, onde H: α -hélice; S: folhas- β ; C: coil) e graus de acessibilidade a solventes. Plataforma I-TASSER.....	25
Figura 5 – Predição automatizada do modelo molecular dos peptídeos rsNcSAG4 (A e B). Modelo molecular de rsNcGRA1 (C e D). Plataforma I-TASSER.	26
Figura 6 – Cinética da resposta humoral anti rsNcSAG4 dos animais do grupo vacinal e grupo controle.	27
Figura 7 – Cinética da resposta humoral anti rsNcGRA1 dos animais do grupo vacinal e grupo controle.	27
Figura 8 – Cortes histológicos de linfonodo de animal controle após três imunizações A(40x) e B(100x) HE, com discreto pronunciamento de cordão medular e centros germinativos.	29
Figura 9 – Corte histológico de linfonodo de animal após três imunizações com formulação conjunta de rsNcGRA1 e rsNcSAG4, A e B(40x) e C (100x). CG- centro germinativo, ZC- zona clara, ZE- zona escura, M- manto, CM- cordão medular. HE.	30
Figura 10 – Corte histológico de linfonodo do grupo vacinal após terceira imunização, apresentando acúmulo de antígenos anti rsNcGRA1 e rsNcSAG4, positivamente marcados por imunoperoxidase indireta.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações teste.....	20
Tabela 2 – Datas de imunização.....	21
Tabela 3 – Cronograma de coleta de amostras.	21

LISTA DE SIGLAS

DCL	Célula Dendríticas Like.
IPI	Imunoperoxidade Indireta.
LBCHV	Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores.
PBS	Phosphate Buffer Solution.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. JUSTIFICATIVA	13
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
4.1 <i>NEOSPORA CANINUM</i> (APICOMPLEXA: COCCIDIA)	14
4.1.2 <i>Biologia do Parasito</i>	15
4.2 HISTÓRIA E SITUAÇÃO ATUAL DE IMUNÓGENOS	16
4.3 RSNCGRA1	18
4.4 RSNCsAG4	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE TESTE	20
5.2 ANIMAIS	20
5.3 IMUNIZAÇÃO	20
5.4 COLETA DE AMOSTRAS	21
5.5 DETERMINAÇÃO DE IGGs TOTAIS POR ELISA INDIRETO	22
5.6 PREPARO DO MATERIAL HISTOLÓGICO	22
5.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA	23
5.8 ANÁLISE DOS DADOS	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA	24
6.2 CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI RSNCsAG4 E RSNCGRA1	26
6.3 HISTOLOGIA DOS LINFONODOS	28
6.4 IMUNOHISTOQUÍMICA	30
7. CONCLUSÃO.....	32
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	33
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXO	38

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum, coccídeo pertencente ao Filo Apicomplexa, é um protozoário parasita intracelular que atrai interesse crescente tendo em vista a sua distribuição cosmopolita e o impacto econômico relacionado à infecção no rebanho bovino. A neosporose bovina é associada à falha reprodutiva e também a redução da produtividade dos animais portadores.

Com o objetivo de prevenir a infecção em ambos os estágios, vários estudos estão sendo conduzidos com a produção de subunidades baseadas em antígenos imunodominantes e outras proteínas envolvidas na adesão, invasão e proliferação intracelular de *Neospora caninum* como candidatos no desenvolvimento de vacinas.

Dentre os principais antígenos imunogênicos estão as proteínas NcGRA1 e NcSAG4. Subunidades recombinantes derivadas de NcGRA1 e NcSAG4 já foram descritas e provaram apresentar eficácia como antígenos e imunógenos usando modelos experimentais (BLANCO *et al.*, 2014; KALKS, 2015; ARAÚJO, 2017). Dessa forma, o próximo passo a ser tomado seria o teste em modelo ruminante.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial imunogênico das subunidades rsNcGRA1 e rsNcSAG4 em modelo ovino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Imunizar ovelhas com os peptídeos e avaliar através de ELISA a produção de anticorpos anti-rsNcGRA1 e anti-rsNcSAG4;

Analisar do ponto de vista histológico os linfonodos pré escapulares dos animais imunizados, e comparar os animais vacinais e controle através de imunohistoquímica e hematoxilina e eosina.

3. JUSTIFICATIVA

Calcula-se que as perdas médias estimadas devido aos abortos induzidos em bovinos são de 1 bilhão de dólares, podendo atingir a marca de 2 a 4 bilhões de dólares por ano nos dez países de maiores indústrias de gado no mundo. Estima-se que a neosporose seja responsável por gerar perdas anuais a indústria de laticínios nos Estados Unidos no valor 546 milhões de dólares, e na indústria de carne cerca de 111 milhões de dólares (MCALLISTER, 2016).

No Brasil, as perdas anuais somam aproximadamente 51,3 milhões de dólares e 101,0 milhões dólares nas indústrias de laticínios e carne, respectivamente (REICHEL *et al.*, 2013). O que se deve, principalmente, à ausência de tratamento efetivo para a cura e reconhecimento de anticorpos anti-*N.caninum*, assim como incapacidade de desenvolver resposta humoral (BLANCO *et al.*, 2014; KALKS, 2015; ARAÚJO, 2017).

Os mecanismos envolvidos na resposta imune protetora induzida por *N. caninum* tem sido estudado utilizando principalmente modelos experimentais, sendo os murinos o modelo de predileção (HEMPHILL; MÜLLER, 2015). Tendo em vista os resultados obtidos por Fidelis (2018), nos quais os camundongos imunizados com a formulação conjunta das proteínas apresentaram níveis séricos de anticorpos, ausência de abortos nas ninhadas e aspectos de linfonodos compatíveis com uma resposta imune protetora, o próximo passo foi usar um modelo animal ruminante para mensuração de resposta imune de forma que se pudesse obter uma resposta similar ao que seria na espécie alvo.

Diante disso, foi usado para este experimento o modelo ovino, devido a relação custo benefício se levados em consideração os fatores de tempo de gestação, espaço necessário para alocar os animais, custos de alimentação e semelhanças reprodutivas e de sistema imune com o modelo bovino (MORENO *et al.*, 2012).

Dentre as alternativas viáveis atuais para o controle, o desenvolvimento de vacinas de subunidades tem sido visto como uma das melhores opções de controle dessa enfermidade. Muitas proteínas de *Neospora caninum* têm sido relatadas como possíveis alvos antigênicos (INNES *et al.*, 2002; ELLIS *et al.*, 2008; HEMPHILL; MÜLLER, 2015) e dentre os principais antígenos imunogênicos estão as proteínas

NcGRA1 e NcSAG4, das quais derivam subunidades recombinantes que já foram descritas e provaram apresentar eficácia no desenvolvimento de resposta imune.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 *NEOSPORA CANINUM* (APICOMPLEXA: COCCIDIA)

O agente etiológico da doença polissistêmica neosporose é um parasita intracelular formador de cisto tecidual. Esse agente é caracterizado por um ciclo de vida heteróxico facultativo complexo, que tem como hospedeiros definitivos os canídeos nos quais a reprodução sexuada ocorre, e uma diversidade de hospedeiros intermediários nos quais a replicação assexuada acontece (DONAHOE *et al.*, 2015).

Desde 1990, o *N. caninum* tem surgido como uma das causas mais frequentes de aborto em bovinos ao redor em todo o mundo, e com o decorrer dos anos têm sido estudado para um melhor entendimento de sua biologia (GOODSWEN *et al.*, 2013, CERQUEIRA-CEZAR *et al.*, 2017).

O parasito teve sua primeira descrição realizada em 1984, como um protozoário indefinido encontrado em amostras teciduais de cães com paralisia e morte precoce (BJERKÅS *et al.*, 1984). Em 1988, foi identificado em cães com infecções erroneamente diagnosticadas como sendo por *Toxoplasma gondii*, apicomplexa que possui morfologia e desenvolvimento semelhantes ao ainda não nomeado *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988).

No Brasil, Brautigam *et al.* (1996) detectaram pela primeira vez anticorpos anti *N. caninum* em soro de bovinos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. O primeiro caso de aborto no Brasil causado por esse agente foi observado no estado da Bahia e relatado por Gondim *et al.* (1999). Estudos de prevalência de anticorpos têm revelado a presença de *N. caninum* em várias regiões do mundo, incluindo Austrália, Nova Zelândia, Europa, Coréia, Japão Tailândia e Estados Unidos (DUBEY; SCHARES, 2011).

Segundo Donahoe *et al.* (2015), os hospedeiros definitivos do protozoário são o cão (*Canis lupus familiaris*), o lobo cinzento (*Canis lupus*), o coiote (*Canis latrans*) e o dingo (*Canis lupus dingo*). O bovino é o hospedeiro intermediário de maior impacto econômico, ainda, várias outras espécies de vertebrados de sangue

quente já foram incluídas nesse grupo, tais como ovelhas (*Ovis aries*) e cervídeos como o cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (GONDIM, 2006; DUBEY *et al.*, 2011; ALMERÍA, 2013).

4.1.2 Biologia do Parasito

Os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos são os três estágios infecciosos de *N. caninum*. Os taquizoítos e os bradizoítos se desenvolvem nos tecidos dos hospedeiros intermediários, e os oocistos que contém os esporozoítos são excretados nas fezes (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Oocisto é o estágio resistente ambientalmente, apresentando viabilidade por longos períodos sendo resistente aos desinfetantes de uso comum, sendo viável por até 108 dias em ambiente ácido, mas podem ser inviabilizados por aquecimento a 100°C por um minuto, ou com o uso de hipoclorito de sódio 10% por uma hora (UZÊDA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2011).

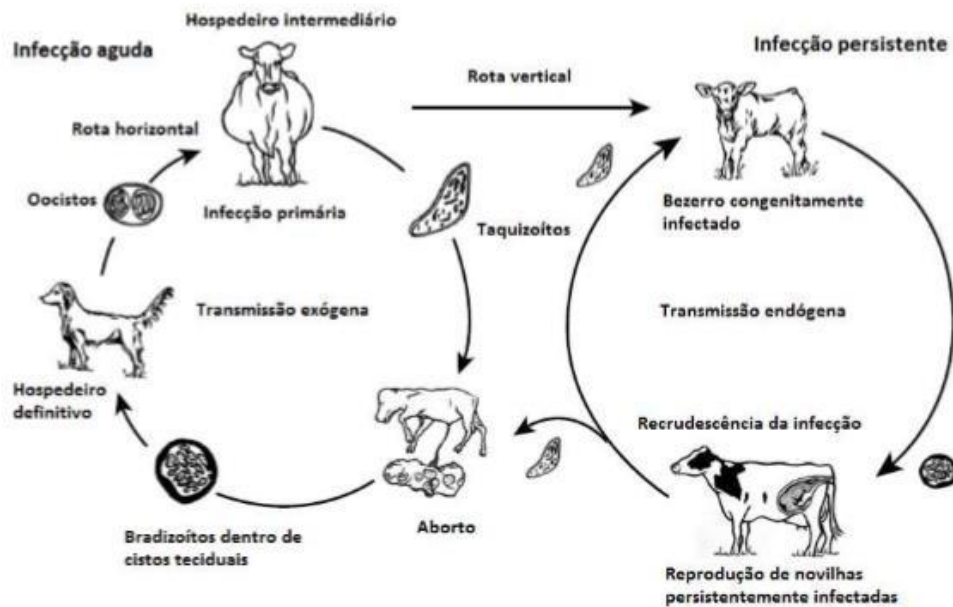
O ciclo do protozoário *N. caninum*, tal como demonstrado na figura 1, tem início a partir do ponto em que oocistos não esporulados são eliminados nas fezes pelos canídeos infectados. No ambiente, os oocistos esporulam e passam a apresentar dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um. Os hospedeiros intermediários, como os bovinos, podem infectar-se ao ingerir oocistos esporulados presentes em pastagens ou água contaminadas. Os esporozoítos são liberados no intestino, onde ocorre liberação e posterior desenvolvimento dos oocistos em taquizoítos após penetrarem a parede do intestino.

Os taquizoítos, no ambiente intracelular, ficam localizados dentro do vacúolo parasitóforo, onde se replicam de forma assexuada por endodiogenia, processo pelo qual duas células filhas desenvolvem-se dentro da célula do parasito mãe (DUBEY *et al.*, 2002). Os taquizoítos possuem o potencial de infectar diferentes tecidos, multiplicar-se e diferenciar-se em bradizoítos que formarão os cistos teciduais. Os bradizoítos podem replicar-se lentamente também por endodiogenia. Os cistos são usualmente encontrados em células neurais ou musculares e podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem causar manifestações clínicas (GOODSWEN *et al.*, 2013).

O ciclo de vida é completado quando um hospedeiro definitivo ingere o cisto tecidual proveniente de um hospedeiro intermediário, os bradizoítos multiplicam-se

de forma assexuada, e em seguida ocorre a formação de micro e macrogametas. Após a fecundação dos macrogametas formam-se os oocistos que serão eliminados nas fezes (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Neospora caninum*.



Fonte: Adaptado de Guido *et al.* (2016)

O modo de transmissão que compreende a passagem entre hospedeiro definitivo – intermediário – definitivo é referido como horizontal, e o modo de transmissão que compreende a passagem de mãe para feto é chamado transplacentário ou vertical (DUBEY *et al.*, 2007). A transmissão horizontal ocorre através da ingestão de oocistos eliminados pelo hospedeiro definitivo. Já a transmissão vertical pode ser do tipo transplacentária exógena, que ocorre após a infecção primária de fêmea por ingestão de oocistos durante gravidez; e transplacentária endógena, que ocorre em uma fêmea infectada persistentemente após recrudescência da infecção durante a gravidez, podendo abortar ou transmitir a doença em gestações sucessivas (DUBEY *et al.*, 2007).

4.2 HISTÓRIA E SITUAÇÃO ATUAL DE IMUNÓGENOS

Para a escolha de um candidato vacinal apropriado, algumas diretrizes tais como prevenir a proliferação de taquizoítos e sua disseminação no rebanho durante

a gestação, prevenir/reduzir a excreção de oocistos pelos hospedeiros definitivos e impedir a formação de cistos teciduais em hospedeiros intermediários devem ser levadas em conta (HEMPHILL; MÜLLER, 2015).

Visando a obtenção de um imunógeno adequado que estimule corretamente o balanço da resposta Th1/Th2/Th17, ao longo de décadas um esforço considerável foi despendido na pesquisa de produção de imunógenos contra *N. caninum*. Dentre as diversas opções de vacina podemos ressaltar diferentes abordagens, como parasito vivo atenuado, lizados do protozoário e vacinas de subunidades contendo antígenos nativos ou recombinantes na forma de proteínas purificadas, ou ainda vacinas de DNA (HEMPHILL; MÜLLER, 2015).

A primeira vacina comercial chamada Bovilis® Neoguard continha taquizoítos inativados de *N. caninum* com o adjuvante SPUR®, entretanto ela foi retirada do mercado provavelmente devido a uma eficácia baixa nos testes de campo, tanto em prevenir o aborto quanto em evitar a infecção transplacentária. Isso porque, apesar da imunização induzir altas taxas de igG1, IFN γ e de resposta linfoproliferativa, após o desafio com taquizoítos a resposta imune caiu para níveis indetectáveis, dessa forma a formulação em questão falhou ao prevenir a infecção fetal (GOODSWEN *et al.*, 2013).

Mais recentemente, um segundo estudo com o objetivo de reavaliar a eficácia da Bovilis® Neoguard foi conduzido na Nova Zelândia, concluindo que a vacinação após a concepção reduziu em 61% a taxa de abortos em uma das cinco propriedades testadas, porém alto índice de transmissão transplacentária podem vir a indicar um elevado risco de morte embrionária devido a aplicação (WESTON; HEUER, 2012).

As vacinas vivas demonstram boa eficácia, porém agregam sérias desvantagens em termos de segurança, custo de produção e estabilidade (ROJO-MONTEJO *et al.*, 2012). Vacinas com parasitas mortos são mais seguras, contudo tem falhado em estimular uma resposta protetora eficiente e evitar a transmissão vertical. Vacinas de subunidade são as mais intensivamente estudadas, apresentando vantagens quanto ao custo de produção, processamento e estocagem, estabilidade e meia-vida (MONNEY *et al.*, 2011).

Atualmente os principais alvos vacinais em potencial são aqueles envolvidos nas interações físicas entre o parasita e a célula hospedeira, principalmente associados com a maquinaria de adesão/invasão celular como antígenos de

superfície, componentes do micronema, proteínas de ropria, proteínas de grânulo denso e componentes da membrana do vacúolo parasitóforo (MONNEY; HEMPHILL, 2014). O candidatos vacinais testados para prevenção da infecção por *N. caninum* a partir do ano de 2011 estão apresentados de maneira sucinta na figura 2.

Figura 2 – Resumo dos candidatos vacinais testados para prevenção da infecção por *N. caninum* de 2011 a 2016.

Candidato vacinal	Ano
Nc expressando NcSAG4	2011
Ciclofilina, SRS2 (r)	2011
MIC1-MIC3-ROP2 (quimera, r)	2011
Taquizoítos vivos isolado Nc-Spain	2012
GRA7, SAG4, BSR4, SRS9 (r)	2012
Taquizoítos mortos (Nc-1)	2012
Extrato de taquizoítos	2012
SRS2-GRA 7-fusão em adenovírus	2013
BAG1, BSR4, MAG1, SAG4 (r)	2013
PDI (r)	2013
GRA 7 (r)	2013
SAG1, SRS2, MIC3 (BmNPV)	2014
SAG1+Hsp20+GRA7	2014
NcSAG1, NcSRS2 and NcMIC3 (r)	2015
Extrato solúvel de taquizoítos (Nc-1)	2015
Taquizoítos vivos isolado NcIs491	2015
Extrato de taquizoítos (Nc-1) + NcMP	2016
NcPRO (r)	2016

(r): recombinante; PDI: proteína dissulfeto isomerase; NcMP: proteínas de superfície de *N. caninum*

Fonte: Adaptado de Hemphill e Muller (2015).

4.3 rsNcGRA1

Um das proteínas de interesse para desenvolvimento de vacinas contra *N. caninum* é a NcGRA1. A sequência nomeada NcGRA1 (GenBank: AF199030.1) foi descrita por (ATKINSON *et al.*, 2001). É um antígeno de grânulo denso homólogo à GRA1 de *T. gondii*, capaz de ser reconhecida por IgG de bovinos infectados por *N. caninum* encontrada principalmente durante a fase de taquizoítos, quando podem ser observadas nas regiões posterior e anterior do citoplasma parasitário, e em

menor escalada na fase de bradizoíto, podendo observá-las nas zonas periféricas do vacúolo parasitóforo.

A proteína NcGRA1 aparenta ter envolvimento com a formação do cisto tecidual durante o estágio de mudança, pois pode ser observada durante a secreção e acumulação de grânulos densos que se acumulam nas bordas do vacúolo para formar a parede do cisto (VONLAUFEN *et al.*, 2004).

A subunidade proteica rsNcGRA1 foi desenhada pela metodologia de genética reversa baseada em epítomos da proteína NcGRA1 de *N. caninum*. A subunidade possui 84 aminoácidos, massa molecular de 8,9 kDa, ponto isoelétrico de 5,1 e cinco sítios teóricos de O glicosilação (calculado por School of Chemistry - University of Nottingham). Os genes que codificam a subunidade foram desenhados com códons preferenciais para *Komagataella (P) pastoris* no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) da Universidade Federal de Viçosa.

4.4 rsNcSAG4

A subunidade proteica recombinante prNcSAG4 foi construída através da seleção de epítomos imunogênicos da proteína NcSAG4 (GenBank: DJ068696.1), descrita por Garcia *et al.* (2007) e depositada em 2008. A proteína NcSAG4 pertence ao grupo de antígenos de superfície (SAG) semelhantes aos antígenos descritos em *Toxoplasma gondii*. O peptídeo desenhado está composto de nove sequências aminoacídicas de diferentes partes da proteína e foram reunidos em uma sequência única com 102 aminoácidos, ponto isoelétrico 8,44; massa molecular 10,5 kDa e três sítios de O-glicosilação. Os genes que codificam a subunidade foi desenhado com códons preferenciais para *Komagataella (P) pastoris*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE TESTE

As subunidades proteicas utilizadas rsNcGRA1 e rsNcSAG4 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) da Universidade Federal de Viçosa, e utilizados respectivamente como veículo e adjuvante PBS e saponina, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Formulações teste.

Grupo	Formulação do Inóculo
I	PBS + 400µg saponina + 150µg prNcGRA1 + 150µg prNcSAG4
II	PBS + 400µg saponina

Fonte: Autor (2020).

5.2 ANIMAIS

Os animais foram cedidos pela Nowavet e ficaram abrigados durante toda a duração do experimento nas instalações dessa empresa. Foram usados um total de seis ovinos, fêmeas, adultas, híginas e sem predileção por idade, comprovadamente livres, por sorologia (Dot-ELISA), da infecção por *Neospora caninum*.

5.3 IMUNIZAÇÃO

Para o procedimento de imunização tal como descrito na tabela três, as ovelhas foram divididas em dois grupos de animais: quatro animais para o grupo vacinal (I) e dois animais para o grupo controle (II). Foram realizadas três inoculações via subcutânea, a cada 28 dias, conforme apresentado na tabela 2. Sendo considerado o dia um (D1) do experimento o momento da primeira imunização. Cada dose foi constituída de um volume final de 2mL da respectiva formulação teste.

Tabela 2 – Datas de imunização.

Dia Experimental	Imunização	Dose	Via
D1	1ª dose	2 ml	Subcutânea
D28	2ª dose	2 ml	Subcutânea
D56	3ª dose	2 ml	Subcutânea

Fonte: Autor (2020).

5.4 COLETA DE AMOSTRAS

O cronograma de coleta de amostras está descrito na tabela 3. Foram realizadas, por punção da veia jugular, coletas semanais de sangue com intervalos de sete dias. Para as coletas foram utilizados tubos vacutainer sem anticoagulante que foram acondicionados em geladeira e posteriormente desorados. Os linfonodos pré escapulares foram coletados por incisão no membro torácico, local onde foi realizada a linfadenectomia, seguindo as condutas do comitê de ética.

Tabela 3 – Cronograma de coleta de amostras.

Dia de Coleta	Número de Amostras	Descrição da Amostras
D 1	8	Seis amostras de sangue e um linfonodo de cada grupo
D 7	6	Seis amostras de sangue
D 14	8	Seis amostras de sangue e um linfonodo de cada grupo
D 21	6	Seis amostras de sangue
D 28	6	Seis amostras de sangue
D 35	8	Seis amostras de sangue e um linfonodo de cada grupo
D 42	6	Seis amostras de sangue
D 49	6	Seis amostras de sangue
D 56	6	Seis amostras de sangue
D 63	8	Seis amostras de sangue e um linfonodo de cada grupo

Fonte: Autor (2020).

5.5 DETERMINAÇÃO DE IGG TOTAL POR ELISA INDIRETO

Os soros coletados foram utilizados para determinação da resposta imune humoral e por meio da técnica de ELISA indireto descrita por Araújo (2017).

Para isso, placas com 96 poços (NUNC ®) foram sensibilizadas com 1,0 µg/poço das subunidades rsNcGRA1 e rsNcSAG4 separadamente, em 200 µL tampão carbonato (pH 9,6; 0,159 g Na₂CO₃; 0,293 g NaHCO₃; H₂O deionizada para 100 mL). Após 12 horas de adsorção a 4°C, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (9,0 g de NaCl; 0,5 mL Tween 20, H₂O deionizada para 1000 mL).

Foi adicionada a solução de bloqueio – caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25 g NaCl; 0,64 g Na₂HPO₄; 0,068 g NaH₂PO₄.H₂O; H₂O deionizada q.s.p. 500 mL) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as placas foram lavadas quatro vezes e foi adicionado 200µl/poço dos soros dos animais do experimento diluídos 1:200 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50 µL de Tween 20), após o tempo de incubação de duas horas à 37°C. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e procedeu-se à incubação, por duas horas, à 37°C, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgGs de ovelha marcado com peroxidase – Sigma®. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e foi adicionado solução reveladora no volume de 200 µL/poço, composta de 20mL de tampão substrato (7,19 g Na₂HPO₄, 5,19 g ácido cítrico e H₂O deionizada q.s.p. 1000mL), 6mg de O. P. D. (θ-fenildiaminobenzeno) e 3,75µL de H₂O₂, por um período de 20 minutos em local escuro, a 37°C. A leitura foi realizada imediatamente após a última incubação em leitor de ELISA (Thermo Scientific) a 450nm.

5.6 PREPARO DO MATERIAL HISTOLÓGICO

Os linfonodos pré escapulares foram coletados por incisão no membro torácico local, onde foi realizada a linfadenectomia seguindo as condutas do Comitê de Ética, e foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 12 horas. Foram desidratados em soluções alcóolicas a 70, 80 e 90%, por uma hora em cada, a temperatura ambiente e posteriormente dois banhos de uma hora cada em álcool absoluto, também em temperatura ambiente.

Após esse passo foram diafanizados em xilol por duas vezes de 30 minutos, e incluídos em parafina (60°C) em três banhos de 30 minutos cada e emblocados. Finalizado esse processamento, o material foi então processado em micrótomo Leica® RM 2245, no qual cortes dos tecidos incluídos com 4 µm de espessura foram confeccionados e colocados sobre lâminas de vidro para coloração de Hematoxilina e Eosina (H & E). Estas foram utilizadas para observação da morfologia dos linfonodos, dando atenção à formação e características dos centros germinativos nos animais imunizados.

5.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

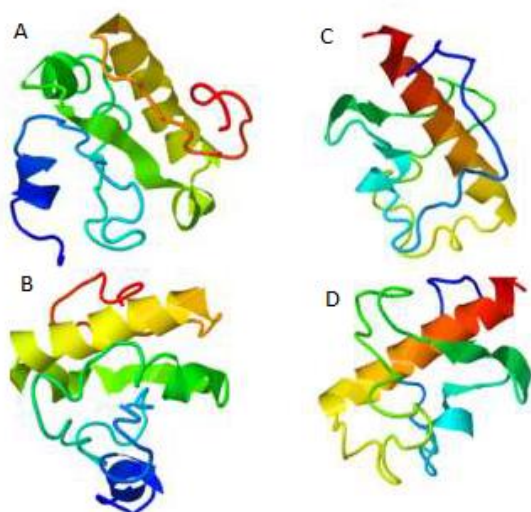
Para a detecção dos antígenos vacinais *in situ* foi utilizada a técnica de imunoperoxidase indireta (IPI), e posterior análise histológica a procura de anti corpos anti rsNcGRA1 e anti rsNcSAG4. Para isso, seguiu-se sequência de procedimentos descritos no Anexo 1. No processamento foi utilizado para diluição dos reagentes PBS pH 7,4.

5.8 ANÁLISE DOS DADOS

A média da densidade óptica (OD) foi calculada por grupo e por dia de coleta. As diferenças entre os grupos (vacinal vs controle e vacinal vs vacinal) foi calculada empregando a prova t de student. Para isso foi calculada a homogeneidade da variância usando a prova de F ao nível de probabilidade de $p < 0.05$. Uma vez conferido o valor de F foi feita a prova de t de student.

quais maiores valores condizem com um modelo de maior confiança. Por fim, os modelos selecionados para rsNcSAG4 e rsNcGRA1 apresentaram scores de confiança -3,70 e -3,45, respectivamente. As avaliações dos resultados de predição (Figura 5) sugerem que várias regiões antigênicas dos peptídeos rsNcGRA1 e rsNcSAG4 exibem características que favorecem seu reconhecimento e desenvolvimento de respostas imunológicas, suportando assim análises posteriores quanto a imunogenicidade e eficácia como candidatos vacinais anti *N. caninum*.

Figura 5 – Predição automatizada do modelo molecular dos peptídeos rsNcSAG4 (A e B). Modelo molecular de rsNcGRA1 (C e D). Plataforma I-TASSER.

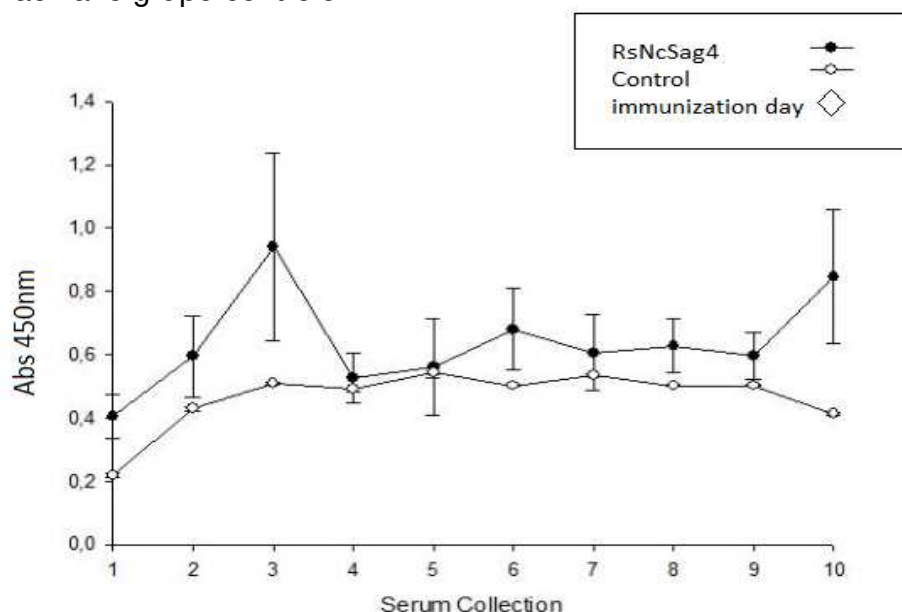


Fonte: Autor (2020).

6.2 CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI rsNcSAG4 E rsNcGRA1

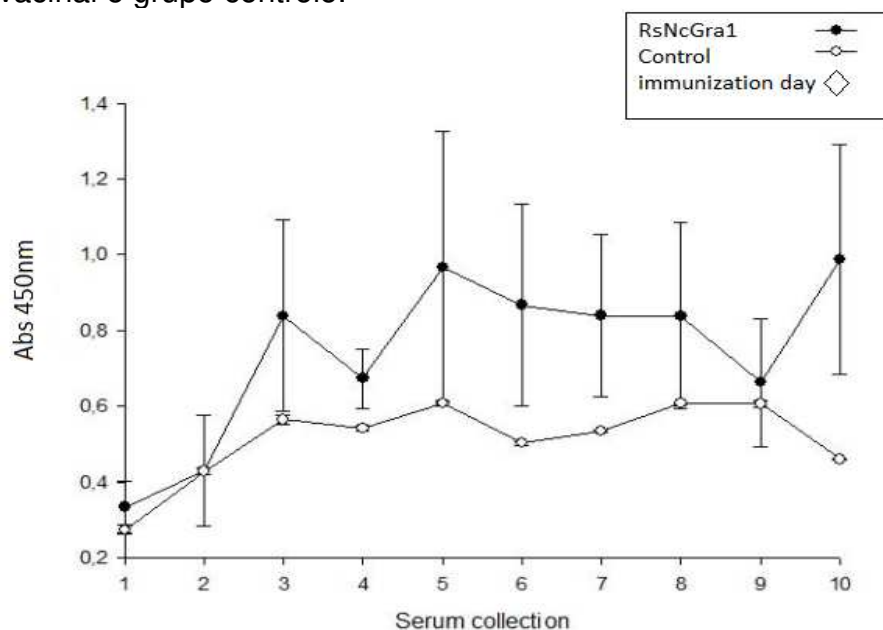
A evolução da resposta humoral do grupo vacinal anti rsNcSAG4 e rsNcGRA1 representadas nas figuras 6 e 7 pôde ser observada nas amostras obtidas durante as dez coletas. Para confiança de 95%, verificou-se que em ambos os grupos o título de anticorpos foi considerado positivo para resposta humoral a partir da segunda coleta para rsNcSAG4 e a partir da terceira para rsNcGRA1, quando a média das absorvâncias do grupo superou o ponto de corte calculado com base na quarta coleta nos grupos controle. Todos os animais do grupo adjuvante +PBS apresentaram valores de absorvância menores que o valor do ponto de corte calculado para cada grupo.

Figura 6 – Cinética da resposta humoral anti rsNcSAG4 dos animais do grupo vacinal e grupo controle.



Fonte: Autor (2020).

Figura 7 – Cinética da resposta humoral anti rsNcGRA1 dos animais do grupo vacinal e grupo controle.



Fonte: Autor (2020).

Estatisticamente ao nível de $p < 0.05$ houve diferença entre a IgG dos animais imunizados e os animais do grupo controle.

Os resultados de cinética humoral apontam que as duas subunidades, rsNcGRA1 e rsNcSAG4, são antigênicas com título de anticorpos semelhantes em algumas coletas. Pode-se observar também que apesar dos valores similares na terceira coleta, o pico antigênico da rsNcGRA1 ocorreu na terceira coleta, já o pico

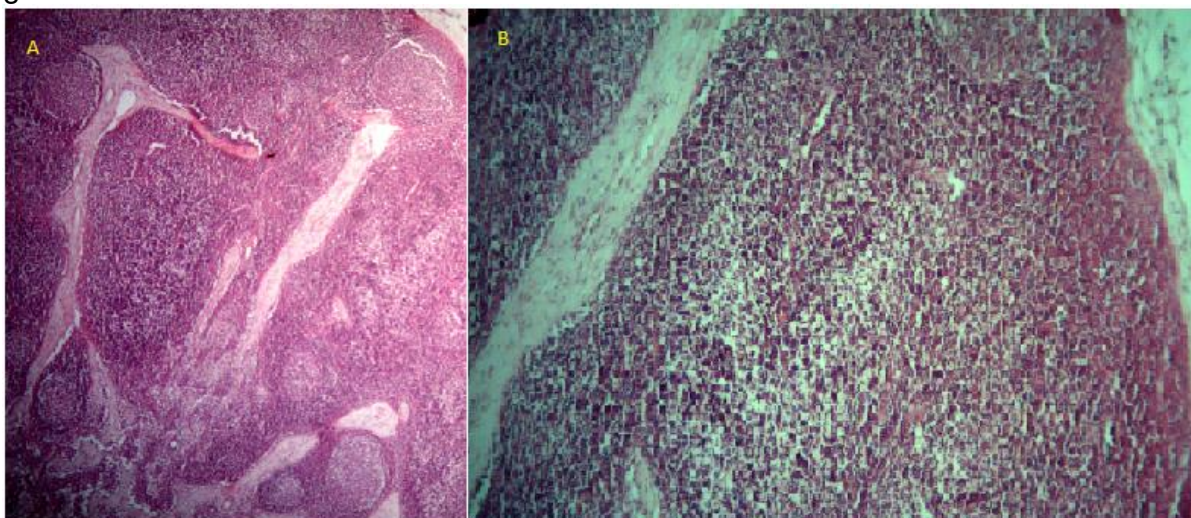
de rsNcSAG4 foi observado apenas durante a quinta coleta. Esse fato possivelmente pode ser explicado devido a uma maior facilidade de interações se comparado a rsNCSAG4, como proposto a partir da avaliação tridimensional de ambas as sequências. Dados similares quanto aos picos antigênicos, nos quais ambos atingem o pico durante a terceira coleta, também foram obtidos em experimento similar, em modelo murinho, por Araújo (2017).

Pese ao observado em sílice, nas figuras 3 e 4 a rsNcGRA1 apresenta maiores regiões em coil, o que pode significar maior facilidade de interação e capacidade de promover resposta imunológica. Isso não foi observado no presente trabalho, no que tange à produção de anticorpos, posto que estatisticamente não houve diferença nos títulos de anticorpos entre as subunidades. Podemos inferir que possivelmente, a composição das subunidades no imunógeno inoculado são apresentadas ao sistema monocítico fagocitário de forma similar.

6.3 HISTOLOGIA DOS LINFONODOS

Os linfonodos dos animais do grupo vacinal contendo a formulação conjunta de imunógenos, e o grupo controle contendo saponina e PBS foram avaliados para presença de alterações características de apresentação antigênica, tais como aumento do tamanho dos centros germinativos e hiperplasia de cordões medulares. O grupo controle apresentando na figura 8 apresentou morfologia condizente com a esperada, de morfologia homogênea, não apresentando hiperplasia de centros germinativos ou cordões medulares.

Figura 8 – Cortes histológicos de linfonodo de animal controle após três imunizações A(40x) e B(100x) HE, com discreto pronunciamento de cordão medular e centros germinativos.



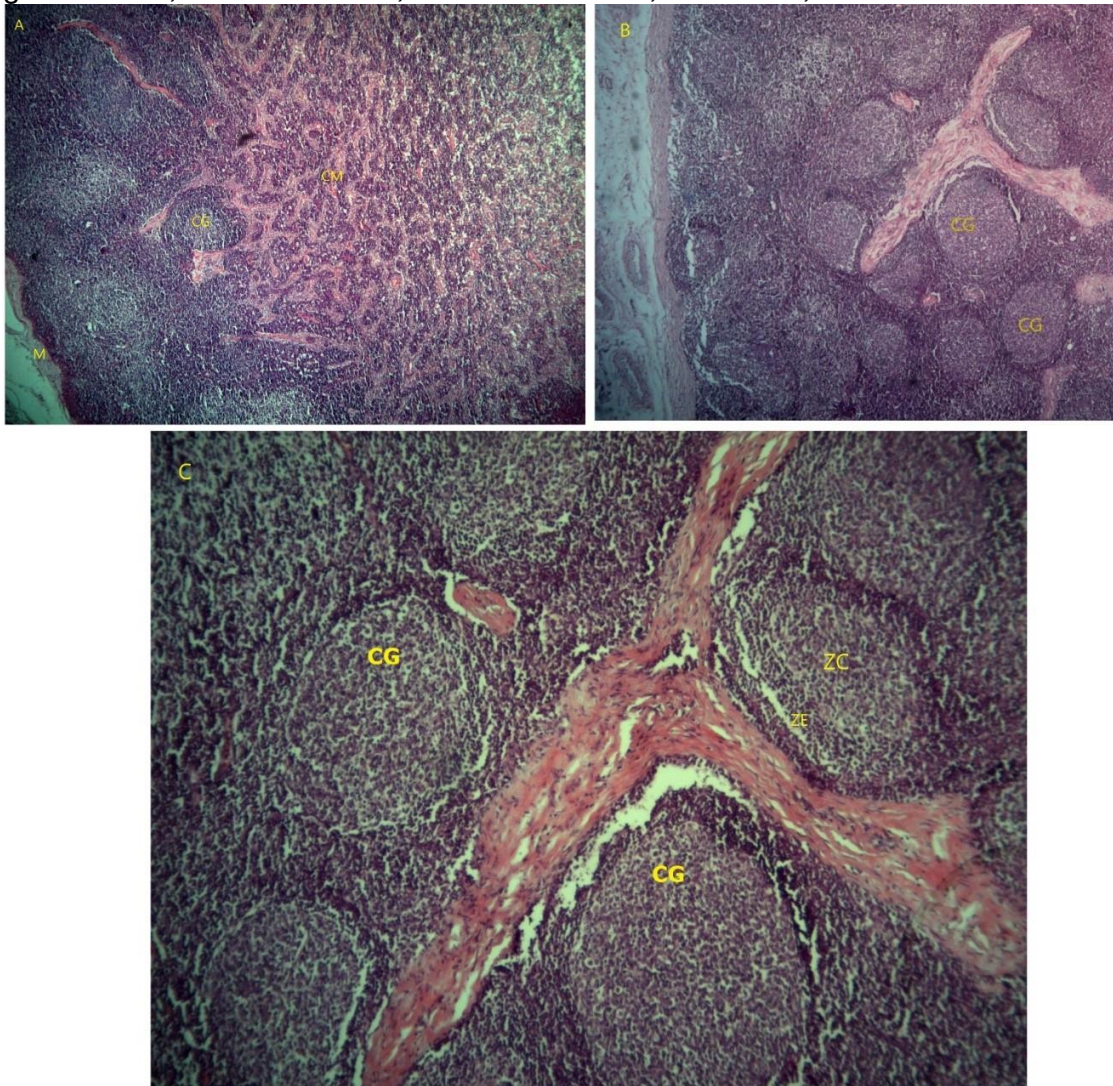
Fonte: Autor (2020).

O grupo vacinal, descrito na figura 9, contudo, apresentou hiperplasia das regiões para corticais com presença de centros germinativos bem definidos, alterações típicas quando ocorre a expansão clonal, resultante de um estímulo fornecido por um imunógeno T dependente.

As observações histológicas nos linfonodos dos animais imunizados neste estudo estão em consonância com os resultados de Tafur *et al.* (2013) no quais também foram encontradas características similares em linfonodos de bovinos imunizados com um peptídeo recombinante (rSBm7462).

A formação e aumento dos centros germinativos está atrelada à interação entre células T e B. Após o estímulo fornecido pelas células T, as células B *naive* sofrem diferenciação através da expansão clonal e posterior apoptose. Dessa forma, os achados histológicos e sorológicos nos levam a crer que ocorreu uma devida apresentação dos antígenos pelas células dendríticas, e por consequência um aumento na produção de anticorpos contra o parasito.

Figura 9 – Corte histológico de linfonodo de animal após três imunizações com formulação conjunta de rsNcGRA1 e rsNcSAG4, A e B(40x) e C (100x). CG- centro germinativo, ZC- zona clara, ZE- zona escura, M- manto, CM- cordão medular. HE.

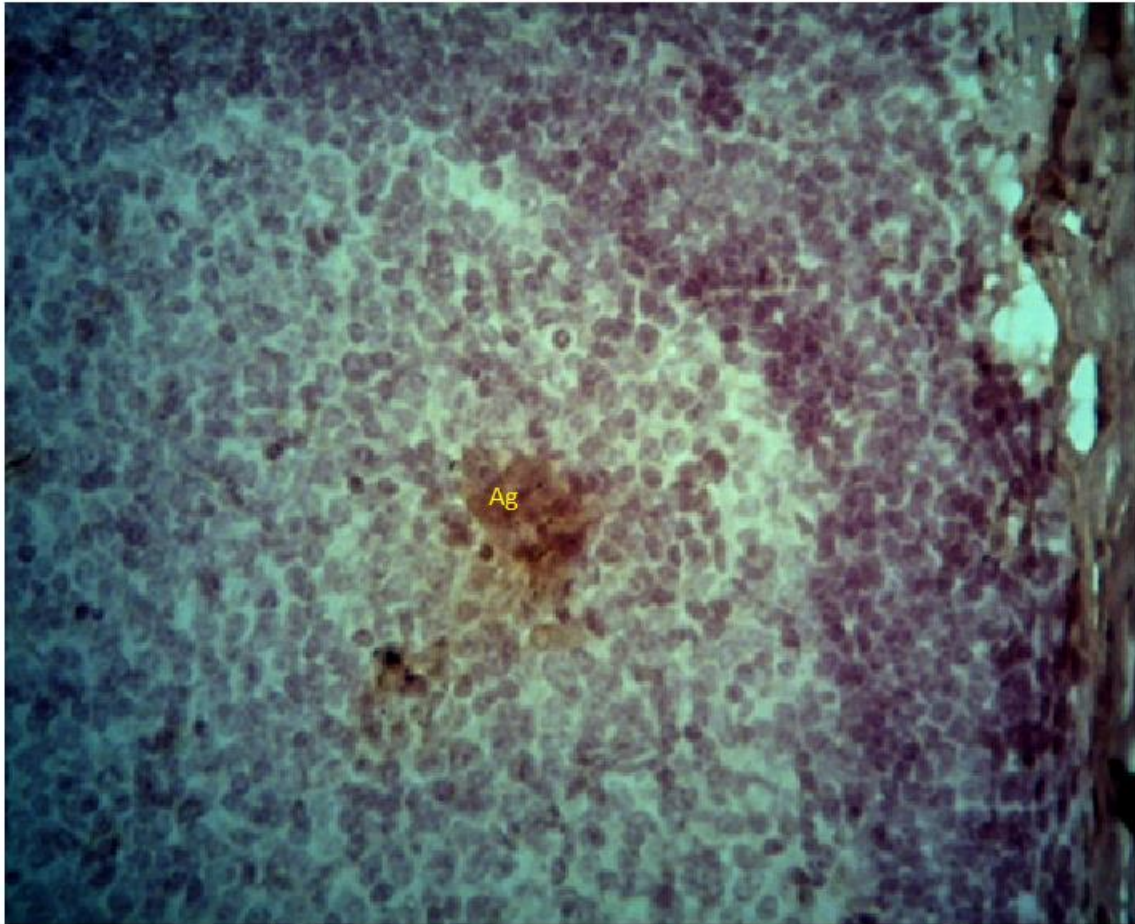


Fonte: Autor (2020).

6.4 IMUNOHISTOQUIMICA

A presença dos antígenos marcados positivamente pela técnica de imunoperoxidase indireta foi identificada nos linfonodos do grupo vacinado com a formulação conjunta (rsNcSAG4 e rsNcGRA1), coletados após a terceira imunização. Estes achados indicam que os antígenos são reconhecidos por células dendríticas like (DCL) (Figura 10), que interagem com células linfocíticas e geram respostas específicas, concordando com os relatos observados por Patarroyo *et al.* (2009) quando utilizaram o peptídeo sintético SBm7462, e Tafur *et al.* (2013), que utilizaram o peptídeo rSBm7462.

Figura 10 – Corte histológico de linfonodo do grupo vacinal após terceira imunização, apresentando acúmulo de antígenos anti rsNcGRA1 e rsNcSAG4 (Ag) (100X), positivamente marcados por imunoperoxidase indireta.



Fonte: Autor (2020).

7. CONCLUSÃO

A formulação conjunta das subunidades proteicas recombinantes rsNcSAG4 e rsNcGRA1 provou ser capaz de desenvolver resposta imune com produção de anticorpos em ovelhas, provando ser antigênica. Tais afirmações são respaldadas pela presença de centros germinativos, hiperplasia de cordões medulares e resposta positiva a imunoperoxidase indireta nos linfonodos das ovelhas imunizadas, quando comparado ao dos animais controle.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Mensurar as interleucinas, como TNF α , IL-12, IL-4, IL-17 e IFN, entre outras, para caracterizar a resposta imune;
- Citometria de Fluxo para tipificar as células da resposta imune, elicitada pela aplicação do imunógeno;
- Desafio de proteção em modelo ruminante (*Ovis aries*) para verificar a capacidade de proteção conferida pela vacinação frente ao desafio.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S. *Neospora caninum* and Wildlife. **ISRN Parasitology**, v. 2013, p. 23, 2013.

ALVES, A. F.; BANDINI, L. A.; NISHI, S. M.; SOARES, R. M.; DRIEMEIER, D.; ANTONIASSI, N. A. B. et al. Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. **J Parasitol**, v. 97, p.135-139, 2011.

ATKINSON, R. A.; RYCE, C.; MILLER, C. M. D.; BALU, S.; HARPER, P. A. W; ELLIS, J. T. Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 67-71, 2001.

ARAÚJO, L. S. **Avaliação dos peptídeos recombinantes rsnrcgr1 e rsnrcsag4 como antígenos para imunodiagnóstico e candidatos vacinais anti-*Neospora caninum***. 2017. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

BJERKÅS, 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.

BLANCO, R. D.; FIDELIS, C. F.; ARAUJO, L. S.; HENAO, A. M.; CARDONA, J. A.; GUIMARÃES, J. D.; VARGAS, M. I.; PATARROYO, J. H. Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 723-727, 2014.

BRAUTIGAM, F. E.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. Resultados de levantamento sorológico para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. Campo Grande: Sociedade Matogrossense do Sul de Medicina Veterinária. **Anais Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, p. 284. 1996.

CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal**, v. 26, n. 3, p. 253-279, Sept. 2017.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 216-238, 2015

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

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. 323367, 2007.

DUBEY, J.; CARPENTER, J.; SPEER, C.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 1, n. 192(9), p. 1269-85, 1988.

ELLIS, J.; MILLER, C.; QUINN, H.; RYCE, C.; REICHEL, M. P. Evaluation of recombinant proteins of *Neospora caninum* as vaccine candidates (in a mouse model). **Vaccine**, v. 26, n. 47, p. 5989-5996, 2008.

FIDELIS, C. F. **Avaliação da resposta imunológica e prevenção da infecção congênita em camundongos balb/c imunizados com os peptídeos recombinantes rsncsag4 e rsncgra1 derivados de *Neospora caninum***. 2018. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

GARCIA, A. F.; MORA, L. M. O. Use of gene NcSAG4 for the diagnosis and prevention of neosporosis and as a marker for analysis of the pathogenesis. **Journal Patent JP 2007516705-A**, Madrid Complutense University, 2007.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 35-35, 1999.

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, n. 1, p. 133-150, 2013.

GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I.; MILNE, E.; INNES, E. A. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

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

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J. L.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

KALKS, K. H. M. **Expressão da subunidade proteica recombinante rsNcSAG4 derivada de *Neospora caninum* e avaliação da resposta imunológica induzida em camundongos BALB/c**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

MCALLISTER, M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Vet. Clinics. North Am.**, v. 32, p. 443-463, 2016.

MONNEY, T.; DEBACHE, K.; HEMPHILL, A. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. **Animals**. v. 1, n. 3, p. 306, 2011.

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

MORENO, B.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; VILLA, A.; NAVARRO, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Vet. Parasitol.**, v. 187, p. 312–318, 2012.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; GONZALEZ, C. Z.; GUZMÁN, F.; MARTINS-FILHO, O. A. et al. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm74621 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet Parasitol.**, v. 166, p. 333-339, 2009.

RAPOSO, B.; DOBRITZSCH, D.; GE, C.; EKMAN, D.; XU, B.; LINDH, I.; FÖRSTER, M.; UYSAL, H.; NANDAKUMAR, K. S.; SCHNEIDER, G.; HOLMDAHL, R. Epitopespecific antibody response is controlled by immunoglobulin V(H) polymorphisms. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 3, p. 405-411. 2014.

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion-dollar question. **Int. J. Parasitol.**, v. 43, p. 133-142, 2013.

RODRIGUES, A. A. R.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B. et al. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 124, p. 139-150, 2004.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; LOPEZ-PEREZ, I.; RISCOCASTILLO, V.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 62, 2012.

TAFUR, G. A. G.; VILORIA, M. I. V.; PATARROYO, J. H.; SOUZA, E. N.; ARAÚJO, L. S.; SOSSAI, S.; PECONIK, A. P. Immunological response in bovine lymph nodes stimulated with subunits vaccines. **American journal of immunology**, v. 9, n. 48, 2013.

UZÊDA, R. S.; COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O. MCALLISTER, M. M. et al. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. **Korean J Parasitol**, v. 45, p. 295-299, 2007.

VONLAUFEN, N.; GUETG, N.; NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; VON BLUMROEDER, D.; ELLIS, J.; HEMPHILL, A. In Vitro Induction of Neospora caninum Bradyzoites in Vero Cells Reveals Differential Antigen Expression, Localization, and Host-Cell Recognition of Tachyzoites and Bradyzoites. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 576-583, 2004.

WESTHOF, E.; ALTSCHUC, D.; MORAS, D.; BLOOMER, A. C.; MONDRAGON, A.; KLUG, A.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. **Nature**, v. 311, p. 123-126, 1984.

WESTON, J. F.; HEUER, C. Efficacy of Neospora caninum killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, n. 2, p. 136-144, 2011.

YANG, J.; ZHANG, Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 8, n. 5, 2015.

ANEXO

ANEXO – Processamento histológico dos linfonodos dos camundongos imunizados para técnica de imunoperoxidase indireta.

Reagente – solução Equipamento Temperatura Tempo

Estufa 60°C 24 horas

Xilol Cuba de vidro TA 30 min

Xilol Cuba de vidro TA 30 min

Álcool 100 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 100 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 90 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 80 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 70 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

Metanol (97%) + H₂O₂ (3%) Câmara úmida TA 30 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

Tripsina 1 mg/ml de PBS Câmara úmida 37°C 10 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

Soro normal de cabra 1:10 em PBS Câmara úmida TA 45 min

Soro de coelho anti-rsNcGRA1/

rsNcSAG4/ PBS e adjuvante, 1:20 em PBS

Câmara úmida 4°C Overnight

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

IgG cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma®)

1:10 em PBS

Câmara úmida 37°C 45 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 10

OPD 25mg em 100mL de PBS + 200 μ L
de H₂O₂

Câmara úmida TA 5 min

PBS pH 7,4 Cuba de vidro TA 5 min

Hematoxilina Cuba de vidro TA 1min

Álcool 70 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 80 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 90 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 100 Cuba de vidro TA 5 min

Álcool 100 Cuba de vidro TA 5 min

Xilol Cuba de vidro TA 5 min

Xilol Cuba de vidro TA 5 min

Resina Entellan®