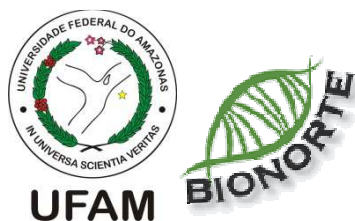


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE DE
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA
LEGAL

IMUNOGENICIDADE VACINAL DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE CONSTITUÍDA DE EPITOPOS DOMINANTES
E SUBDOMINANTES DE *Anaplasma marginale* AVALIADOS EM
CAMUNDONGOS BALB/c.

ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU

MANAUS - AMAZONAS
DEZEMBRO/2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE DE
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA
LEGAL

ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU

IMUNOGENICIDADE VACINAL DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE CONSTITUÍDA DE EPITOPOS DOMINANTES
E SUBDOMINANTES DE *Anaplasma marginale* AVALIADOS EM
CAMUNDONGOS BALB/c.

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. PAULO AFONSO NOGUEIRA

Co-orientador: Prof. Dr. ANDRÉ LUIS MORAIS MAIRÚBA

MANAUS – AMAZONAS
DEZEMBRO/2015.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C222i Cangussu, Alex Sander Rodrigues
Imunogenicidade vacinal de proteína recombinante constituída de
epítomos dominantes e subdominantes de Anaplasma marginale
avaliados em camundongos Balb/c / Alex Sander Rodrigues
Cangussu. 2015
89 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Prof.Dr Paulo Afonso Nogueira
Coorientador: Prof.Dr Luis André Morais Mariúba
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Anaplasma. 2. MSP1a. 3. OMP7/9. 4. vacinas recombinantes.
5. Balb/c. I. Nogueira, Prof.Dr Paulo Afonso II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU

IMUNOGENICIDADE VACINAL DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE CONSTITUÍDA DE EPITOPOS DOMINANTES
E SUBDOMINANTES DE *Anaplasma marginale* AVALIADOS EM
CAMUNDONGOS BALB/c.

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado em 18 de Dezembro de 2015.

Orientador - Presidente da Banca examinadora

Dr Paulo Afonso Nogueira

Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia - AM

Membros Titulares:

Dr(a) Adriana Malheiro

Universidade Federal do Amazonas

Dr(a) Cintia Mara Costa de Oliveira

Universidade Federal do Amazonas

Dr(a) Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - AM

Dr Rajendranath Ramasawmy

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - AM

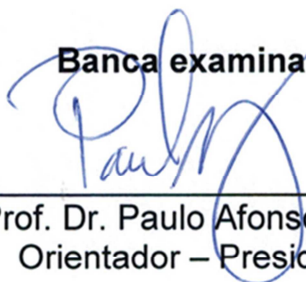
ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU

**IMUNOGENICIDADE VACINAL DE PROTEÍNA RECOMBINANTE
CONSTITUÍDA DE EPITOPOS DOMINANTES E SUBDOMINANTES DE
Anaplasma marginale AVALIADOS EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado de Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal, na Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Prof. Paulo Afonso Nogueira
Co-orientador: Dr. Prof. André Luis Morais Mairúba

Banca examinadora:



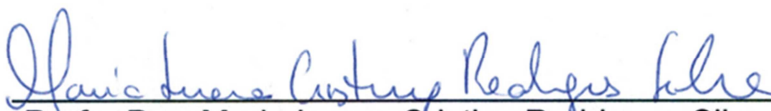
Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira
Orientador – Presidente da banca



Profa. Dra. Adriana Malheiro
Membro



Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira
Membro



Profa. Dra. Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva
Membro



Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy
Membro

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a
minha esposa Keoma e
filha Alíce.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela inspiração e proteção constante em minha vida.

Ao programa de Pós-graduação – Bionorte - Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira por acreditar neste desafio contribuindo valorosamente nos direcionamentos e coordenação dos trabalhos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luis André Moraes Mariúba pela constante prestatividade e contribuição técnica.

A equipe de trabalho do Instituto Lêonidas e Maria Deane - Fiocruz-AM e Biotecnologia-UFAM pela contribuição nas atividades experimentais.

Ao Prof Dr Múcio Flávio Barbosa Ribeiro e sua equipe do Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, pela aquisição e treinamento no cultivo de células IDE8 de carrapatos e quantificação de *A. marginale* UFMG2.

Ao Prof. MSc. Kelvinson Fernandes Viana da Universidade Federal do Tocantins, pela contribuição nas atividades referentes aos testes pré-clínicos.

A prof.(a) Dra Sabrina Ephifânio do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo pela preparação de lâminas histopatológicas e ao Biomédico e Patologista Prof. Dr. Hidelberto Matos Silva pelas análises histopatológicas.

Agradeço.

“Sê firme e corajoso. Não temas e não te apavores, porque Iahweh teu Deus está contigo por onde quer que andes”.

Josué 1:9

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	-
Lista de Tabelas.....	-
Lista de Abreviaturas.....	-
Resumo.....	-
Abstract.....	-
1. Introdução.....	20
2. Fundamentação Teórica.....	22
2.1 Anaplasmoses bovina.....	22
2.1.1 Aspectos Gerais.....	22
2.2 Mecanismos de infecção.....	23
2.3 Resposta imune e mecanismo de evasão	26
2.4 Diagnósticos.....	28
2.5 Proteínas envolvidas no processo infeccioso.....	30
2.6 Estado da arte das vacinas comercialmente empregadas no controle de anaplasmoses.....	32
2.6.1 Histórico.....	32
2.6.2 Candidatos a vacinas recombinantes.....	34
2.6.3 Regiões imunodominantes da proteína MSP1a.....	35
2.7 Justificativa.....	36
3. Objetivo Geral.....	38
3.1 Objetivos Específicos.....	38
4. Material e Métodos.....	39
4.1 Ferramentas de Bioinformática usada na seleção de epítomos vacinais.....	39
4.2 Gene Sintético – IDT e Clonagem do gene <i>msp1a/omp7/9</i>	41

4.3 Construção vetor expressão pHT43- <i>msp1a/omp7/9</i>	42
4.4 Determinação da massa molecular da proteína MSP1a/OMP7/9.....	45
4.5 Análises de sistemas de indução de <i>Escherichia coli</i> DH5αF'IQ com pHT43- <i>msp1a/omp7/9</i>	46
4.6 Caracterização da antigenicidade de MSP1a/OMP7/9 por SDS-PAGE, <i>Western Blotting</i>	47
4.7 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – ELISA.....	48
4.8 Formulação da vacina oleosa.....	49
4.9 Imunizações de camundongos Balb/c.....	49
4.10 Teste desafios com <i>Anaplasma marginale</i> UFMG2.....	51
4.11 Análise estatística.....	52
5. Resultados e Discussão	53
5.1 Obtenção do gene sintético e predição de sítios dos epítomos dominantes MSP1a e subdominate OMP7/9.....	53
5.2 Clonagem do gene sintético em vetor pGEM e subclonagem em plasmídeo de expressão pHT43.....	53
5.3 Ensaios de otimização da expressão e caracterização da antigenicidade da proteína MSP1a/OMP7/9.....	56
5.4 Desafio e avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos.....	60
5.5 Avaliação da carga bacterêmica após desafio com <i>Anaplasma marginale</i> UFMG2.....	70
6. Conclusão	75
7. Anexos	76
8. Referências Bibliográficas	77

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1 Ciclo de transmissão e desenvolvimento de <i>A. marginale</i> em células hospedeiras de bovinos e carrapatos. Modelo proposto por Kocan et al. 2003.....	25
Figura – 2 Microscopia eletrônica de <i>A. marginale</i> em células de carrapatos em estágios de desenvolvimento proposto por Kocan et al. 2003. Formas reticuladas de <i>A. marginale</i> em processo de divisão binária (A) . Forma densa de <i>A. marginale</i> (infectante) em células de carrapatos (B)	25
Figura – 3 Mecanismos de Resposta celular e humoral do processo infeccioso de <i>A. marginale</i> descrito por Palmer et al. 1999.....	26
Figura – 4 Bacteremia de <i>A. marginale</i> em eritrócitos de bovinos. Modelo proposto por Kocan et al. 2003.....	28
Figura – 5 Proteínas OMP7/9 e MSP1a de <i>A. marginale</i> (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries). Alinhamentos de aminoácidos (A) . Análises de antigenicidade, acessibilidade e estímulos linfócitos das proteínas Omp7/9 (B) e MSP1a (C) . Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein . Software disponível em http://tools.immuneepitope.org/main	40
Figura – 6 Gene sintético <i>msp1a/omp7/9</i> de <i>A. marginale</i> Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries. Enzimas, His-tag, epítomos e <i>stop códon</i> estão destacados em negrito.....	41
Figura – 7 Fluxograma da etapa de clonagem e extração plasmidial do genes <i>msp1a/omp7/9</i> de <i>A. marginale</i> (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries) em plasmídeo pGEM EASY 3000bp.....	43
Figura – 8 Fluxograma da etapa de subclonagem genes <i>msp1a/omp7/9</i> de <i>A. marginale</i> (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries) em plasmídeo pHT43 8057bps.....	44
Figura - 9 Fluxograma ilustrando os grupos experimentais e as etapas de testes pré-clínicos. Foram utilizados 24 camundongos Balb/c divididos em quatros (4) grupos experimentais: PBS; ISA 50V2; PTN +PBS E PTN +ISA 50 V2. Esses animais foram submetidos a três (3) doses de vacina em intervalos 21 dias e submetidos ao desafio experimental com <i>A. marginale</i> UFMG2.....	50
Figura – 10 Gene sintético IDT e o sequenciamento de peptídeo. A – Mapa gênico correspondente a proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 de <i>A. marginale</i> adquirido pela IDT Biotecnologia. B – Sequenciamento de aminoácido da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 de <i>A. marginale</i> com massa molecular de 17kDa obtido pelo Software ProtParam tool desenvolvido por Gasteiger et al 2005 e disponível em http://web.expasy.org/protparam	54

Figura - 11 Construção da proteína recombinante. **A)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos plasmídeos pGEM-*msp1a/omp7/9*. **B** – perfil eletroforético do plasmídeo pGEM-*msp1a/omp7/9* digerido com *Bam*HI e *Sma* I (canaleta 1) e pHT43 digeridos com *Bam* HI e *Sma* I (canaletas 2-3). **C** – Perfil eletroforético do plasmídeo pGEM-*msp1a/omp7/9* digerido com BamHI e SmaI (canaleta 1). O fragmento de 400pb foi retirado para purificação. Na canaleta (2), apresenta o perfil do plasmídeo pHT43intacto e na canaleta (3) digerido. Esse fragmento também foi excisado para etapa de purificação. **D** – Perfil eletroforético do gene *msp1a/omp7/9* purificado e com tamanho esperado de 400pb. **E**- Canaleta (5) apresenta o plasmídeo pHT43-*msp1a/omp7/9* com fragmento gênico *msp1/omp7/9* e o plasmídeo pHT43 digerido..... 55

Figura – 12 Perfil eletroforético e Análise de antigenicidade de MSP1/OMP7/9 de cultura *Escherichia coli* DH5αF'IQ induzida. **A** – Dupla adição de IPTG 1mM a 28°C. T0 - antes indução; T8 - após 8 horas primeira indução; T16 - após 16 horas primeira indução. Em todas as amostras foram utilizadas a proporção de 2μL de amostra e 18μL de tampão desnaturante. Seta corresponde a posição equivalente à 17KDa. **B** – Proteínas purificada por cromatografia de troca iônica com Niquel (cauda de histidina). **C** - *Western Blotting* da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 obtida de cultivo de *Escherichia coli* – DH5αF'IQ induzido por IPTG 1mM. A proteína purificada obtida SDS-PAGE 15% foi transferida para membrana de nitrocelulose seguido o protocolo BioRad. Utilizou como anticorpo primário soro de animais com anaplasmoses (soro positivo) e soro de animais saudáveis (soro negativo) coletados de bezerros em fazenda na região de Gurupi do Estado do Tocantins. **D** – Soro negativo. Anticorpo secundário Anti-Bovine IgG - rabbit A8917 Sigma com conjugado peroxidase na proporção 1:2.000 e 0,05%v/v 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) foram utilizados para determinar a reatividade proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 com soro de animais doentes..... 57

Figura – 13 Determinação de IgG anti-MSP1/OMP7/9. Grupos de camundongos Balb/c submetidos imunização. **N-I/D** – Não imunizado/não desafiado. **PTN + PBS** – Grupos imunizados com MSP1a/OMP7/9 + PBS. **PTN + ISA** – Grupos imunizados com MSP1/OMP7/9 + ISA 50 V2. **ISA** – Grupos com adjuvante ISA 50 V2. **PBS** - Grupo controle com PBS. (**p*<0,03; (**p*<0,02). Os soros de Balb/c dos grupos..... 59

Figura – 14 Análise de peso corporal e Sobrevivência após desafio. **A)** Variação do peso dos camundongos Balb/c desafiados com dose de 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFMG2 por 42 dias. **B)** Percentagem de Balb/c sobreviventes. Vacinado – Imunizados com MSP1a/Omp7/9 + ISA 50 V2; e não vacinado – PBS (placebo)..... 62

Figura – 15 Camundongos Balb/c do grupo experimental. **A - B** – Animais com anaplasmoses apresentando hipotermia, pêlos opacos e arrepiados. **C** – Animal com quadro avançado da doença com dificuldade de movimentos (Letargia). **D** – Animal morto. **E - F** – animais saudáveis com pêlos brancos e lisos. **A - D** animais do grupo controle inoculados com PBS. **E – F** animais que foram imunizados com antígeno MSP1a emulsificado com adjuvante ISA 50 V2 nos tempos 0; 21 e 42 dias. Todos os grupos experimentais receberam desafio de 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* cepa UFMG2 observados por 42 dias..... 63

Figura – 16 Leucograma de Balb/c imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL *A. marginale* *A. marginale* após 49 dias. **A** – Leucócitos. **B** – Linfócitos. **C** – Monócitos. **D** – Neutrófilos. MSP1a + PBS (MSP1a/OMP7/9 + PBS); MSP1a + ISA (MSP1a/OMP7/9 + ISA); ISA (adjuvante ISA 50 V2); PBS – Grupo controle. * representa diferença estatística ($p < 0,05$); ** representa diferença estatística ($p < 0,005$)..... 66

Figura – 17 Análise de Uréia e Creatinina de camundongos de Balb/c imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFM2. **MSP1A + PBS** – Imunizados com MSP1a/OMP7/9 + PBS; **MSP1A + ISA** - Imunizados com MSP1a/OMP7/9 + ISA V2; **ISA** - Imunizados ISA 50 V2; **PBS** – Grupo controle. (ns) – não significativo ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. (a) - representa diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo ISA 50 V2..... 69

Figura – 18 Carga bacterêmica e esferócitos de Balb/c de grupos imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFM2. Vacinado - imunizados com MSP1a/OMP7/9 + ISA. placebo – inoculados com adjuvante ISA 50 V2. Não vacinado – inoculados com PBS. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0008$ 71

Figura –19 Eritrócitos de Balb/c submetidos a diferentes protocolos vacinais após 56 dias de desafio com 3×10^5 *A. marginale* UFM2. PBS - Grupo Controle. MSP1a/OMP7/9 + PBS - Grupos imunizados com proteína MSP1a/OMP7/9 e PBS. MSP1a/OMP7/9 + ISA 50 V2 - Grupos imunizados com proteína MSP1a/OMP7/9 emulsificado com adjuvante. ISA 50 V2 – Grupos imunizados somente com adjuvante. As setas pretas indicam a presença de *A. marginale* UFMG2 e as setas vermelhas esferócitos..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1 Quadro clínico de Balb/c imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL de <i>A. marginale</i> UFMG2.....	64
Tabela – 2 Eritrograma de Balb/c submetido a diferentes protocolos vacinais após 49 dias de desafio com <i>A. marginale</i> UFMG2.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS:

OMP7/9 - *outer membrane protein 7/8/9 – A. marginale*

AM779 – proteína *A. marginale* 779

AM854 – proteína *A. marginale* 854

MSP1a - *major surface protein 1a - A. marginale*

MSP2 – *major surface protein 2 - A. marginale*

MSP3 – *major surface protein 3 - A. marginale*

MSP4 - *major surface protein 4 A. marginale*

MSP5 - *major surface protein 5 - A. marginale*

MSP1a/OMP7/9 - Proteína quimérica constituída epítomos OMP7/9 e MSP1a

MSP1a/OMP7/9 + ISA – Proteína quimérica emulsificada em adjuvante oleoso SISA 50 V2

MSP1a/OMP7/9 + PBS – Proteína quimérica com solução PBS

STSSQL – sequências peptídicas

SEASTSSQLGA – sequência peptídica

SSAGGQQQESS – sequência peptídica

YLHSNVEQATKDLMASEFAMMTFGGIMTCA – sequência peptídica

HGA – Anaplasmosse Granulocítica Humana

msp2; msp4; opag2; opag3 – Genes ortólogos de *A. marginale*

msp1a – Gene *major surface protein 1a* de *A. marginale*

msp1a/omp7/9 – Gene sintético de MSP1a/OM7/9 de *A. marginale* St Maries

pGEM/*msp1a/om7/9* – plasmídeo com gene sintético de MSP1a/OMP7/9

pHT43/*msp1a/omp7/9* – vetor de expressão com gene sintético de MSP1a/OMP7/9

pHT43 – vetor de expressão

pT101 – vetor de expressão

pQE30 – vetor de expressão

pGEM – Clonagem gene *msh1a/omp7/9*

IFN- γ – Interferon gama

TNF α – Fator necrose tumoral

IL - Interleucina

IgG2 – Imunoglobulina G subclasse 2

Fc – Receptor de membrana

CF – Fixação de complemento

IFA – Imunofluorescência indireta

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

CAT – Ensaio de aglutinação em cartão

Meio LB – meio Luria Bertani

PBS – Tampão fosfato salino

L15B – meio de cultura células de carrapatos

IDE8 – células de carrapatos

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

MCAC – tampão lise celular

ISA – adjuvante oleoso ISA 50 V2 SEPPIC

VCM – volume corpuscular medio

HCM – hemoglobina corpuscular media

CHCM – concentração da hemoglobina celular media

RESUMO

CANGUSSU, Alex Sander Rodrigues Cangussu, DSc., Universidade Federal do Amazonas, Julho de 2015. **Imunogenicidade vacinal de proteína recombinante constituída de epítomos dominantes e subdominantes de *Anaplasma marginale* avaliados em camundongos Balb/c.** Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira. Co-Orientador: Luis André Moraes Mariuba.

A anaplasmoze bovina é uma enfermidade causada por uma rickettsia denominada *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) transmitida por carrapatos e a doença se caracteriza por anemias, febre, perda de peso, diminuição da produção de leite, aborto e morte nos animais. A doença causa perdas econômicas na produção de gado e por isso estratégias para o desenvolvimento de vacinas é imprescindível para minimizar seu impacto. Neste estudo uma proteína recombinante de *A. marginale* foi produzida a partir de uma estratégia inovadora de utilizar DNA sintético para codificar os epítomos dos principais antígenos de *A. marginale*. Após a clonagem em pGEM e subclonagem em pHT43, a proteína quimérica foi expressa em *Escherichia coli* contendo epítomos dos antígenos OMP7/9 (*outer membrane protein 7/9*) e MSP1a (*major surface protein 1a*). A antigenicidade foi comprovada pela reatividade da proteína recombinante com soro de bezerro com anaplasmoze, e a imunogenicidade e proteção vacinal foi comprovada em camundongos Balb/c. Com uma fórmula composta com adjuvante oleoso (MSP1a/OMP7/9+ISA), animais receberam três (3) doses vacinais e desafiados com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFMG2. Os animais imunizados não apresentaram variação de peso corporal nem sinais clínicos da doença, porém houve redução significativa da carga bacterêmica nos vacinados ($p < 0,0008$) comparados com grupos placebos. Além disso, não houve alterações hematológicas como aumento no número de

monócitos ($p<0,005$), neutrófilos ($p<0,05$) e leucocitose ($p<0,05$), verificadas nos controles infectados.

As avaliações deste trabalho demonstraram a importância da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 na melhoria da resposta imunológica de Balb/c e sua potencial aplicabilidade na produção de vacinas recombinantes.

Palavras-chaves: *Anaplasma*; MSP1a; OMP7/9; vacinas recombinantes, Balb/c

ABSTRACT

CANGUSSU, Alex Sander Rodrigues Cangussu, DSc., Universidade Federal do Amazonas, Julho de 2015. **Vaccinal immunogenicity of recombinant protein consisting of the dominant and subdominant epitopes of the *Anaplasma marginale* evaluated in Balb/c mice.** Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira. Co-Orientador: Luis André Morais Mariuba.

The bovine anaplasmosis is a disease characterized by severe anemia, fever, weight loss, decreased milk production, abortion and death in the animals. It is caused by *A. marginale* and transmitted by ticks, leading severe economic losses in cattle production and hence strategies for developing vaccines are essential to minimize its impact. In this study, a chimeric protein was produced by synthetic DNA, carrying sequences of predicted epitopes from OMP7, OMP9 and MSP1a, and used as vaccine emulsified with ISA adjuvant. After three doses, Balb/c mice were challenged with 3×10^5 cel/mL *A. marginale* UFMG2 to assess protection of compound MSP1a/OMP7/9+ISA. There were not body weight alterations neither clinical signs were observed in immunized mice. Bacteremia count showed drastic reduction and discrete alteration on erythrocyte morphology (spherocytes) in vaccinated mice 56th day after challenge. No alteration was observed in hematologic data in relation to infected control mice. The evaluation obtained in this study showed the importance of the MSP1a /OMP7/9 protein in the immune response of the Balb/c and your applicability potential in the recombinant vaccine production.

Keywords: *Anaplasma*; MSP1a; OMP7/9; recombinant vaccine, Balb/c.

1. INTRODUÇÃO

A anaplasmoze bovina é causada pela rickettsia *A. marginale*, família de *Anaplasmataceae* ordem *Rickettsiales*, uma bactéria intracelular obrigatória de eritrócitos, transmitida principalmente por carrapatos. A doença é caracterizada por graves anemias, febre, perda de peso, diminuição da produção de leite, aborto e morte nos animais (AUBRY & GEALE 2011; MICHELON et al. 2006; MOLAD et al. 2004; KOCAN et al. 2000; LOSOS 1986; PALMER 1989a). A *A. marginale* causa graves perdas econômicas na produção de gado em todo o mundo, principalmente em países como Austrália, África do Sul, Israel, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil (AUBRY & GEALE 2011; DARK et al. 2011).

Várias estratégias têm sido implementadas para o desenvolvimento de vacinas que possam minimizar o impacto desta doença, dentre elas, vacinas compostas de organismos vivos atenuados de *Anaplasma centrale*, ou eritrócitos parasitados mortos, ambos com eficácia considerada insatisfatória (DARK et al. 2011). Tais estratégias vacinais apresentam desvantagem de elevar o custo de produção, não obter eficácia comprovada, além da dificuldade de logística referente à área de distribuição (PALMER & LINCOLN 2001).

Tem sido desejável a implementação de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas recombinantes para imunização de bovinos contra *A. marginale*. Uma das estratégias consiste no desenvolvimento de vacinas compostas de proteínas de superfície celular de *A. marginale*. Dessa maneira, a eficácia e inocuidade destas vacinas recombinantes nos animais imunizados, se confirmadas, agregariam confiança e valor ao produto final. A obtenção de antígenos recombinantes na formulação de vacinas contra anaplasmoze têm empregado o uso de vetores em *Escherichia coli* e *Mycobacterium* (DE LA FUENTA et al. 2011; TAMEKUNI et al. 2009; MICHELON et al. 2006).

Dentre os antígenos alvos, a proteína MSP1a (*Major Surface Protein 1a*) tem sido um alvo para o desenvolvimento de novas vacinas contra anaplasmoze bovina, pois, anticorpos

neutralizantes foram capazes de levar a imunidade protetora em bovinos (MICHELON et al. 2006; KOCAN et al. 2003; DE LA FUENTE et al. 2003). Outras proteínas subdominantes também têm sido associadas ao processo infeccioso de anaplasmoses. Estas proteínas são identificadas como *A. marginale* 779 (AM779) *A. marginale* 854 (AM854), *outer membrane protein* 7/9 (OMP7/9) com capacidade de induzirem a resposta imune estimulando os linfócitos T CD4 + (LOPEZ et al. 2008).

Neste estudo, regiões específicas da proteína de membrana OMP7/9 e MSP1a caracterizadas como subdominantes foram analisadas por ferramentas de bioinformática prevendo regiões de hidrofobicidade, acessibilidade, antigenicidade, flexibilidade e conformação beta. O gene *msp1a/omp7/9* foi clonado em plasmídeo pGEM e subclonado em vetor de expressão pHT43. A transformação foi realizada em *Escherichia coli* DH5 α F'IQ. A proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 foi adsorvida em adjuvante ISA 50 V2 SEPPIC e verificada seu efeito na resposta imunológica celular e humoral em camundongos Balb/c.

Até o momento, nenhuma das vacinas utilizadas no controle da anaplasmoses foi inteiramente vantajosa. O desenvolvimento de vacinas recombinantes ainda acumula desconfiança, e este trabalho expõe os resultados obtidos com uso de uma proteína quimérica constituída de epitopos imunodominantes e subdominantes de quatro proteínas de *Anaplasma marginale* St. Maries com o objetivo de minimizar os impactos desta doença.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Anaplasmosse bovina

2.1.1 Aspectos gerais

A Anaplasmosse bovina é uma hemoparasitose do gado responsável por perdas econômicas significativas em regiões tropicais e subtropicais. É causada pela rickettsia *A. marginale*, bactéria intracelular obrigatório que é transmitida por carrapatos, por meio de sangue contaminado de mandíbulas de insetos, e também pela contaminação com equipamentos cirúrgicos. É caracterizada por graves anemias, febre, perda de peso, diminuição da produção de leite, aborto e morte dos animais (AUBRY & GEALE 2011; MICHELON et al. 2006; MOLAD et al. 2004; KOCAN et al. 2000; LOSOS 1986; PALMER 1989a).

A Anaplasmosse bovina ainda representa uma das mais importantes doenças de bovinos em todo o mundo, além de ser uma emergente ameaça também para outros animais, bem como os humanos (HOPE et al. 2004; FRENCH et al., 1999; WALKER et al. 1996). Anaplasmosse bovina é considerada endêmica em bovinos da América do Sul, do México, América central e Caribe (KOCAN et al. 2003; DE LA FUENTE et al. 2003).

A *A. marginale* pertence à família de *Anaplasmataceae* ordem *Rickettsiales*. Esta família inclui também três espécies do gênero *Ehrlichia*. As espécies *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia phagocytophila* e *Equi Ehrlichia* foram descritas como agentes da Anaplasmosse Granulocítica Humana ou HGA. As espécies *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys* foram redefinidas como *Anaplasma bovis* e *Anaplasma platys* (DUMLER et al. 2001; AUBRY & GEALY 2011). *Anaplasma phagocytophilum* está presente em todo o mundo e

está relacionado à febre transmitida por carrapatos em ruminantes na Europa (HOAR et al. 2008). As sequências de aminoácidos das principais proteínas de superfície (MSP) de *Anaplasma phagocytophilum* são semelhantes às proteínas de *A. marginale*.

A *Anaplasma centrale* é considerada cepa de menor virulência. Tem sido utilizada nas imunizações como vacina de cepa viva em países como Israel, África do Sul, América do Sul e Austrália (DE LA FUENTE et al. 2005b). A espécie *Anaplasma ovis* é relatada como agente infeccioso de anaplasmoses em ovinos, com relatos de casos graves em ovelhas, veados e cabras, mas não é contagiosa para os bovinos. Segundo Aubry & Gealy (2011), *A. marginale* não causa doença em seres humanos.

2.2 Mecanismo de infecção

O mecanismo de infecção é iniciado pela invasão do *A. marginale* nos eritrócitos de células hospedeira. Ocorrem ciclos de replicação seguidos de remoção dos eritrócitos infectados pelo sistema retículo endotelial e invasão a novos eritrócitos de bovinos. O período de incubação de *A. marginale* é variável e compreende de 7 a 60 dias (CALLOW 1984; KOCAN et al. 2003; AUBRY & GEALE 2011). Na fase aguda ocorre aumento exponencial de eritrócitos infectados com duplicação a cada 24h alcançando concentrações de eritrócitos infectados na ordem de 10^9 células/mL (PALMER et al. 1999; RICHEY & PALMER 1990; AUBRY & GEALE 2011). Na fase aguda da infecção o *A. marginale* pode estar presente em 10% a 90% dos eritrocitos (AUBRY & GEALE 2011).

Segundo Radostits et al. (2007), pelo menos 15% dos eritrócitos são parasitados antes que de aparecer os sinais clínicos. Os sinais clínicos de anaplasmoses são anemia, icterícia sem hemoglobinemia e anemia hemoglobinúria resultante da fagocitose dos eritrócitos pelo sistema retículo endotelial (DE LA FUENTE et al. 2001c; POTGIETER & STOLTSZ 2004).

Febre, perda de peso, aborto, letargia e morte são outros sinais clínicos que podem ocorrer em infecções causadas por *A. marginale* (KOCAN et al. 2003).

A infecção de anaplasmosose pode ocorrer em qualquer fase da idade animal. Entretanto, a gravidade da doença está correlacionada com a idade, sendo que animais mais velhos são mais susceptíveis à enfermidade. Os bezerros são menos susceptíveis à doença clínica. Em animais com idade inferior a (6) seis meses de idade, a doença é praticamente rara. A partir de seis meses a um ano de idade, geralmente se observa a doença no estágio leve. De um a dois anos de vida a fase aguda é mais frequente, mas raramente fatal (AUBRY & GEALE 2011).

Em bovinos adultos com idade superior a dois anos observa quadro agudo da doença muitas vezes fatal, com risco de mortalidade entre 29 e 49% (RICHEY 1991; KOCAN et al. 2003). Uma vez infectados com *A. marginale*, os animais independente da idade permaneceram portadores do parasita por toda a vida, mesmo que não desenvolvam a doença clínica (RICHEY 1991). Durante o período de persistência do parasita ocorrem ciclos regulares de 10 a 14 dias com elevação e diminuição dos eritrócitos infectados (KIESER et al. 1990; VISESHAKUL et al. 2000; KOCAN et al. 2003). A concentração de eritrócitos infectados variam em intervalos bimestrais na ordem de 10^3 a 10^5 eritrócitos infectados/mL de sangue (ERIKS et al. 1989), concentração menor em comparação com a fase aguda (SCOLES et al. 2005a).

Kocan et al. (2003), propuseram um ciclo esquemático do desenvolvimento de *A. marginale* em células de bovinos e carrapatos. Segundo Kocan et al. (2003), eritrócitos infectados podem ser ingeridos por espécies de carrapatos *Dermacentor spp.*, *Rhipicephalus spp.*, ou *Boophilus spp.* As células intestinais de carrapatos são os primeiros locais de infecção do *A. marginale*. Posteriormente, ocorre à proliferação para outros tecidos, incluindo glândulas salivares, originando a transmissão do parasita para outros animais (Figura – 1). Kocan et al. (2003) demonstraram o processo de divisão binária de *A. marginale* em células

de carrapatos (Figura-2). Células de carrapatos infectadas com *A. marginale* apresentam formas reticulada em divisão binária, correspondente à fase vegetativa, e a forma infecciosa com uma densidade populacional em células da glandula salivar.

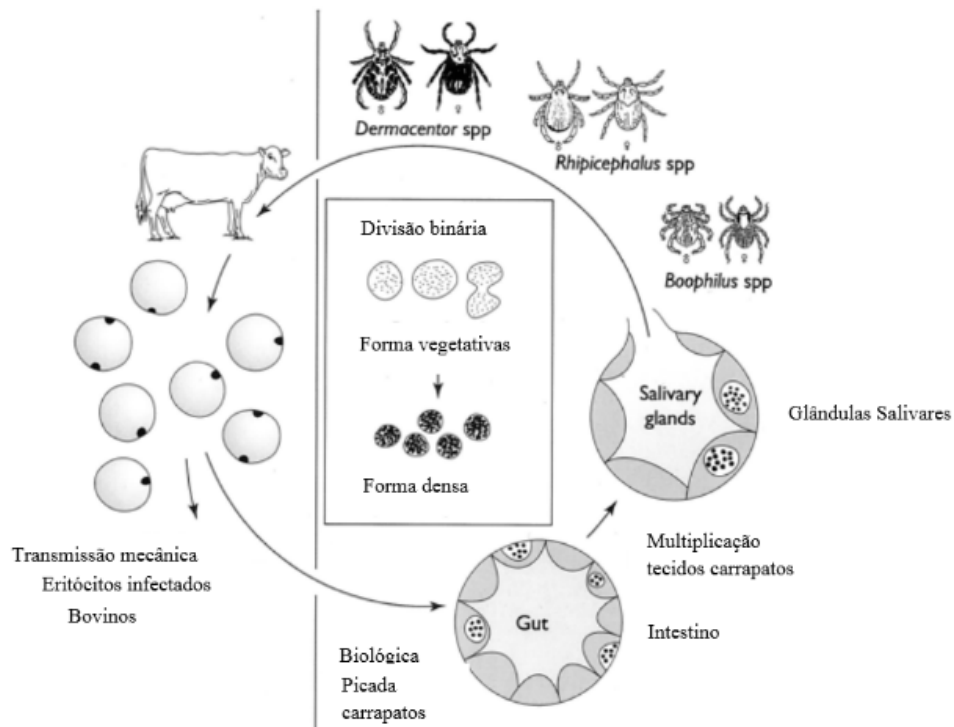


Figura – 1 Ciclo de transmissão e desenvolvimento de *A. marginale* em células hospedeiras de bovinos e carrapatos. Modelo proposto por Kocan et al. 2003.

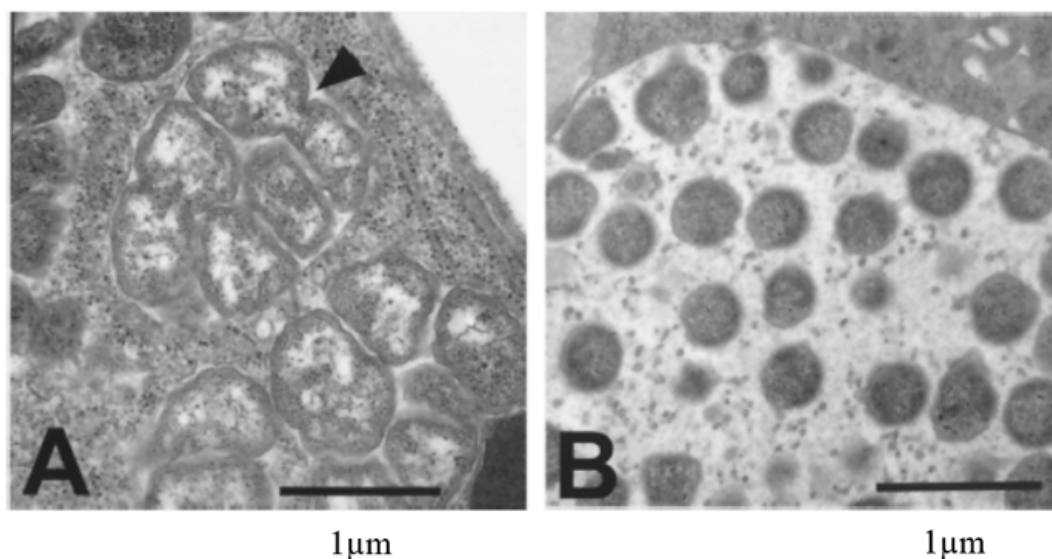


Figura – 2 Microscopia eletrônica de *A. marginale* em células de carrapatos em estágios de desenvolvimento proposto por Kocan et al. 2003. Formas reticuladas de *A. marginale* em processo de divisão binária (A). Forma densa de *A. marginale* (infectante) em células de carrapatos (B).

2.3 Resposta imune e mecanismo de evasão

A imunidade contra *A. marginale* foi descrita tendo como base a resposta celular e humoral contra um antígeno de membrana, a MSP2 (PALMER et al. 1999). A célula T CD4⁺ exerce seu papel central pela secreção de IFN γ e TNF α antígeno-específico induzindo a produção de anticorpos opsonizantes e a ativação de macrófagos, que por sua vez farão o *clearance* das bactérias (Figura-3). Além disso, as citocinas Interleucina (IL) -12, IL-18, TNF- α estão envolvidas juntamente com as células T CD4⁺ na eliminação do parasita (PEDRA et al. 2007a; PEDRA et al. 2007b; CHEN et al. 2012). Brown et al. (1998) demonstraram que a proteção adequada contra *A. marginale* pode ser obtida pela produção de IgG2a evidência de resposta tipo Th1.

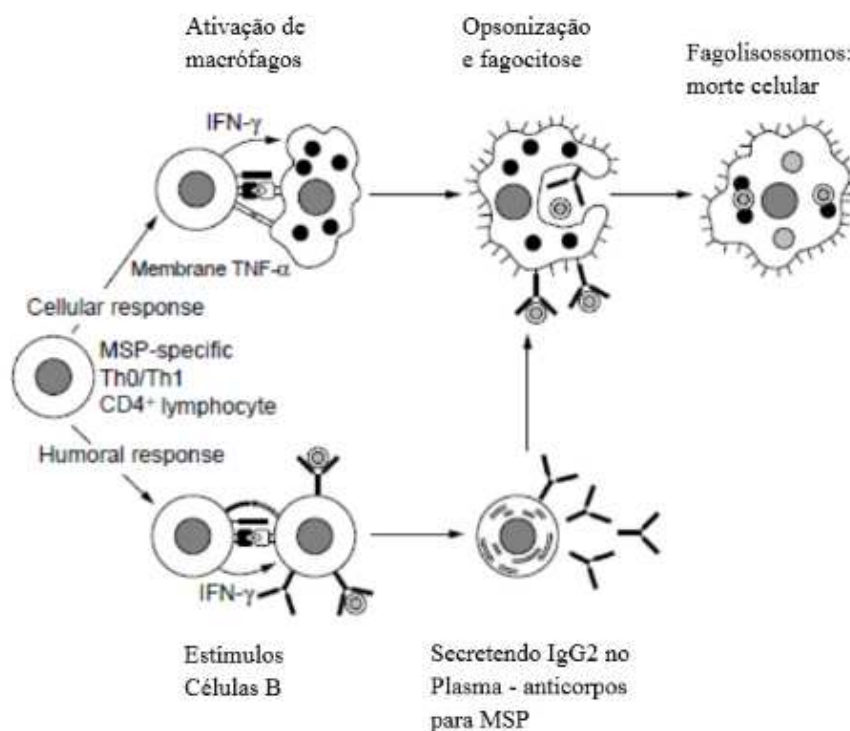


Figura – 3 Mecanismos de Resposta celular e humoral do processo infeccioso de *A. marginale* descrito por Palmer et al. 1999.

A produção de IFN gama por células T CD4⁺ é responsável em aumentar a síntese de IgG2 em bovinos (Figura-4). O IFN gama ativa células de macrófagos para expressão do receptor de membrana Fc e possibilita a fagocitose. No macrófago ocorre a fusão do fagossomos com lisossomos e a produção do óxido nítrico, acarretando morte do parasita (PALMER et al. 1999).

A resposta inflamatória contra infecções de *Anaplasma sp* é realizada como um mecanismo da resposta inata, e não está diretamente correlacionada com a carga bacterêmica do parasita (MARTIN et al. 2001; VON LOEWENICH et al. 2004; BROWNING et al. 2006; SCORPIO et al. 2006; CHEN et al. 2012). Durante a infecção ocorrem elevados níveis de IFN gama, estes contribuem para a defesa contra o patógeno (BIRKNER et al. 2008; PEDRA et al. 2008). Nesta etapa ocorre diminuição da função da medula óssea e alterações de células hematopoiéticas no baço (SCORPIO et al. 2006; JOHNS et al. 2009; JOHNS e BORJESSON 2012). O IFN gama produzidos por células *Natural killers* (NK) podem ser quantificados no sangue.

A identificação dos mecanismos efetores envolvidos no controle de *A. marginale* pode contribuir na seleção de epítomos e no desenvolvimento de vacina recombinante segura e estável (PALMER et al. 1999; SILVESTRE et al. 2014). Palmer et al. (1999) descreveram que os marcadores CD44⁺ e CD62L⁺ permitem a quantificação de células T CD4⁺ de memória e de ativação, respectivamente.

Os ciclos de bacteremia de *A. marginale* revelaram a existência de mecanismo de *escape* por variação antigenica de variantes MSP2 (Figura - 4). Este antígeno possui uma região altamente variável contida no domínio hidrófilo de MSP2. A expressão das variantes MSP2 tem sido confirmada por imunofluorescência. Os epítomos desta variante antigênica não são reconhecidos imediatamente por anticorpos de células B, o que possibilita o *escape* e

proliferação da bactéria surgindo picos sucessivos de bacteremia (EID et al. 1996; FRENCH et al. 1998; PALMER et al. 1999).

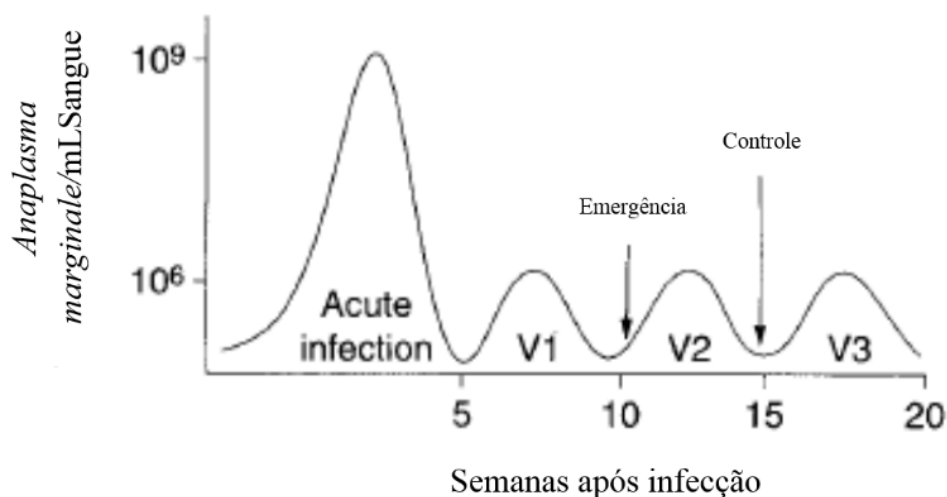


Figura – 4 Bacteremia de *A. marginale* em eritrócitos de bovinos. Modelo proposto por Kocan et al. 2003.

2.4 Diagnósticos

Os sinais clínicos de anaplasmosose não são específicos. É necessária a pesquisa direta do agente, antígenos ou anticorpos (VIDOTTO & MARANA 2001). O diagnóstico anátomo-patológico é realizado por verificação de alterações dos órgãos. As alterações macroscópicas mais presentes são sangue fino, aquoso e icteríco característicos de soros anêmicos. Pode ocorrer hepatoesplenomegalia, rins aumentados e escuros, vesícula biliar distendida com bile densa e grumosa, e congestão cerebral (VIDOTTO & MARANA 2001).

A pesquisa do parasita pode ser realizada em esfregaços de sangue de animais clinicamente infectados coradas com Giemsa durante a fase aguda. Entretanto, os sinais clínicos não são evidentes em animais no período de incubação ou em animais portadores.

Desta forma, a infecção é geralmente diagnosticada pela análise sorológica de anticorpos e por métodos de detecção molecular (AUBRY & GEALE 2011).

Vários testes sorológicos têm sido utilizados para estudos epidemiológicos. A fixação de complemento (CF), ensaio de aglutinação capilar, ensaio de aglutinação em cartão (CAT), imunofluorescência indireta (IFA) e *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) (AUBRY & GEALE 2011). ELISA e o CAT são os testes sorológicos mais empregados para identificação de animais infectados (OIE 2008). Testes de Polymerase Chain Reaction (PCR) são capazes de detectar a presença de baixo nível do parasita em animais portadores e também no carrapato (AUBRY & GEALE 2011).

O diagnóstico de sub-inoculação de animais suspeitos em bezerros esplenectomizados com 4 a 8 semanas é o método mais antigo (COETZEE et al. 2006a). Neste método, se o bezerro doador estivesse infectado poderia ser observada a presença de *A. marginale* nos esfregaços sanguíneos dos receptores (AUBRY & GEALE 2011). Entretanto, este método tem elevado custo e questionamento sobre ética no uso de animais, uma vez que, os animais subinoculados com *A. marginale* devem ser sacrificados (OIE 2008). Os testes têm sido validados com pesquisa, detecção microscópica de *A. marginale* ou a comparação com métodos sorológicos, ELISA e PCR (AUBRY & GEALE 2011).

Uma possível estratégia de diagnóstico seria a inoculação de amostras suspeitas em camundongos Balb/c. Santos et al. (2013) relataram que a infecção de *A. marginale* pode ocorrer nestes animais, com uma dose subclínica de 3×10^5 células-infectadas/mL foi possível ver perda de pesos ou mesmo morte, os mesmos sinais clínicos observados nos bovinos.

2.5 Proteínas envolvidas no processo infeccioso.

Isolados de *A. marginale* diferem quanto à antigenicidade, morfologia, virulência, transmissibilidade e habilidade para indução de linfócitos T (PALMER 1989a). Diferenças genótípicas e fenótípicas de proteínas estruturais têm sido observadas entre isolados de *A. marginale* (VISSER et al. 1992; MUSOKE et al. 1996). A membrana celular de *A. marginale* possui múltiplos polipeptídeos expostos com epítomos imunogênicos a linfócitos B (MUSOKE et al. 1996; TEBELE et al. 1991; PALMER & MCGUIRRE 1984). Entre elas, as proteínas de superfície de membrana MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, e MSP5 apresentam regiões proteicas conservadas, específicas para linfócitos B e são alvos para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (TEBELE et al. 1991; OBERLE et al. 1993; PALMER 1989b; MUSOKE et al. 1996). Elas são expostas e podem estar envolvidas em funções de transportes de nutrientes, fixação e invasão de células hospedeiras. Epítomos de algumas destas proteínas foram demonstrados estar envolvidos na invasão através de bloqueio de anticorpos específicos (MCGAREY & ALLRED 1994) ou para mecanismo de morte celular por células *killers* mediado por anticorpos (CANTOR et al. 1993).

A MSP1a de *A. marginale*, é uma proteína de 70-100 kDa codificada por um gene de cópia única, *msp1a*, mantida na superfície por todo ciclo do período infeccioso em bovinos e em carrapatos (KOCAN & DE LA FUENTE 2003). Anticorpos específicos contra MSP1a tem mostrado redução da infectividade de *A. marginale* em bovinos pelo carrapato *Dermacentor variabilis*. O anticorpo monoclonal Ana22B1 (MAb) é utilizado por reconhecer um epítopo localizado na região de aderência de *A. marginale* de células hospedeiras, ponto fundamental para iniciação do processo infeccioso. A capacidade para induzir anticorpos neutralizantes que contribuem para a imunidade protetora em bovinos torna o gene MSP1a

como um alvo atraente para o desenvolvimento de novas vacinas (KOCAN et al. 2003; DE LA FUENTE et al. 2003; MICHELON et al. 2006; KOCAN et al. 2010).

A proteína MSP1a está envolvida na adesão de *A. marginale* em células de carrapatos e eritrócitos de bovino ocasionando o quadro de anaplasmoose bovina enfermidade (AUBRY & GEALY 2011; CABEZAS-CRUZ et al. 2013). A MSP1a possui uma região conservada repetitiva de 28-29 aminoácidos na sua porção amino-terminal, que é responsável para a adesão as células de eritrócitos de bovinos e células de carrapatos (KOCAN et al. 2003; DE LA FUENTE et al. 2003).

Os isolados de *A. marginale* apresentam variações do número de cópias desta região conservada, e tem sido usada como marcador genético da espécie (KOCAN et al. 2003; DE LA FOUNTE et al. 2003; MACHADO et al. 2015; DA SILVA et al. 2016). Também por este motivo, a MSP1a tem sido relatada ao *escape* da imunidade durante a enfermidade pelo polimorfismo em domínio onde epítomos estão associados com anticorpos neutralizantes (ALLRED et al. 1993; AUBRY & GEALY 2011; CABEZAS-CRUZ et al. 2013). Além da MSP1a, outras proteínas estão envolvidas na invasão de células hospedeiras, as proteínas, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, e MSP5 atuam no fenômeno de variação antigênica estabelecendo infecções persistentes, Figura - 4 (MICHELON et al. 2006; KOCAN et al. 2003).

As proteínas de membrana de *A. marginale*, AM779, AM854, OMP7/9 são classificadas imunologicamente como antígenos subdominantes com capacidade de estimular os linfócitos T CD4⁺ em animais imunizados (LOPEZ et al. 2008). A análise de bioinformática relata que AM779, AM854, OMP7/9 possuem regiões amplamente conservadas para epítomos de linfócitos B (DARK et al 2011). As participação destas proteínas como antígenos subdominantes geram aspectos relevantes para o desenvolvimento

de vacinas (PALMER et al. 2012; ALBARRAK et al. 2012; SETTE & RAPPUOLI 2010; LOPEZ et al. 2008).

2.6 Estado da arte das vacinas comercialmente empregadas no controle de anaplasnose.

2.6.1 Histórico

A proteção contra anaplamose bovina tem sido obtida pelo desenvolvimento de vacinas com cepa de *Anaplasma marginale* atenuada (RISTIC et al. 1968). A cepa é submetida a mutação por exposição de radiação, além de repiques em cervídeos e ovelhas. Este processo gera resposta imunológica humoral e celular (RISTIC & CARSON 1977). A utilização da vacina atenuada tem dado resultados contraditórios, sendo inócua em um e gerado em outro (TURTON et al. 1998; BOCK & DE VOS 2001). Nos Estados Unidos vacinas derivadas de eritrócitos parasitados tratados são utilizadas, há relatos de casos graves de reações colaterais nos animais vacinados, no Brasil essa prática não é permitida, pois a utilização deste método pode gerar a propagação iatrogênica e disseminação de outros patógenos. (GONÇALVES 2000). Além disso, as desvantagens são o elevado custo de produção, eficácia, e a dificuldade de se manter uma cadeia de distribuição.

O emprego de proteína purificada da membrana externa de *A. marginale* tem gerado proteção de animais desafiados tanto com isolados homólogos ou heterólogos (TEBELE et al. 1991; PALMER et al. 1994b). A imunização de bovinos com proteínas de superfície de *Anaplasma centrale* atenuada ou proteínas recombinantes MSP1, induz proteção com redução significativa do quadro de anaplasnose, em comparação com animais imunizados apenas com adjuvantes e desafiados com *A. marginale* (PALMER et al. 1986; 1988a; 1989b). A proteção

gerada pela imunização de animais com antígeno MSP1 de *Anaplasma centrale*, é na verdade, um complexo proteico contendo MSP1a/MSP1b, MSP2 que protegem os animais imunizados de isolados de *A. marginale* homólogos ou heterólogos.

A imunização dos animais com este tipo de vacina demonstra que os polipeptídeos da membrana externa de *Anaplasma centrale* são responsáveis pela resposta protetora contra anaplasmosse aguda. Entretanto, a proteção não é uniforme ou completa. A proteção vacinal completa pode ser obtida avaliando formulações vacinais com novos adjuvantes, variando quantidade de proteína na dose, ou a inclusão de diferentes imunógenos na composição vacinal (MUSOKE et al. 1996).

A pesquisa e o desenvolvimento de vacinas recombinante obtida da fermentação de microrganismos geneticamente modificado reduz o custo de produção e pode fornecer uma padronização na produção de vacinas contra anaplasmosse (PALMER 1989a). Para obtenção de antígenos recombinantes o vetor de expressão pET102msp1a em *Escherichia coli* tem sido utilizado para obtenção de MSP1a de *A. marginale*. Tem sido utilizado a expressão conjugada com o antígeno MSP1b em plasmídeo pET101msp1b em *E. coli* (TAMEKUNI et al. 2009) ou conjugado em quimera com proteína de carrapato (DE LA FUENTA et. al., 2011). Outro vetor, pQE30 em *Mycobacterium*, tem sido empregado para produção de proteína de *A. marginale* (MICHELON, et al. 2006).

Uma nova estratégia que vem sendo utilizada é aplicação de peptideos sintéticos. A utilização dos peptideos STSSQL e SEASTSSQLGA em grupos de camundongos Balb/c apresentou redução do número de eritrócitos infectados em comparação ao grupo controle (SANTOS et al. 2013). No entanto, alguns sinais clínicos da infecção foram observados como perda de peso ou mesmo morte após infecção com dose de 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* (SANTOS et al. 2013).

Até o momento, nenhuma das vacinas utilizadas alcançou todos os fatores desejáveis que justificassem sua produção, eficácia, inocuidade, confiança, baixo custo de produção e cadeia de distribuição eficiente. Assim, o desenvolvimento de vacinas recombinantes ainda acumula confiança ao produto final. Como a doença causa graves perdas econômicas em economias exportadoras de derivados bovinos novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas continuam imprescindíveis para minimizar este impacto.

2.6.2 Candidatos à vacinas recombinantes

A cepa de *A. marginale* por ser uma bactéria intracelular obrigatória requer condições especiais de cultivo, tais como, aquisição de meios de cultura específicos e dispendiosos, e o uso de célula hospedeira para infecção e parasitismo (HOPE et al. 2004). Vacinas recombinantes tem sido uma alternativa para atender essa demanda de produção de antígenos. Genes codificados como *msps* foram identificados como candidatos vacinais por induzir simultaneamente respostas direcionadas a linfócitos B e T (BROWN et al. 1998; 2001; PALMER et al. 1999). Os genes *msp2*, *msp4*, *msp5*, *opag2*, e *opag3* de *A. marginale* são considerados genes ortólogos e estão presentes em formulações vacinais de cepa viva de *Anaplasma centrale* (SHKAP et al. 2002ab; MOLAD et al. 2004). Esses genes são conservados e suas formulações vacinais já mostraram algum avanço na proteção cruzada a diferentes estirpes de *A. marginale* (BROWN et al. 1998; 2001; PALMER et al. 1999).

A obtenção de antígenos recombinantes tem utilizado o emprego de vetores de *Escherichia coli*. Atualmente, a construção de vetores em *Escherichia coli* é direcionada principalmente aos genes *msp1a* devido sua importância comprovada pela adesão em células hospedeira (MCGAREY et al. 1994; DE LA FUENTE et al. 2001c). A *Mycobacterium*

também tem sido empregado para produção de proteína MSP1a recombinante (MICHELON et al. 2006).

A expressão conjugada de subunidades MSP1a e MSP1b de *A. marginale* também tem sido utilizado em *Escherichia coli* com relativa eficácia (TAMEKUNI et al. 2009). Segundo autores, o conjugado das subunidades MSP1a/MSP1b foram construídos contendo um segmento estrutural com 6 resíduos de histidinas na caudal como estratégia de purificação e os resultados foram satisfatórios (TAMEKUNI et al. 2009).

As proteínas AM779, AM854 estão intimamente relacionadas a três proteínas, OMPs 7/8/9 ou OMP7/9. As proteínas OMP7/9 são codificadas por três genes em conjunto em *A. marginale* St. Maries apresentando de 70 a 75% de similaridade para as três OMPs (BRAYTON et al. 2005; NOH et al. 2006). Segundo Palmer et al. (2012), estas proteínas AM779, AM854 e OMP7/9 são consideradas proteínas importantes no processo de infecção do parasita e candidatas a uso como vacinas recombinantes. As proteínas AM779, AM854 e OMP7/9 possuem epítomos conservados direcionados a linfócitos B e são consideradas como antígenos imunologicamente subdominantes com capacidade de estimular os linfócitos T CD4 + (DARK et al. 2011; LOPEZ et al. 2008).

2.6.3 Regiões imunodominantes da proteína MSP1a

O complexo MSP1 é constituído por MSP1a e MSP1b. A proteína MSP1b possui três (3) regiões denominadas de MSP1b1, MSP1b2 e MSP1b1 pg. Sequências de aminoácidos destas regiões revelam polipeptídios com elevada homologia global (VISESHAKUL et al. 2000). Entretanto, as regiões do polipeptídeos MSP1b2 possuem numerosas substituições de aminoácidos em comparação ao MSP1b1. Estas substituições podem estar envolvidas na diversidade antigénica e reconhecimento do sistema imune (VISESHAKUL et al. 2000).

Varios estudos reportaram sequencias imunodominantes. Em um deles, duas sequenicas imunodominantes STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL e SEASTSSQLGAGGGSSEASTSSQLGA foram demonstradas pela resposta humoral com animais com anaplasiose (SANTOS et al. 2013).

Estudos mostraram regiões repetidas na MSP1a e que foram preditas como epitopos B. Estas sequências foram reconhecidas por anticorpos monoclonais (KANO et al. 2008; SANTOS et al. 2013). Tais regiões são conservadas entre cepas heterólogas de *A. marginale* (PALMER et al. 1986; MCGAREY & ALLRED 1994). Outro estudo identificou outra sequência SSAGGQQQESS imunodominante a partir de soros animais infectados com anaplasiose (SANTOS et al. 2013). Em experimentos com bezerros imunizados com peptídeos SSAGGQQQESS observaram proteção parcial dos animais após desafios com cepas homólogas e heterólogas de *A. marginale* (CANTOR et al. 1993; ONATE et al. 2003; SANTOS et al. 2013). E por fim, estudo mostrou que a sequência YLHSNVEQATKDLMASEFAMMTFGGIMTCA foi considerada uma região conservada e corresponde a uma proteína transmembrana presentes nos polipeptídeos MSP1b1, MSP1b2 e MSPb1pg (BARBET & ALLRED 1991). Esta sequencia apresenta potencial para aplicação de vacinas recombinantes.

2.7 Justificativa

A anaplasiose bovina se caracteriza por anemias de moderada a graves, febre, perda de peso, diminuição da produção de leite, aborto e morte nos animais, e por conseguinte levando os países produtores de gado bovino a perdas econômicas. Até o momento, nenhuma das vacinas acumulou todos os requisitos, tais como a eficácia, inocuidade, baixo custo de produção e cadeia de distribuição eficiente. O desenvolvimento de vacinas recombinantes

ainda acumula desconfiança e novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas continuam sendo imprescindíveis para minimizar este impacto.

Neste estudo, produzimos uma proteína recombinante de *A. marginale* a partir de uma estratégia inovadora de utilizar DNA sintético codificando epítomos dos principais antígenos de *A. marginale* em uma proteína só. Os resultados obtidos nessa tese credenciam a proteína quimérica como um potencial candidato vacinal, pois os camundongos Balb/c vacinados continuaram sem sintomatologia após 56 dias de desafio com uma dose subclínica. E como o mercado ainda confia no desenvolvimento de uma vacina contra anaplasmoze bovina, nós acreditamos que esta estratégia inovadora de DNA sintético com mais epítomos imunodominantes poderá alcançar o objetivo de minimizar o impacto desta doença.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a proteção vacinal de camundongos Balb/c imunizados com proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 de *A. marginale* emulsificada em adjuvante oleoso e desafiados com cepa virulenta *A. marginale* UFMG2.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar hidrofobicidade, acessibilidade, antigenicidade e flexibilidade de regiões protéicas de MSP1a e OMP7/9 para obtenção e síntese química de sequencia gênica *msp1a/omp7/9*.
- Clonar sequência gênica obtida correspondente aos epítomos de MSP1a/OMP7/9 em plasmídeo pGEM
- Subclonar o gene *msp1a/omp7/9* em vetor de expressão pHT43 e transformar em *Escherichia coli*.
- Purificar a proteína MSP1a/OMP7/9 com uso de coluna de afinidade Ni-NTA superflow 6xHis tagged QIAGEN.
- Comprovar a antigenicidade da proteína MSP1a/OMP7/9 com soro primário oriundo de bezerros com anaplasmoses aguda.
- Realizar ensaios imunológicos em Balb/c com a formulação vacinal constituída de MSP1a/OMP7/9 emulsificada em adjuvante ISA 50 V2 e posterior desafio com cepa patogênica de *A. marginale* UFMG2.
- Avaliar a resposta imune por exames hematológicos, bioquímicos e leucogramas dos grupos experimentais imunizados e desafiados cepa patogênica de *A. marginale* UFMG2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ferramentas de Bioinformática usada na seleção de epítomos vacinais

Os programas computacionais foram empregados na análise de epítomos dominante de MSP1a e subdominante OMP7/9 de *A. marginale* Genbank: JN564640.1 Stains Maries (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Essas regiões de *A. marginale* foram preditas com uso da ferramenta de bioinformática *Immune Epitope Database Analysis Resource* – IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/main>).

Avaliaram sequências gênicas do aminoácido 15º ao 153º ao MSP1a e 1º ao 58º aminoácidos das OMP7, OMP8 e OMP9 (Figura - 5). As predições de aminoácidos das proteínas OMP7/9 e de MSP1a permitiram determinar regiões potenciais para desenho de gene sintético. O gene sintético de regiões selecionadas foi quimicamente sintetizado e adquirido pela empresa IDT. Foi adicionada ao gene sequência gênica correspondente à histidina na extremidade aminoterminal da proteína. Esta inclusão permite utilização na etapa de purificação. Para a seleção das regiões potenciais de MSP1a e OMP7/9 foi considerado em cada epítomo a relação de antigenicidade, flexibilidade e a capacidade de estimular resposta a linfócitos B e T (Figura – 5).

A

OMP7 MVRSFLLGAVVACTIAFGSSAVAAGFGGDDTDFYLGFLGAPAFGSVADFYAEVPGAADSALPYRKDAIGGGETSPFDWEGSGTKGSKYPIKFQHSPPFGVVGSVGVRYSTGRLELEAVRERFPIMKV
SGRAWTKGDSMFLLVDDAIVRLVTGQIDSDPAAALRALSSSTQYELHNLADALSSEIGARTGQGDCLKHVGASSVDALTATKLVAALGHRHGRVAYPTAMKKRAMILLSAAARVKSADIVK
KRSMILTALGRIGGYKIEIPAVAANTFGANYCYDVSTVNMGGLSPYGCVGIGMSFLKVAKTGTTPRFTYGAKLGVSYLESPQASIFVDGAYRRVMEYKEQCR

OMP8 MVRSFLLSAVVVGAIAGSSAVAAGFGGDDTDFYLGFLGAPAFGNVADFYAEVPGAADSALPYRKDAIGGGETSPFDWEEESGTKGSKYPIKFQHNSLFGVVGSGIVRHSTGRLEFEAMRERFPIMKV
SGRVWAKGDSMFLLVDDAVVRVATGQRGVNDSDSKTVKSLSKALPEHRDFLSLEDALTARQDFMVQKGTLSYTGASTDDAAAAAKIVAMAYGRQFGKVDLTPERRRKAMLLAAATAVGEEER
EIVKRAHMIRAAFGSIGGHKIEIPAVAANTFGANYCYDVSTVNMGGLSPYGCVSAGMSFLKVVKNVSKFTYGAKLGVSYLESPRARVFGGAYRRVMGYGERCRVSTLSAASGYREYTERENIRAR
VSFGLHYLALEAGLRFLA

OMP9 MVRSFLLSAVVAGALAFGSSAVAAGFGGDDTDFYLGFLGAPAFGDVADFYAEVPGAADSALPYRKDAVGSWETSPFDWEGSGTKGSKYPIKFQRRSLFGMVGSVGVVHNSRLEFEAACERFPVM
KVSGRWAKGDSIFLLVDDAVVRVATGQRSAGDTDNQAVKSLHDLTVEHADLDALFSALNTAIQQRKTAHREGGALTHTGTTREDALAATQIVARAWGRKYSGGGLGAAETRRRAALLAAAR
VGAEREIVEKAHMIGIALGGIGGYRIKIPAVVANTFGANYCYDISTVNVRLSPYGCVSIGMSFLKVAENSAPKFTYGAKLGVSYLESPRARVFDGAYRRAVEYNERCRVSTLSAASDYS

MSP1a MSAEYVSTQSDSSASGQQQESSVSSQSEASTSSQLGADSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLGADSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLGADSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLGADSSAG
GQQQESSVSSQSDQASTSSQLGTDWRQEMRSKVASVEYMLAARALISVGVYAAQGEIARSGCAPLRVAEVEEIVKDGLVRSHFHDSSGLSLGSIRLVLMQVQKGLGLQGLKIGEGYATYLAQAFADSVV
VAADVQSSGACSASLDSATANVETSWSLHGGLVSKGFDRDTKVERGDLEAFVDFMFGGVSYNDGNASARSVLETLAGHVDALGISYNQLDKLDADTLYSVVSFSAGSAIDRGAVSDAADKFRVM
MFGGAPAGQEKTAEPHEEAATPSASSVPSTVHGKVDDAVDRAKEAAKQAYAGVRKRYVAKPSDTTTTQLVVAITALLITAFACACLEPRLIGASGPLIWGCLALVALLPLIGMAVHTAVSASSQKK
AAGGAQRVAQERSELSRARQEDQQLHVPAILTGLSVLVFIAAVVACIAVDARRGTWQGSICFLAAFLVAISAAVVMATRDQSLAEEDSKCATARTAQAVPGGQQPRATEGVVSQGGQEGGA
GPGTSVPSAESGAVPPATIMVSDPQLVATLGAGVAQAAA

B

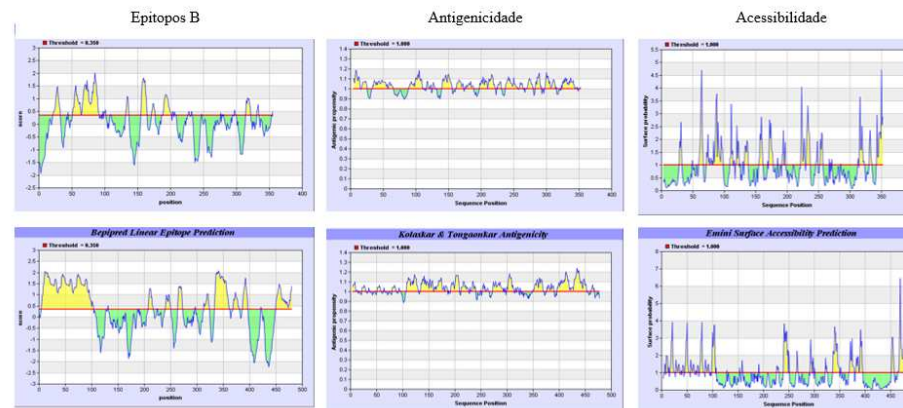


Figura – 5 Proteínas OMP7/9 e MSP1a de *A. marginale* (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries). Alinhamentos de aminoácidos (A). Análises de antigenicidade, acessibilidade e estímulos linfócitos das proteínas Omp7/9 (B) e MSP1a (C). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>. Software disponível em <http://tools.immuneepitope.org/main>

4.2 Gene Sintético – IDT e Clonagem do gene *msp1a/omp7/9*

O gene sintético *msp1a/omp7/9* com sequência de epítópos dominantes de MSP1a e Omp7/9 de *A. marginale* (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries) (Figura – 6), foi obtido pela empresa IDT com alterações em seus códons que permitiram uma correta expressão no hospedeiro *Escherichia coli* cepa DH5αF'IQ sem alteração da sequência original da proteína e contendo sítios para as enzimas de restrição *BamHI* e *Sma I*.

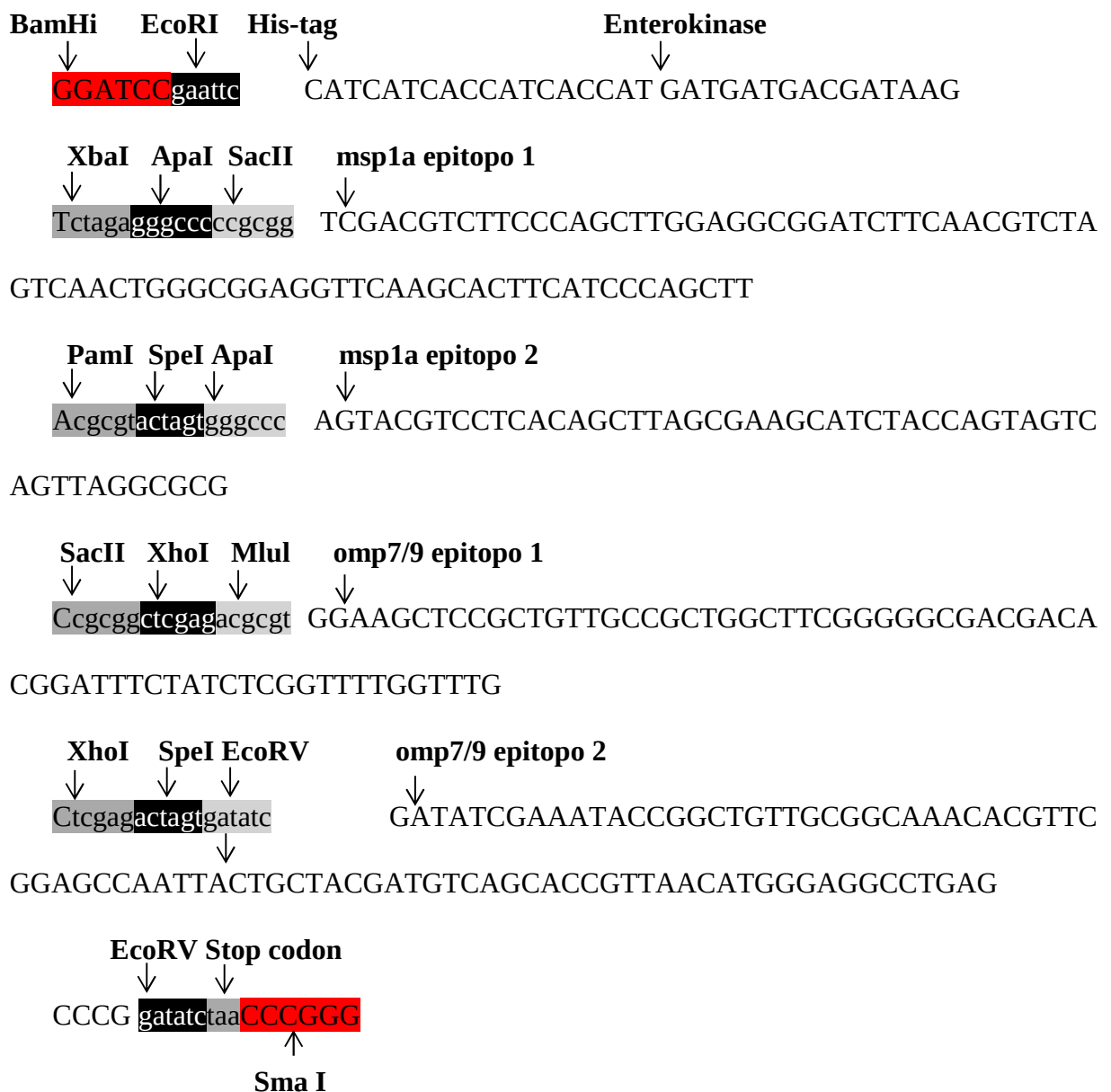


Figura – 6 Gene sintético *msp1a/omp7/9* de *A. marginale* Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries. Enzimas, His-tag, epítópos e stop códon estão destacados em negrito.

O gene quimérico foi clonado no plasmídeo pGEM Easy T pela reação com DNA Ligase (Figura – 7). O plasmídeo contendo o fragmento DNA alvo de *A. marginale* foi inserido em *Escherichia coli* por eletroporação com 1900mv e semeadas em meio LB agar contendo 100µg/µl ampicilina, 0,1 µM IPTG, 40 µg/ml X-gal (LB amp IPTG X-gal) para seleção de colônias brancas de *Escherichia coli* pGEM-*msp1a/omp7/9* resistentes. Várias colônias brancas transformantes foram incubadas para extração plasmidial conforme protocolo Miniprep (QIAGEN) e verificação da clonagem por PCR.

4.3 Construção vetor expressão pHT43-*msp1a/omp7/9*.

Após a seleção da colônia contendo o plasmídeo recombinante pGEM-*msp1a/omp7/9*, o mesmo foi extraído conforme especificações do fabricante QIAGEN e analisado em gel agarose 1%. Em seguida, procedeu à digestão do plasmídeo pGEM-*msp1a/omp7/9* com enzimas *BamHI* e *SmaI* e análise em gel agarose 1%. Em seguida foi realizado a digestão do vetor de expressão pHT43 e do pGEM/*msp1a/omp7/9* com *BamHI* e *SmaI* (Figura – 8). Após corrida em gel agarose identificou bandas correspondentes ao fragmento clonado *msp1a/omp7/9* e bandas do plasmídeo pHT43. Foram realizados cortes das bandas correspondentes com purificação do fragmento utilizando kit QIAGEN, seguindo as especificações do fabricante. A ligação do fragmento *msp1a/Omp7/9* purificado ao vetor pHT43 foi realizada com uso da DNA ligase a 16°C overnight.

Gene Sintético *msp1a/omp7/9*

msp1a epitopo 1

BamHI EcoRI-His-tag-Enterokinase-XbaI-ApaI-SacII-TCCGACGTCTT CCCAGCTGGG GGGCGGATCT TCAACGTCTA GTCAACTGGG CGGAGGTTCA AGCACTTCAT CCCAGCTT-

msp1a epitopo 2

omp7/9 epitopo 1

PamI-SpeI-ApaI-AGTACGTCTT CACAGCTTAG CGAAGCATCT ACCAGTAGTC AGTTAGGCGCG-SacI-XhoI-MluI-GGAAGCTCCG CTGTTGCCGC TGGCTTCGGG

omp7/9 epitopo 2

GGCGACGACA CGGATTTCTA TCTCGGTTTT GGTTCG-XhoI-SpeI-EcoRV-GAAATACCGG CTGTTGCCGC AAACACGTTT GGAGCCAATT ACTGCTACGA TGTCAGCACC
GTTAACATGG GAGGCCTGAG CCCG-EcoRV-Stop Codón-SmaI

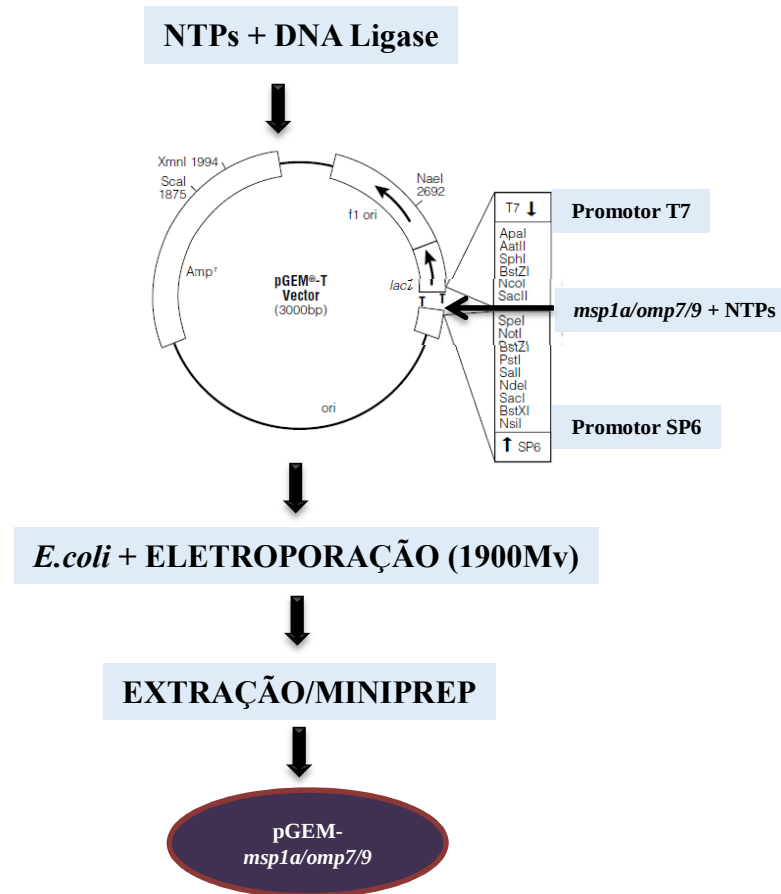


Figura – 7 Fluxograma da etapa de clonagem e extração plasmidial do genes *msp1a/omp7/9* de *A. marginale* (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries) em plasmídeo pGEM EASY 3000bp.

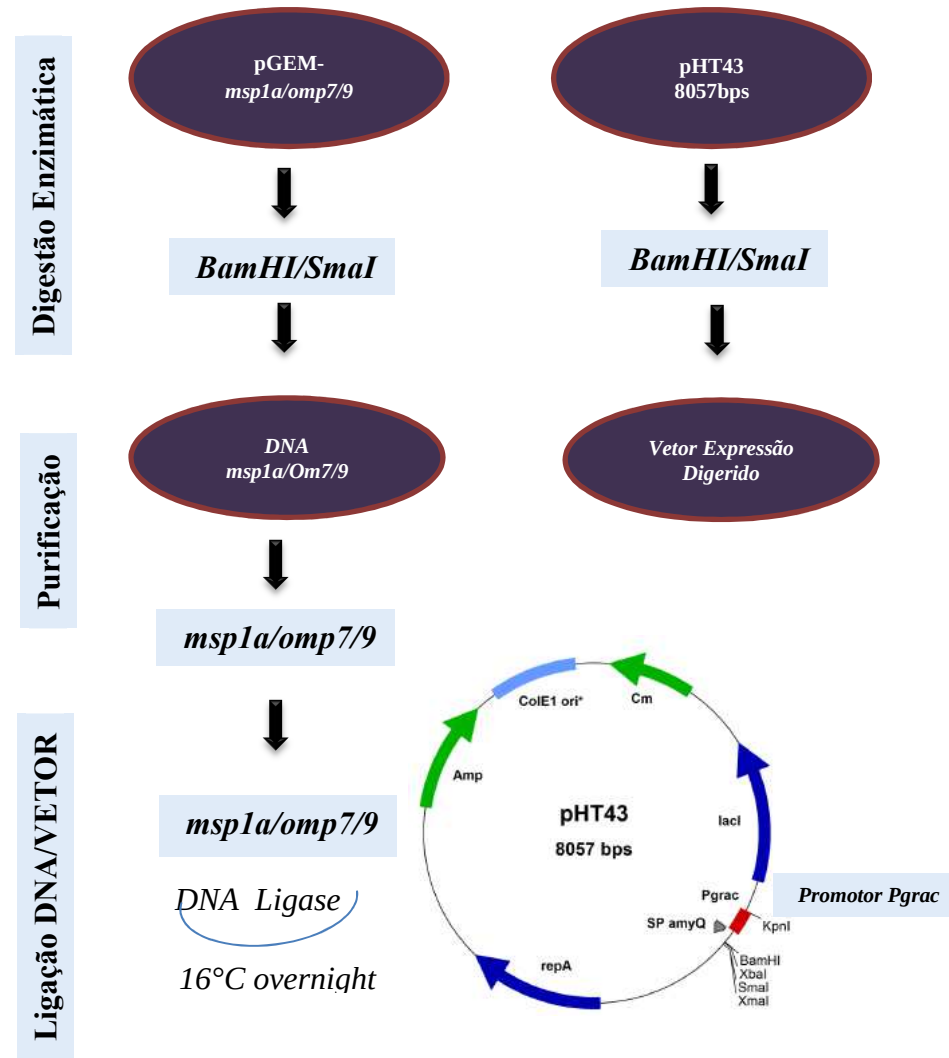


Figura – 8 Fluxograma da etapa de subclonagem genes *msp1a/omp7/9* de *A. marginale* (Genbank: JN564640.1 Str. St. Maries) em plasmídeo pHT43 8057bps.

Após subclonagem do fragmento *msp1a/omp7/9* ao vetor pHT43 realizou a transformação do plasmídeo pHT43-*msp1a/omp7/9* em células de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ. A transformação de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ com vetor expressão pHT43-*msp1a/omp7/9* foi realizada pelo método de transformação química com CaCl₂ seguida de incubação a 37°C por 1 hora. As culturas de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ transformadas foram incubadas em meio LB contendo ampicilina para certificar transformantes contendo o plasmídeo pHT43-*msp1a/omp7/9*. Uma fração da cultura incubada foi coletada para extração plasmidial e comprovação da transformação de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ com plasmídeo pHT43-*msp1a/omp7/9*. Estes procedimentos permitiram a confirmação da subclonagem do plasmídeo pHT43-*msp1a/omp7/9* em *Escherichia coli* DH5 α F'IQ. Cultivo de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ foi realizado em meio LB com ampicilina e induzidas com IPTG para análise da expressão da proteína recombinante.

4.4 Determinação da massa molecular da proteína MSP1a/OMP7/9

A massa molecular da proteína MSP1a/OMP7/9 foi realizado utilizando software *ProtParam tool* proposto por Gasteiger et al 2005 e disponível em <http://web.expasy.org/protparam>. A predição realizada determinou massa molecular de 17Kda, confirmadas nas etapas experimentais.

4.5 Análises de sistemas de indução de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ com pHT43-*msp1a/omp7/9*

A expressão da proteína MSP1a/OMP7/9 em *Escherichia coli* DH5 α F'IQ foi avaliada sob dupla indução de IPTG 1Mm em meio de cultura LB com ampicilina a 37°C. Nas primeiras horas de cultivo até crescimento até alcançar D.O600nm (0,6) a temperatura foi mantida a 37°C. Em seguida adicionou IPTG 1mM com ajuste da temperatura para 28°C. Uma segunda indução com IPTG 1mM foi realizada após 8 horas da primeira indução. Amostras foram coletadas no tempo zero (0) antes da indução, oito (8) horas após primeira indução, dezesseis (16) horas após primeira indução.

Avaliaram ainda os sistemas de indução com lactose e por autoindução. No cultivo induzido com lactose, após a cultura atingir a D.O600nm (0,6) adicionou a concentração de 10g/L de lactose permanecendo a 37°C por 16h. No sistema de autoindução utilizou meio LB enriquecido com solução 50X 5052 e solução 20X NPS. Para produção de 50 mL de meio LB enriquecido foi necessário 46,5mL de meio LB acrescido de 1mL da solução 50X 5052, 2,5mL de solução 20X NPS, 50 μ L MgSO₄ 1M e 50 μ L ampicilina. A solução 50X 5052 foi composta por 12,6g/mL glicerol, 25g/L glicose, 100g/L lactose. A solução 20X NPS por NH₄SO₄ 66 g/L, KH₂PO₄ 136 g/L, NaHPO₄ 142g/L pH 6,75. No cultivo de autoindução a colônia inoculada em meio LB enriquecido foi incubada a 37°C sob agitação por 16h.

Amostras dos cultivos induzidos por foram IPTG, lactose ou autoindução foram tratadas com tampão desnaturante constituído por glicerol 20% v/v; SDS 4% p/v; Tris pH 6,8 100mM; Azul de bromofenol 0,2% p/v; beta-mercaptoethanol 200mM. As amostras foram fervidas por 10 min e analisadas em gel SDS PAGE 15%. As amostras foram aplicadas ao gel na proporção de 2 μ l amostra e 18 μ l de tampão desnaturante.

4.6 Caracterização da antigenicidade de MSP1a/OMP7/9 por SDS-PAGE, *Western Blotting*

Ao final do cultivo foi realizada a lise celular da cultura de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ transformada. Toda cultura foi centrifugada a 4000 g por 10 min. No *pellet* obtido correspondente a 50mL de cultura foi adicionado 2,5mL de tampão MCAC constituído de 20mM tris pH 7.9; 0,5% p/v NaCl; 10% v/v de glicerol. Adicionou em seguida 25 μ L de triton-X100. Realizou congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C em banho-maria para a ruptura celular. Ao final as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 15min.

O lisado de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ transformada foi filtrado em membrana 0,22 μ m e purificado por cromatografia por afinidade utilizando Ni-NTA superflow 6xHis tagged QIAGEN. A purificação foi realizada com uso de tampões constituído de Tris 20mM pH 7,9; 0,5M NaCl, e 10% v/v de glicerol ajustados a valores de pH 8, 6 e 3. Tampão com pH 8 foi utilizado na etapa de ligação, pH 6 na etapa de lavagem, pH 3 na etapa de eluição.

A purificação foi iniciada com passagem do tampão pH 8 correspondentes a 10 vezes o volume da coluna, com fluxo de 1,5mL/min. Em seguida foi adicionado à coluna Ni-NTA superflow 6xHis tagged QIAGEN o lisado previamente filtrado ao mesmo fluxo operacional. Após passagem do volume do lisado, adicionou com fluxo de 1,5mL/min o tampão pH 6 com 10 vezes o volume da coluna para retirada de proteínas indesejadas sem afinidade com a coluna. Na ultima etapa seguindo o mesmo volume e fluxo anteriores foi adicionado o tampão pH 3 para eluir a proteína alvo. Nesta etapa coletaram frações em microtubos e armazenados a -20°C. Após utilização, a coluna Ni-NTA superflow 6xHis tagged QIAGEN foi armazenada com solução de etanol 20% a 4°C. Amostra da proteína MSP1a/OMP7/9 purificada foi preparada e analisada em gel SDS-PAGE 15%. Após realizou análises por *Western blotting*.

No procedimento de *Western blotting* banda da proteína purificada no Gel SDS-PAGE 15% foi transferida para membrana de nitrocelulose seguido o protocolo BioRad. Utilizou o anticorpo primário oriundo soro de bezerros com anaplasmoze bovina obtido em fazenda na região de Gurupi, Estado do Tocantins. No controle negativo foi utilizado soro de bezerros saudáveis. O anticorpo secundário *Anti-Bovine IgG - rabbit A8917* Sigma conjugado com peroxidase na proporção 1:2.000 e 0,05%v/v do substrato 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) foram utilizados para certificar a reatividade com a proteína MSP1a/OMP7/9.

4.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

A quantificação de IgG das amostras sorológicas (T0), (T1), (T2), (T3) de grupos experimentais foram realizadas por ELISA correspondentes aos dias 21, 42 e 56, respectivamente, antes do desafio com 3×10^5 cel/mL *A. Marginale* (Santos et al. 2013; Silvestre et al 2014). Foram utilizadas microplacas de 96 poços (Nunc MaxiSorp®) contendo 100µL solução tampão pH 9.6 com concentração de 2µg/poço de MSP1a/OMP7/9. A placa foi sensibilizada *overnight* à 4°C. Após, os poços foram bloqueados com 100µL de solução de PBS-caseína (2%) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas por (4) vezes com solução PBS-Tween 20 (0,05%).

Soros de animais de grupos experimentais foram diluídos na proporção de 1:50 em solução PBS-Tween 20 (0,05%). Foram adicionados aos poços 100µL de soro diluídos (1:50), em seguida incubou *overnigh* à 4°C. Após, a placa foi lavada por (3) vezes com PBS-Tween 20 (0,05%). Foi adicionado 100µL de *anti-mouse IgG peroxidase conjugate* (Sigma, USA) na proporção de 1:10.000 com uso de solução PBS-Tween-caseína (0,25%). A placa foi protegida da luz e incubada *overnigh* a 4°C. Lavou por (3) vezes com solução PBS-Tween 20 (0,05%). Adicionou 50µL de TMB (BD Biosciences, USA). A reação foi bloqueada com 32µl

de H_2SO_4 2,5M. A leitura da densidade optica foi medida à 450nm e os valores superiores ao *cut off* foram considerados positivos. O *cut off* foi determinado pela média de leitura do controle negativo somados a duas vezes o desvio-padrão.

4.8 Formulação da vacina oleosa.

A proteína recombinante purificada foi emulsificada em óleo ISA 50 V2 SEPPIC. A fase aquosa da vacina foi constituída por 22% de proteína e a fase oleosa por 78% de óleo ISA 50 V2 SEPPIC. A emulsão vacinal foi realizada com uso de duas (2) seringas de 10mL esterilizadas e conectadas entre si por meio de mangueira de silicone. Adicionou o volume das frações aquosa e oleosa na seringa com passagem forçada de todo o volume para outra seringa por 10 min. A concentração final de proteína recombinante na vacina formulada foi correspondente a 0,144 μg /mL.

4.9 Imunizações de camundongos Balb/c.

O grupo experimental foi constituído por camundongos Balb/c de 7 meses de idade divididos em 4 grupos. Grupos de sete (7) camundongos Balb/c foram destinadas avaliação da proteína recombinante associada à PBS, e sete (7) camundongos Balb/c destinada a avaliação da proteína recombinante emulsificada em óleo ISA 50 V2. Grupos de cinco (5) camundongos Balb/c foram destinados a avaliações isoladas do óleo ISA 50 V2 e cinco (5) camundongos Balb/c para PBS, constituindo o grupo controle do experimento (Figura – 9).

Em cada grupo experimental o volume de 100 μl da fomulação foi inoculado nos animais por via intramuscular. No grupo de animais imunizados a concentração da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 na vacina foi de 0,144 μg /mL. As imunizações foram

realizadas nos tempos 0, 21, 42 dias após primo-vacinação. Amostras de soro dos animais foram coletadas em cada tempo para quantificação de anticorpos específicos (WANG et al. 2015).

O nosso projeto de pesquisa foi submetido sob número 23101.003595/2015-15 e aprovado para a sua execução pelo parecerista da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins - UFT. O documento de aprovação está em anexo.

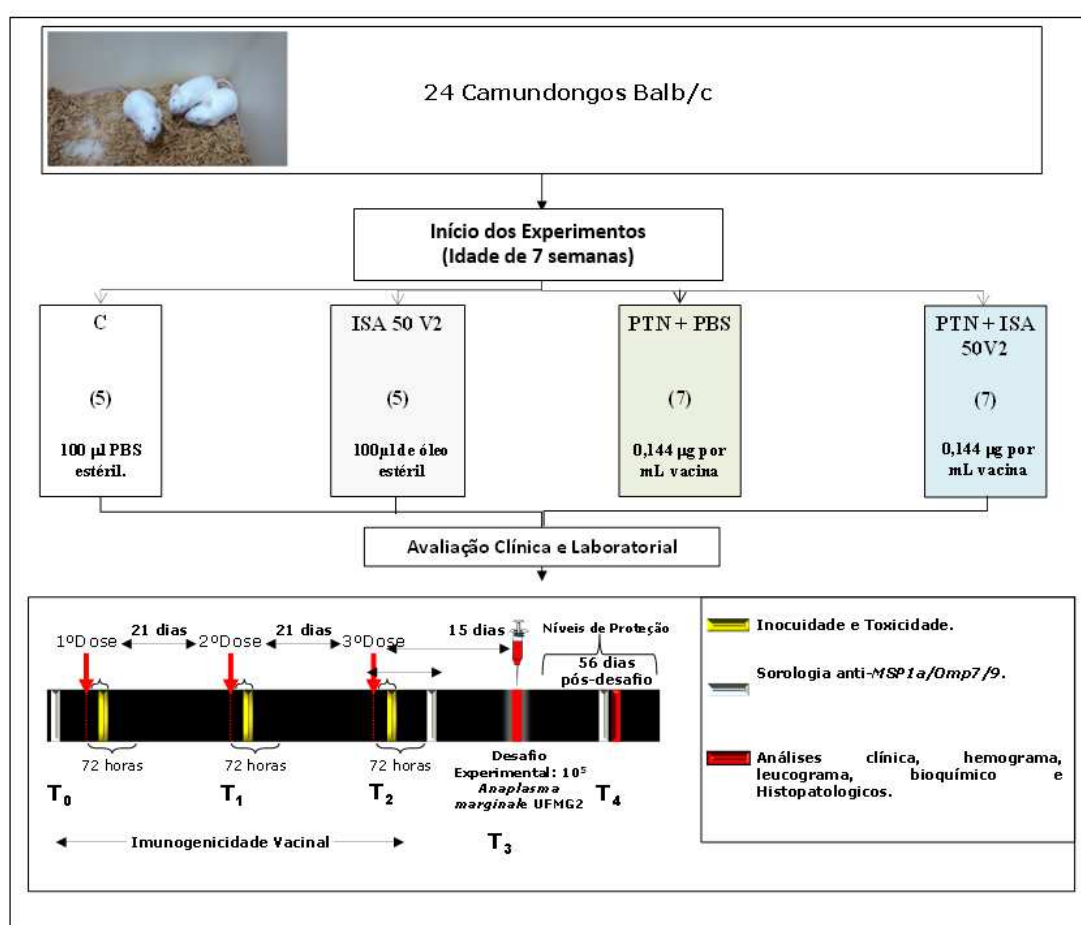


Figura – 9 Fluxograma ilustrando os grupos experimentais e as etapas de testes pré-clínicos. Foram utilizados 24 camundongos Balb/c divididos em quatro (4) grupos experimentais: PBS; ISA 50V2; PTN +PBS E PTN +ISA 50 V2. Esses animais foram submetidos a três (3) doses de vacina em intervalos 21 dias e submetidos ao desafio experimental com *A. marginale* UFMG2. Foram inoculados 100µl da formulação em cada grupo experimental (Silvestre et al. 2014) e quantificados níveis de IgG (Wang et al. 2015).

4.10 Teste desafios com *A. marginale* UFMG2.

A cepa de *A. marginale* UFMG2 foi gentilmente cedida pelo Departamento de Parasitologia do Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O protocolo de infecção e recuperação do parasita seguiu conforme o treinamento realizado no ICB/UFMG. A cultura de células IDE8 de carrapatos foi incubada em meio de cultura L15B completo suplementado com 7% de soro fetal bovino sem antibiótico. O parasita *A. marginale* UFMG2 foi inoculado na cultura de células IDE8 e incubado a 34°C por 15 dias. Em seguida foi adicionada a solução de tripsina para descolamento das células hospedeiras.

Foi realizada a centrifugação da cultura a 9000 x *g* a 4°C por 20 min. O *pellet* celular foi ressuspenso em 5mL de PBS 1X e centrifugado a 9000 x *g* a 4°C por 20 min. Após o *pellet* celular foi ressuspenso novamente com 1,5mL de PBS 1x. A ruptura da célula IDE8 e a liberação do parasita foram realizadas por passagem do *pellet* em seringa estéril tipo insulina com agulha dobrada por 15 vezes. Após esta etapa realizou a centrifugação a 200 x *g* a 4°C por 20 min e a coleta do *A. marginale* UFM2.

A cultura de *A. marginale* foi quantificada por câmara de Neubauer com concentração de $6,54 \times 10^6$ cel/mL. A dose desafio foi preparada com solução de inoculação constituída por soro fetal bovino, glicose e PBS1X. Todos os camundongos Balb/c foram desafiados com uma dose subclínica de 3×10^5 células infectadas/mL de *Anaplasma marginale* cepa UFMG2. Os animais foram observados por 56 dias acompanhando a variação de peso, observações de mortes, sinais clínicos de agressividades, mudança na coloração e características do pêlo.

Ao final de 56 dias foram coletadas amostras de sangue dos animais sobreviventes para realizações de hemogramas e leucogramas. Em seguida foram eutanasiados e coletados fígados e baços de camundongos Balb/c dos grupos experimentais. A carga bacterêmica de *A. marginale* dos grupos experimentais foi realizada conforme Silvestre et al. 2014. O esfregaço

sanguíneo dos grupos experimentais foi realizado por coloração hematoxilina-eosina. A Figura – 9 descreve as etapas de testes pré-clínicos avaliados em camundongos Balb/c.

4.11 Análise estatística

As diferenças entre grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA. Teste *t* de Student foi utilizado para comparação da perda de peso corporal de camundongos Balb/c, leucograma, eritrograma, creatinina, ureia, carga parasitária. O valor de $p(0,05)$ foi considerado significativo estatisticamente. A análise foi realizada utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do gene sintético e predição de sítios dos epítomos dominantes MSP1a e subdominate OMP7/9.

As análises computacionais permitiram obter informações de regiões potenciais das proteínas OMP7/9 e MSP1a e inclusão de sua sequência na composição do gene sintético. A Figura – 10A ilustra o mapa gênico correspondente a proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 de *A. marginale*. O alinhamento dos aminoácidos da proteína MSP1a/OMP7/9 de massa molecular de 17Kda obtida pelo software *ProtParam tool* está descrita na Figura - 10B.

5.2 Clonagem do gene sintético em pGEM e subclonagem em vetor expressão pHT43.

A Figura – 11A mostra o perfil eletroforético comprovando bandas de plasmídeos de colônias de *Escherichia coli*. Nesta figura é observado os estados conformacionais superenovelados, relaxado e linearizado dos plasmídeo pGEM-*mSP1a/omp7/9*. As bandas correspondente ao pGEM-*mSP1a/omp7/9* e do vetor de expressão digeridos estão presentes na Figura - 11B. O fragmento correspondente a *mSP1a/omp7/9* com 400pb, esta visualizado juntamente com o vetor de expressão linearizado (Figura – 11C).

Na Figura – 11D observa o fragmento *mSP1a/omp7/9* de *A. marginale* purificado e a Figura 11E o perfil eletroforético de nove (9) colônias transformadas após cultivo em meio LB com ampicilina. Verifica que dentre as células de *Escherichia coli* DH5αF'IQ apenas uma colônia apresentou a banda referente ao fragmento de *mSP1a/omp7/9* com 400pb. As demais colônias apresentaram fragmentos próximos a 800pb.

A

msp1a epitopo 1

BamHI EcoRI-His-tag-Enterokinase-XbaI-ApaI-SacII-TCCGACGTCTT CCCAGCTGGG GGGCGGATCT TCAACGTCTA GTCAACTGGG CGGAGGTTCA AGCACTTCAT CCCAGCTT-
msp1a epitopo 2 omp7/9 epitopo 1

PamI-SpeI-ApaI-AGTACGTCCT CACAGCTTAG CGAAGCATCT ACCAGTAGTC AGTTAGGCGCG-**SacI-XhoI-MluI**-GGAAGCTCCG CTGTTGCCGC TGGCTTCGGG
omp7/9 epitopo 2

GGCGACGACA CGGATTTCTA TCTCGGTTTT GGTTTG-**XhoI-SpeI-EcoRV**-GAAATACCGG CTGTTGCGGC AAACACGTTT GGAGCCAATT ACTGCTACGA TGTCAGCACC
GTTAACATGG GAGGCCTGAG CCCG-**EcoRV-Stop Codón-SmaI**

B

MIQKRKRTVS FRLVLMCTLL FVSLPITTKT SAVGSEFHHH HHHDDDDKSR GPPRSTSSQL GGSSTSSQL GGSSTSSQL TRTSGPSTSS QLSEASTSSQ LGAPRLETRG SSAVAAGFGG DDTD FYLGFG
LLETSDIEIP AVAANTFGAN DVSTVNM GGLSPDI

Figura – 10 Gene sintético IDT e o sequenciamento de peptídeo. **A** – Mapa gênico correspondente a proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 de *A. marginale* adquirido pela IDT Biotecnologia. **B** – Sequenciamento de aminoácido da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 de *A. marginale* com massa molecular de 17kDa obtido pelo *Software ProtParam tool* desenvolvido por Gasteiger et al 2005 e disponível em <http://web.expasy.org/protparam>.

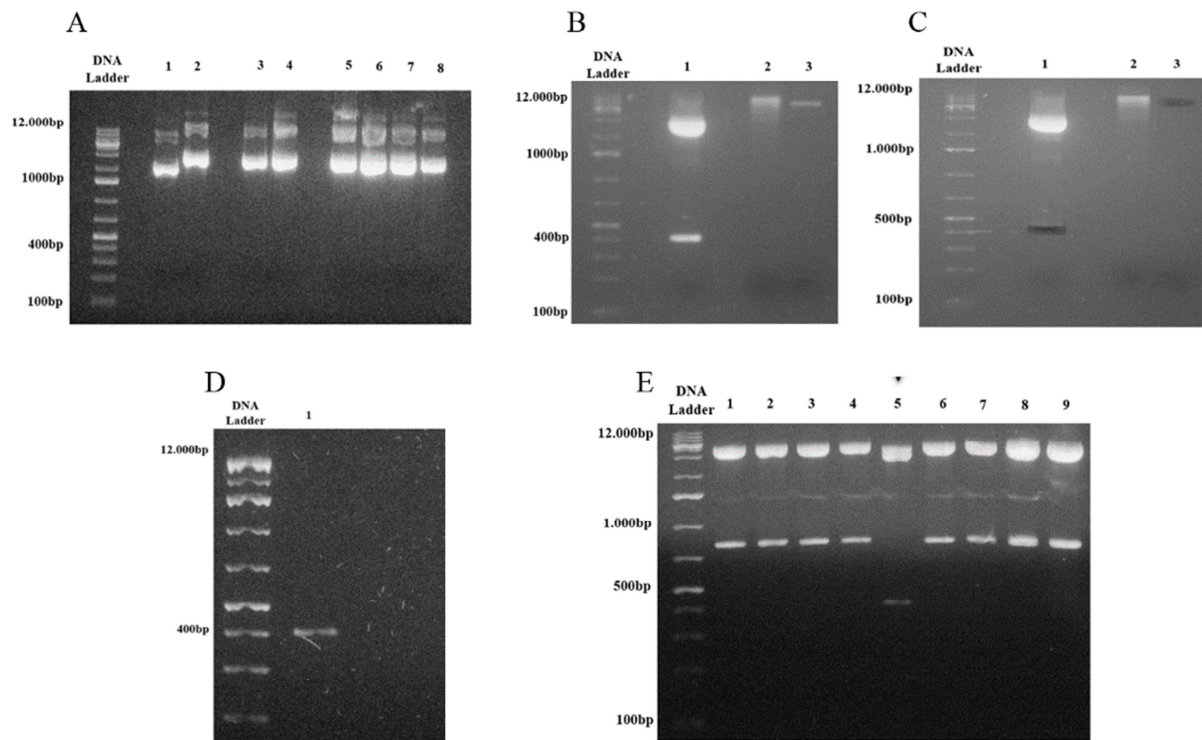


Figura - 11. Construção da proteína recombinante. **A)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos plasmídeos pGEM-*msp1a/omp7/9*. **B** – perfil eletroforético do plasmídeo pGEM-*msp1a/omp7/9* digerido com *Bam*HI e *Sma* I (canaleta 1) e pHT43 digeridos com *Bam* HI e *Sma* I (canaletas 2-3). **C** – Perfil eletroforético do plasmídeo pGEM-*msp1a/omp7/9* digerido com *Bam*HI e *Sma*I (canaleta 1). O fragmento de 400pb foi retirado para purificação. Na canaleta (2), apresenta o perfil do plasmídeo pHT43intacto e na canaleta (3) digerido. Esse fragmento também foi excisado para etapa de purificação. **D** – Perfil eletroforético do gene *msp1a/omp7/9* purificado e com tamanho esperado de 400pb. **E**- Canaleta (5) apresenta o plasmídeo pHT43-*msp1a/omp7/9* com fragmento gênico *msp1/omp7/9* e o plasmídeo pHT43 digerido.

5.3 Ensaios de otimização da expressão e caracterização da antigenicidade de MSP1a/OMP7/9

A Figura -12A apresenta o perfil eletroforético da cultura induzida de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ com dupla indução de IPTG 1mM. Não foram observados na amostra anterior a indução (T0) a presença de proteínas com massa molecular superior a 56kDa e de proteínas com peso molecular compreendido entre 14-22kDa. Neste tempo de cultivo foi observado proteínas com massa molecular compreendidos entre 22kDa-56kDa. A proteína MSP1a/OMP7/9 de massa molecular 17kDa não foi observada no tempo (T0).

Na primeira indução (T8) (Figura – 12A) observam maior número de proteínas em maiores concentrações. Neste tempo (T8) verificou proteínas com massa molecular superior a 56kDa com maior produção de proteínas de massa molecular compreendidos entre 22kda-56kDa. Na massa molecular compreendido entre 14kDa-22kDa observa uma forte e única banda correspondente a proteína MSP1/OMP7/9 com peso molecular de 17kDa.

No outro tempo avaliado (T16) (Figura – 12A) é evidenciado as mesmas proteínas observadas no tempo (T8). A proteína MSP1a/OMP7/9 de massa molecular 17kDa também foi observada, entretanto, todas as bandas visualizadas neste tempo (T16) apresentaram menores níveis de expressão.

A análise da expressão da proteína MSP1a/OMP7/9 nesta etapa possibilitou a recuperação do sobrenadante da cultura lisada para purificação da proteína e formulação vacinal

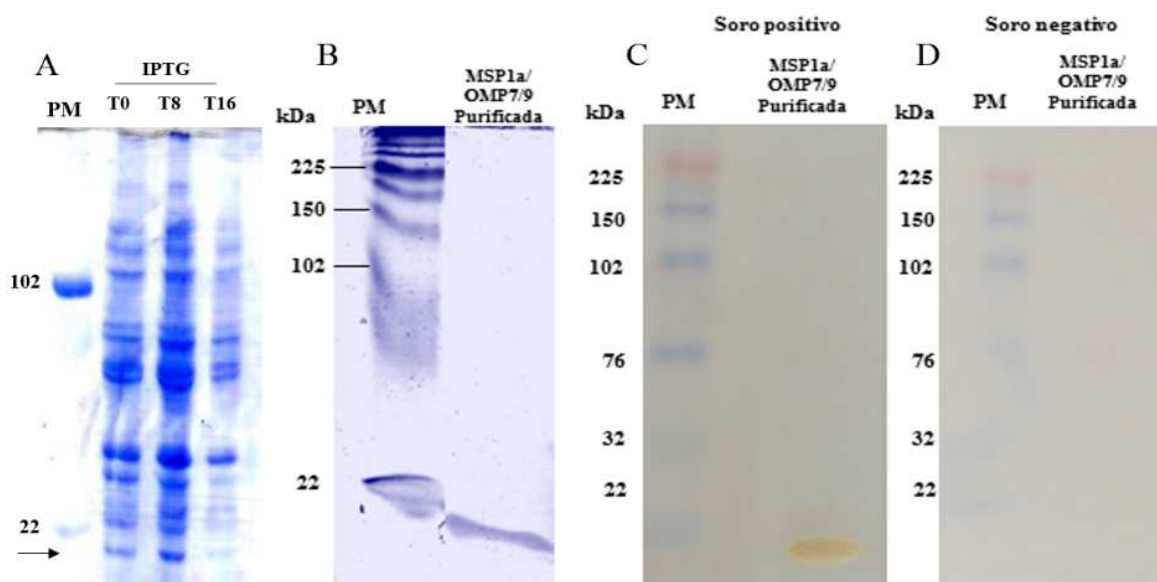


Figura - 12. Perfil eletroforético e Análise de antigenicidade de MSP1a/OMP7/9 de cultura *Escherichia coli* DH5 α F'IQ induzida. **A** – Dupla adição de IPTG 1mM a 28°C. T0 - antes indução; T8 - após 8 horas primeira indução; T16 - após 16 horas primeira indução. Em todas as amostras foram utilizadas a proporção de 2 μ L de amostra e 18 μ L de tampão desnaturante. Seta corresponde a posição equivalente à 17KDa. **B** – Proteínas purificada por cromatografia de troca iônica com Níquel (cauda de histidina). **C** - *Western Blotting* da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 obtida de cultivo de *Escherichia coli* – DH5 α F'IQ induzido por IPTG 1mM. A proteína purificada obtida SDS-PAGE 15% foi transferida para membrana de nitrocelulose seguido o protocolo BioRad. Utilizou como anticorpo primário soro de animais com anaplasmoses (soro positivo) e soro de animais saudáveis (soro negativo) coletados de bezerros em fazenda na região de Gurupi do Estado do Tocantins. **D** – Soro negativo. Anticorpo secundário *Anti-Bovine IgG - rabbit* A8917 Sigma com conjugado peroxidase na proporção 1:2.000 e 0,05%v/v 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) foram utilizados para determinar a reatividade proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 com soro de animais doentes.

A indução permitiu a purificação da proteína MSP1a/OMP7/9 (Figura 12B). Os resultados de *imunoblotting* confirmaram que os epítomos selecionados da proteína recombinante MSP1a/OMP7/9 foram capazes de reagirem aos anticorpos de bezerros com anaplasmoses. Soro de bezerro saudável não foi reativo. A revelação foi realizada com uso do anticorpo secundário da Sigma A8917 Anti-IgG bovino e 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Figura – 12C-D). Esta é uma importante confirmação de que a proteína MSP1a/OMP7/9

apresenta potencialidade como antígeno vacinal para controle da anaplasnose, o que possibilitou a realização dos testes pré-clínicos em camundongos Balb/c.

Amostras sorológicas das imunizações (T0), (T1), (T2), (T3) correspondentes aos dias 0, 21, 42 e 56, respectivamente, de grupos experimentais, foram quantificadas quanto a produção de IgG total. Na Figura – 13, observa produção de IgG nos grupos MSP1a/OMP7/9 + PBS e MSP1a/OMP7/9 + ISA.

Animais do grupo ISA apresentaram produção de IgG discretamente superior ao *cutt off*. Não foi observado produção de IgG nos animais do grupo PBS. Houve diferença significativa ($p < 0,02$) da imunização (T1) e (T3) de soro de Balb/c do grupo MSP1a/OMP7/9 + ISA, e maior resposta humoral ($p < 0,05$) da imunização (T2) do grupo MSP1a/OMP7/9 + ISA comparado a imunização (T2) do grupo MSP1a/OMP7/9 + PBS.

As demais imunizações não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). A proteína MSP1a/OMP7/9 apresentou capacidade para estimular a produção de IgG. Entretanto, o seu efeito foi potencializado na vacina emulsificada.

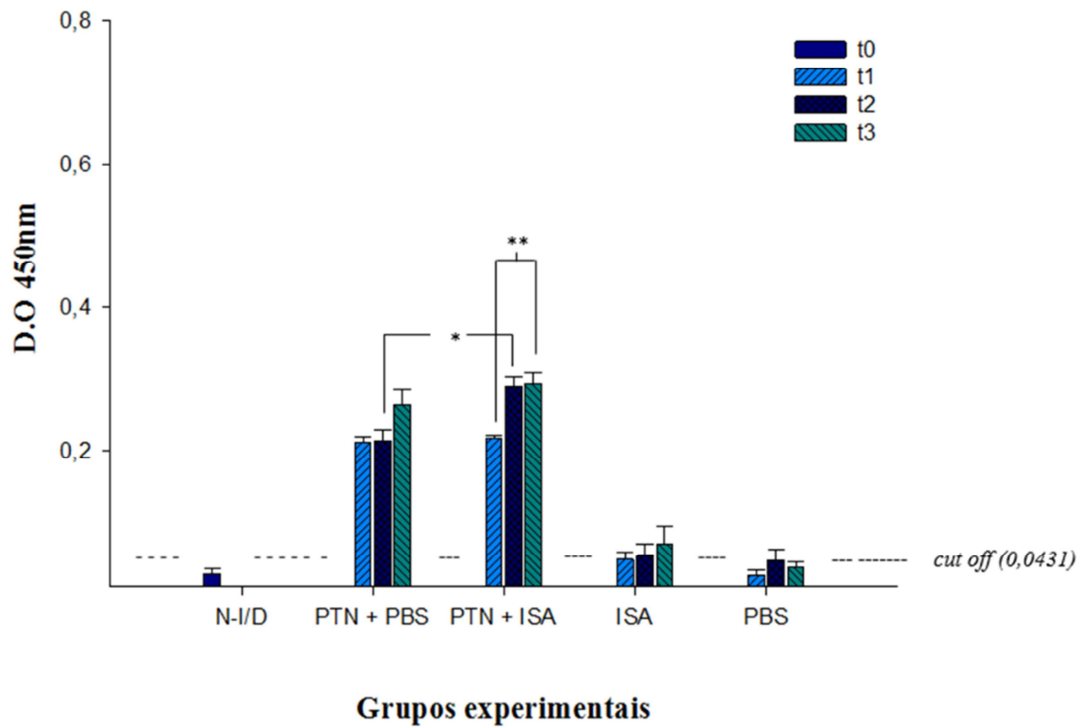


Figura – 13. Determinação de IgG anti-MSP1/OMP7/9. Grupos de camundongos Balb/c submetidos imunização. **N-I/D** – Não imunizado/não desafiado. **PTN + PBS** – Grupos imunizados com MSP1a/OMP7/9 + PBS. **PTN + ISA** – Grupos imunizados com MSP1/OMP7/9 + ISA 50 V2. **ISA** – Grupos com adjuvante ISA 50 V2. **PBS** - Grupo controle com PBS. ($*p<0,03$; ($*p<0,02$). Os soros de Balb/c dos grupos experimentais foram diluídos na proporção 1:50.

5.4 Desafio e avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos.

Ao término das imunizações os grupos experimentais foram submetidos ao teste desafio por cepa virulenta *A. marginale* UFMG2. A cultura de *A. marginale* foi ressuspensa com solução inoculadora e administrada por via subcutânea com dose subclínica de 3×10^5 cel/mL em cada animal do grupo. Os animais foram observados por 56 dias acompanhando os sinais clínicos da doença, mudança de peso, coloração, característica do pêlo e morte. A variação do peso corporal de Balb/c após desafio foi realizada até o 42º dia.

A Figura 14A mostra a avaliação do peso corporal de Balb/c de cada grupo. Observa-se que os animais do grupo inoculado apenas com PBS apresentaram perda de peso corporal entre o 23 - 27º dia. Este período de perda de peso corporal coincidiu com a fase aguda da doença com animais apresentando sinais clínicos de anaplasmoses e alta bacteremia (Figura 15A-D). Os animais do grupo imunizado com o placebo ISA 50 V2 não apresentaram perda de peso corporal. Entretanto, os sinais clínicos de anaplasmoses também foram observados (Figura - 15A-B).

Os sobreviventes dos grupos PBS e placebo ISA 50 V2 apresentaram ao final de 42º dia pêlos arrepiados e opacos. O grupo de animais imunizados com ISA 50 V2 apresentaram sinais característicos da doença sem ocorrência de morte (Figura - 15A-B). Entretanto, no grupo inoculado com PBS foram observadas mortes de animais com percentagem final de sobreviventes de 85% (Figura – 14B).

Os animais do grupo imunizado com MSP1a/OMP7/9 emulsificado com ISA 50 V2 apresentaram melhor controle de peso corporal não apresentando sinais clínicos da doença (Figura – 15E-F). Os animais destes grupos apresentaram pêlos lisos e brancos. Além disso, a imunização de camundongos Balb/c com a proteína emulsificada MSP1a/OMP7/9 + ISA 50 V2 permitiram menor coeficiente de variação do peso corporal ao longo dos 42º dias quando

comparado aos grupos placebo e PBS. Ao final do 42º dia observaram que os animais dos grupos imunizados com proteína emulsificada com ISA 50 V2 obtiveram 100% de sobreviventes com pêlos lisos e brancos (Figura - 14; Figura - 15EF). A Tabela – 1 apresenta os sinais clínicos observados dos camundongos Balb/c de cada grupo experimental.

Santos et al. (2013), avaliaram a resposta humoral e celular de epítomos MSP1a de *A. marginale* com imunização de peptídeos sintéticos em camundongos Balb/c. Realizaram após imunizações desafio com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale*. Observaram redução da carga parasitária de 74% nos animais imunizados com peptídeos, enquanto que, animais imunizados com lisado de *A. marginale* a redução dos eritrócitos infectados foi de 47% após 30 dias de observação. Observaram ainda 70 e 80% de animais sobreviventes de grupo de animais imunizados com placebo e PBS, respectivamente. Grupos imunizados com peptídeos sintéticos e lisado de *A. marginale* obtiveram sobrevivência de 100% dos animais (SANTOS et al. 2013).

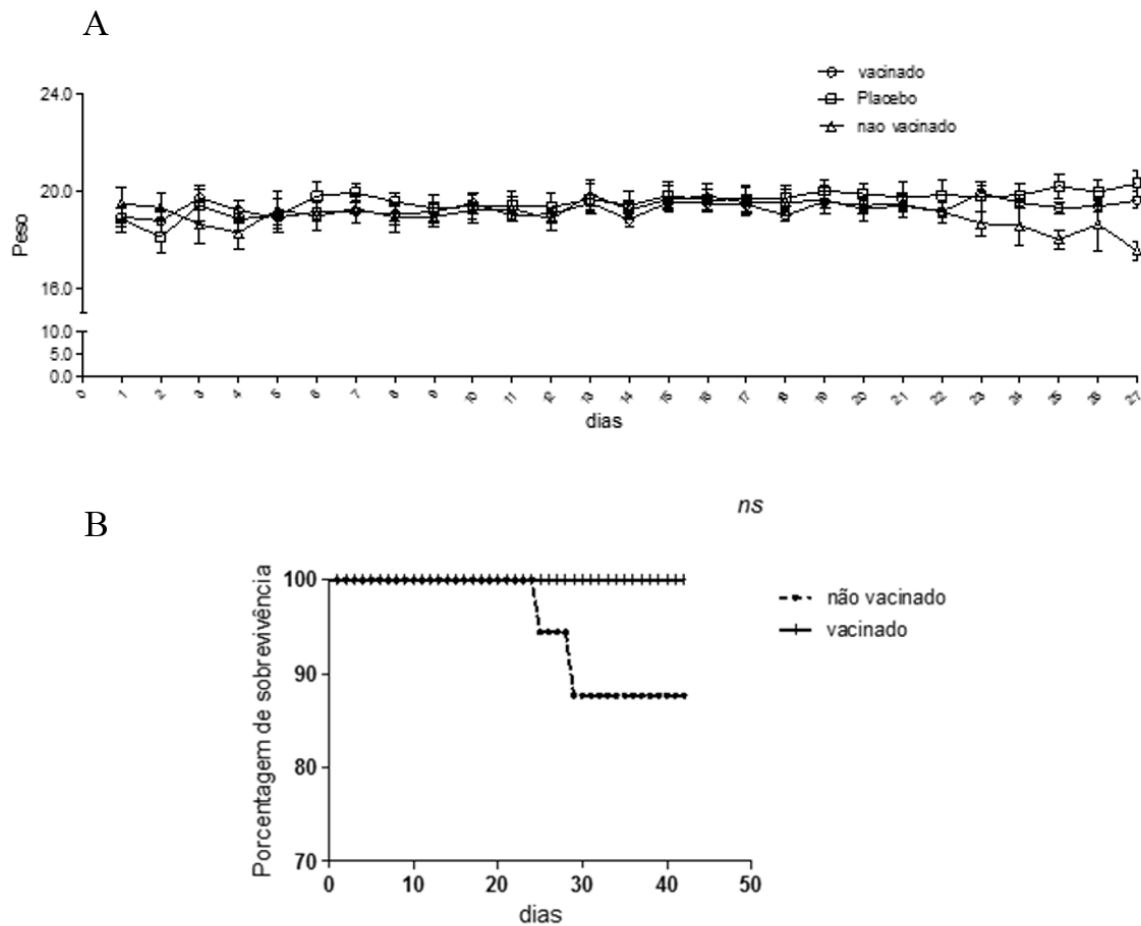


Figura – 14 Análise de peso corporal e Sobrevivência após desafio. A) Variação do peso dos camundongos Balb/c desafiados com dose de 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFMG2 por 42 dias. B) Percentagem de Balb/c sobreviventes. Vacinado – Imunizados com MSP1a/Omp7/9 + ISA 50 V2; e não vacinado – PBS (placebo).

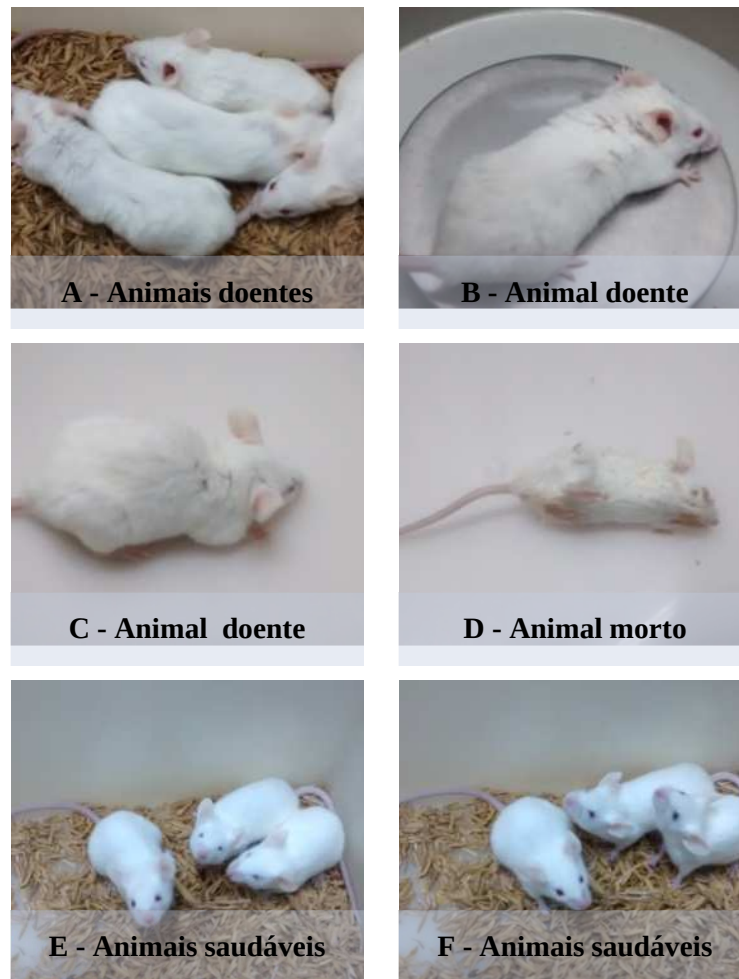


Figura – 15 Camundongos Balb/c do grupo experimental. **A - B** – Animais com anaplasmosse apresentando hipotermia, pêlos opacos e arrepiados. **C** – Animal com quadro avançado da doença com dificuldade de movimentos (Letargia). **D** – Animal morto. **E - F** – animais saudáveis com pêlos brancos e lisos. **A - D** animais do grupo controle inoculados com PBS. **E – F** animais que foram imunizados com antígeno MSP1a emulsificado com adjuvante ISA 50 V2 nos tempos 0; 21 e 42 dias. Todos os grupos experimentais receberam desafio de 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* cepa UFMG2 observados por 42 dias.

Tabela – 1 Quadro clínico de Balb/c imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFMG2.

	PBS					MSP1a/OMP7/9+PBS					ISA					MSP1a/OMP7/9+ISA				
	n1	n2	n3	n4	n5	n1	n2	n3	n4	n5	n1	n2	n3	n4	n5	n1	n2	n3	n4	n5
<i>Pêlo opaco</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pêlo arrepiado</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Perda peso</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tristeza</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Morte</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MSP1a/OM7/9 - Proteína recombinante. ISA – Adjuvante oleoso ISA 50 V2 Seppic. PBS – Grupo controle. *Legenda: (+) com sinais; (-) sem sinais; n (números de animais).*

O efeito combinado de proteína MSP1a/OMP7/9 ao adjuvante também foi observado pela redução significativa de monócitos, neutrófilos e leucocitose (Figura – 16). A maior produção IgG no grupo MSP1a/OMP7/9 sugere a participação das imunoglobulinas (IgGs) no bloqueio da invasão por opsonização e ação de células *killers* contra *A. marginale* (CANTOR et al. 1993). (MCGAREY & ALLRED 1994).

Após 49 dias de análises dos camundongos Balb/c desafiados com cepa virulenta de *A. marginale*, realizou a coleta de sangue para avaliação de leucograma, eritrograma, bioquímica e carga bacterêmica. Os animais que receberam a combinação proteína MSP1a/OMP7/9 + ISA não apresentaram leucocitose (5600 ± 529) ($p < 0,05$), sugerindo a ocorrência condizente com a falta de sintomas (Figura 16A). Enquanto que foi observada no grupo controle PBS (7733 ± 1222) e imunizados com ISA (7267 ± 1815). Em contrapartida não houve diferença no número de linfócitos (Figura – 16B). Como a leucocitose é uma manifestação da infecção bacteriana a redução do número total de leucócitos no grupo MSP1a/OMP7/9 + ISA sugeriu infecção subaguda.

O desafio e a infecção crônica levaram a um aumento exacerbado dos monócitos tanto no grupo PBS (253 ± 12) quanto nos grupos que receberam a proteína apenas MSP1a/OMP7/9 + PBS (239 ± 57) e o adjuvante e ISA (181 ± 113). O grupo vacinado MSP1a/OMP7/9 + ISA (130 ± 29) não teve aumento dos monócitos (Figura – 16C). Os números de monócitos nestes animais ficaram próximos à normalidade (0 a 1×10^6 monocitos/ml), indicando ausência de resposta inflamatória.

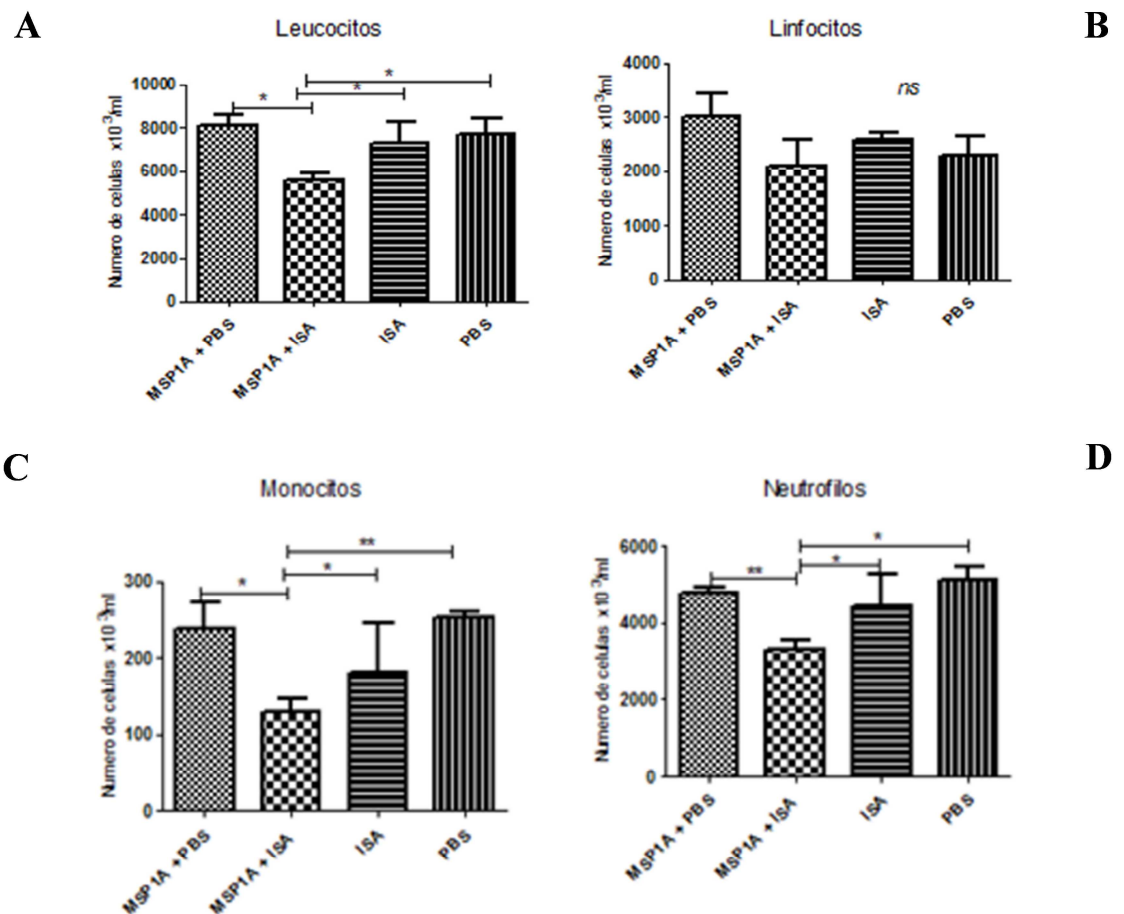


Figura – 16 Leucograma de Balb/c imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL *A. marginale* *A. marginale* após 49 dias. A – Leucócitos. B – Linfócitos. C – Monócitos. D – Neutrófilos. MSP1a + PBS (MSP1a/OMP7/9 + PBS); MSP1a + ISA (MSP1a/OMP7/9 + ISA); ISA (adjuvante ISA 50 V2); PBS – Grupo controle. * representa diferença estatística ($p < 0,05$); ** representa diferença estatística ($p < 0,005$). Leucócitos totais: $5,88 \pm 1,40$ ($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$); Neutrófilos: 2175 ± 253 ($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$); Monócitos: 211 ± 88 ($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$) Centro de Bioterismo - Laboratório de Saúde Animal e Controle de qualidade da Faculdade de Medicina da USP.

No quadro de anaplasmoses já foi descrito a participação dos neutrófilos liberando mediadores para liberação de intermediários de oxigênio e nitrogênio reativo cruciais no desenvolvimento de respostas imunológicas inatas e adaptativas (WOLDEHIWET 2010; BRUNET 2001; PARK & RIKIHISA 1992; WYATT et al. 1996).

Os animais que receberam PBS ou adjuvante desenvolveram sintomas e um aumento de neutrófilos ocorreu em resposta a infecção bacteriana (Figura – 16D). Os valores leucocitários mostraram uma estabilização de leucócitos totais, neutrófilos, monócitos após o desafio dos animais vacinados sugerindo uma infecção subclínica. Baseados em nossos dados o desafio com uma dose subclínica provocou sintomatologia nos grupos controle e placebo e a não sintomatologia nos animais vacinados confirmam que não houve resposta inflamatória.

A anemia na anaplasmoses é gerada pela destruição extravascular de eritrócitos parasitados e não parasitados. Estudos imunológicos indicam que durante anaplasmoses o hospedeiro produz anticorpos dirigidos contra o *A. marginale*, bem como, contra as suas próprias células vermelhas (SCHROEDER & RISTIC 1965; NAZIFI et al. 2008).

O perfil hematológico dos grupos imunizados está apresentado na Tabela 2. Não houve diferenças na quantidade de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio-VCM, hemoglobina corpuscular média-HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média-CHCM e plaquetas provavelmente pela dose subclínica aplicada no desafio.

Tabela – 2 Eritrograma de Balb/c submetido a diferentes protocolos vacinais após 49 dias de desafio com *A. marginale* UFMG2.

	PBS	MSP1a/OMP7/9 + PBS	ISA 50 V2	MSP1a/OMP7/9 + ISA 50 V2	NI/ND
Eritrócitos	6,4±0,6	5,0±0,7	5,5±0,9	5,57±0,4	5,6±0,6
Hemoglobina	19,5±1,9	15,2±2,2	16,7±2,8	16,7±1,4	16,9±1,8
Hematócrito	58,7±5,7	45,7±6,5	50,3±8,3	50,33±4,0	50,7±5,5
VCM	91	91	91	91	90
HCM	30	30	30	30	30
CHCM	33	33	33	33	33
Plaquetas	281,3±138,6	291,7±18,2	403,3±139,5	323,7±97	309,7±45,6

Valores absolutos (média±desvio-padrão) do Eritrograma de Balb/c submetidos a diferentes protocolos vacinais após 49 dias de desafio com 3×10^5 *A. marginale* UFMG2. PBS – grupo controle; MSP1a/OMP7/9 + PBS imunizados com proteína e PBS; ISA 50 V2 imunizados somente com adjuvante; MSP1a/OMP7/9 + ISA 50 V2 imunizados com proteína e adjuvante; NI/ND não imunizados e nem desafiados. Não apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$). CHCM – concentração da hemoglobina celular média. VCM – volume corpuscular médio. HCM – hemoglobina corpuscular média. Valores de Referência: Eritrócitos: $8,8 \pm 0,63$ ($10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$); Hemoglobina: $14,52 \pm 1,96$ (g/dL); Hematócritos: $42,60 \pm 5,74$ (%) Centro de Bioterismo - Laboratório de Saúde Animal e Controle de qualidade da Faculdade de Medicina da USP. Plaquetas 737 ± 167 ($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$) Weiss & Wardrop, 2010.

A produção de uréia e creatinina observados após 49 dias de desafio de Balb/c com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* estão apresentados na Figura - 17. Não foram observadas diferenças quanto à produção de uréia em relação ao grupo PBS ou em relação ao adjuvante ISA. A quantificação de uréia permite determinar a ocorrência ou não da disfunção renal. A creatinina também tem sido quantificada para a comprovação da função renal. Tem sido relatado em camundongos Balb/c aumento da concentração de ureia e creatinina após infecção microbiana (ZANGARI et al. 2013).

Em todos os grupos avaliados observaram baixos níveis de uréia sem evidência de disfunção renal, confirmando que a dose subclínica não levou alterações.

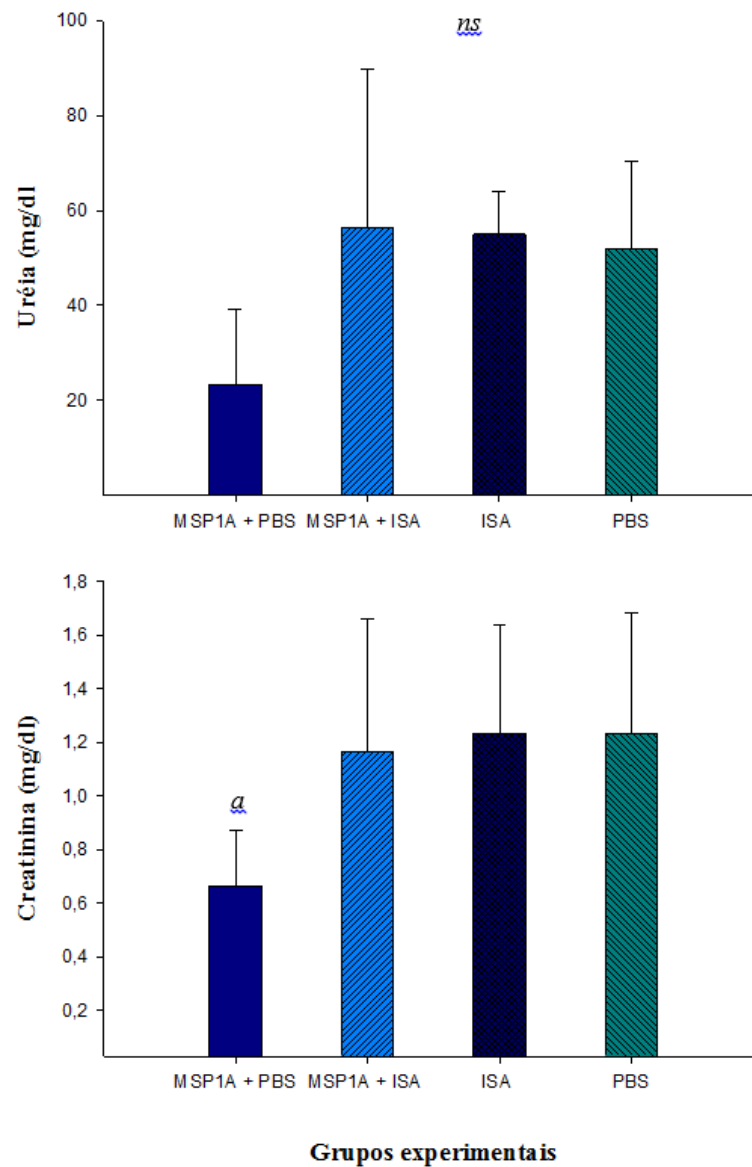


Figura – 17 Análise de Uréia e Creatinina de camundongos de Balb/c imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFM2. **MSP1A + PBS** – Imunizados com MSP1a/OMP7/9 + PBS; **MSP1A + ISA** - Imunizados com MSP1a/OMP7/9 + ISA V2; **ISA** - Imunizados ISA 50 V2; **PBS** – Grupo controle. (*ns*) – não significativo ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. (*a*) - representa diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo ISA 50 V2.

5.5 Avaliação da carga bacterêmica após desafio com *A. marginale* UFMG2

Ao final de 56 dias de desafio, a carga bacterêmica foi quantificada por esfregaço sanguíneo estimando a contagem de eritrócitos infectados com rickettsias em cada grupo experimental (Figura – 18). A carga bacterêmica de 85% foi observada no grupo PBS (não vacinado) com característica de invasão intracelular elevada, destruição celular, dificuldade de pigmentação e presença de parasita livre no meio extracelular (Figura - 19). Oitenta por cento dos eritrócitos infectados com *A. marginale* apresentaram células com características de esferócitos.

Nos animais do grupo ISA (placebo) a carga bacterêmica foi igual 15,25% e 18,17% das células apresentaram esferócitos (Figura – 18).

No grupo MSP1a/OMP7/9+ISA (vacinado) obteve a menor carga bacterêmica, variando em torno de 0,72%, e somente 7,07% dos eritrócitos apresentaram esferócitos. Neste grupo houve redução significativa de esferócitos em relação ao grupo placebo ($p<0,01$) e não vacinado ($p<0,001$). A quantidade de rickettsias nos animais vacinados foi menor em relação ao grupo placebo ($p<0,0008$) e no não vacinado ($p<0,0005$).

Santos et al. (2013), observaram a redução da carga parasitária de 74%, de Balb/c imunizados com peptídeos sintéticos, enquanto que, Balb/c imunizados com lisado de *A. marginale* a redução foi de 47%. Esses animais foram observados por 30 dias. Nossos resultados foram semelhantes com alta redução da carga bacterêmica nos animais vacinados e sobrevivência de todos os animais sem qualquer sinal clínico de anaplasiose (Tabela – 1).

Silvestre et al. (2014) avaliaram a resposta imune humoral e celular de proteína recombinante de MSP1a de *A. marginale* em Balb/c imunizados associados com nanotubos de carbono como uma molécula transportadora de antígenos, entretanto, não foram realizados teste desafio dos grupos imunizados. Silvestre et al. 2014 observaram que a proteína

recombinante associada ao nanotubo de carbono foi capaz de induzir alta percentagem de células T CD4+, linfócitos, TNF- α , além da capacidade proliferativa de células de baço de Balb/c imunizados.

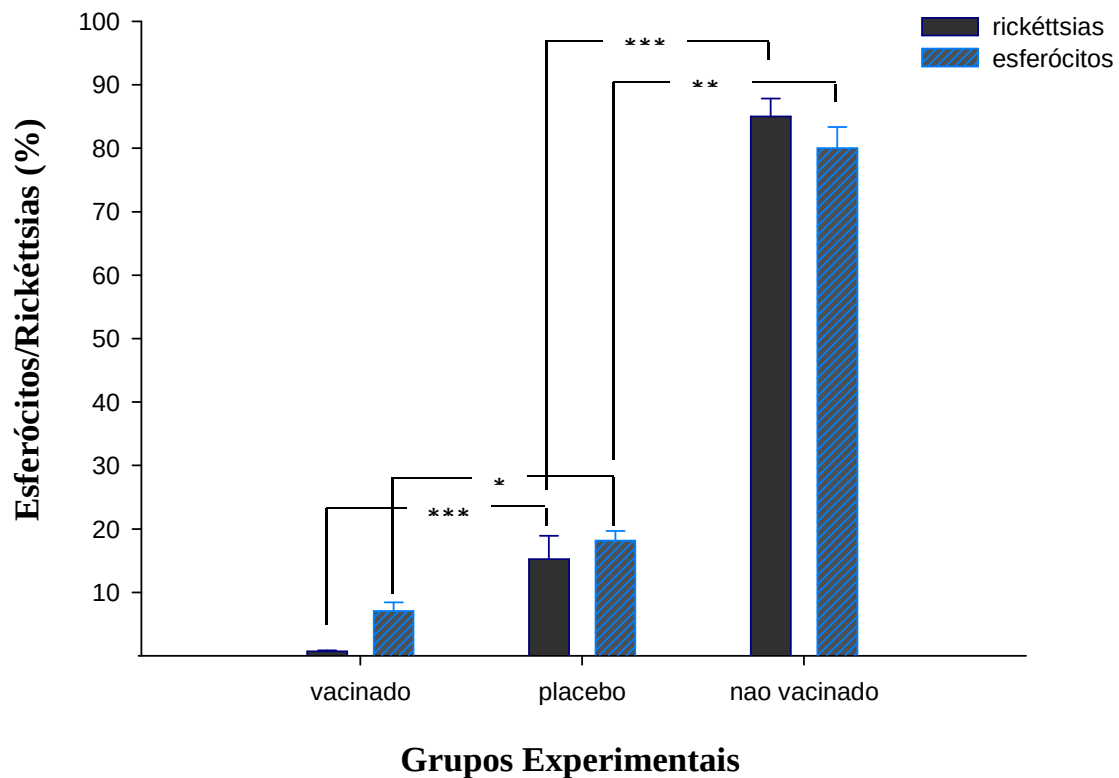


Figura – 18 Carga bacterêmica e esferócitos de Balb/c de grupos imunizados e desafiados com 3×10^5 cel/mL de *A. marginale* UFM2. Vacinado - imunizados com MSP1a/OMP7/9 + ISA. placebo – inoculados com adjuvante ISA 50 V2. Não vacinado – inoculados com PBS. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0008$.

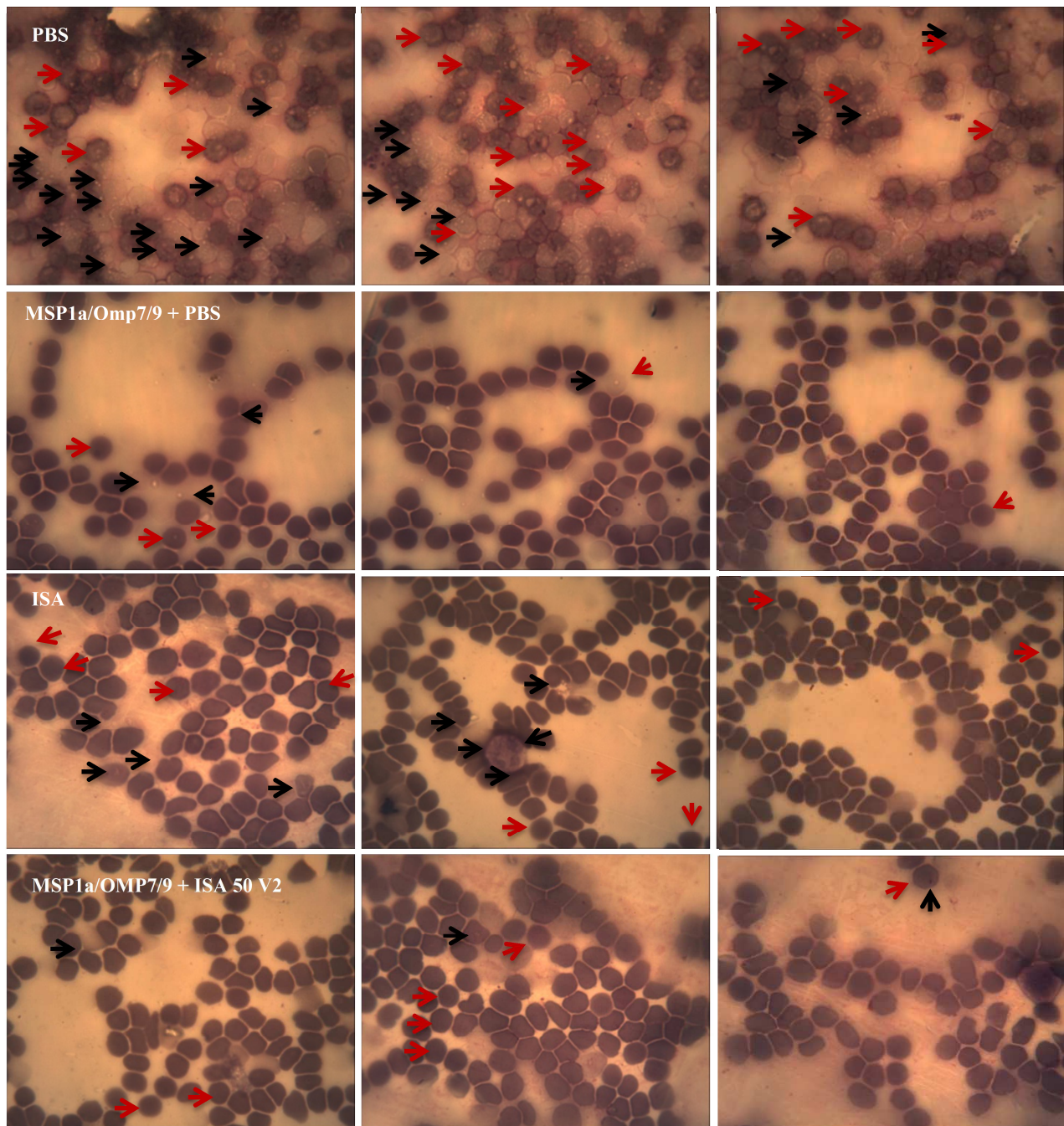


Figura – 19 Eritrócitos de Balb/c submetidos a diferentes protocolos vacinais após 56 dias de desafio com 3×10^5 *A. marginale* UFM2. PBS - Grupo Controle. MSP1a/Omp7/9 + PBS - Grupos imunizados com proteína MSP1a/Omp7/9 e PBS. MSP1a/Omp7/9 + ISA 50 V2 - Grupos imunizados com proteína MSP1a/Omp7/9 emulsificado com adjuvante. ISA 50 V2 – Grupos imunizados somente com adjuvante. As setas pretas indicam a presença de *A. marginale* UFMG2 e as setas vermelhas esferócitos.

Os modelos murinos com bactérias patogênicas intracelulares obrigatórias da ordem *Rickettsiales* mostraram que cargas bacterêmicas baixa causam patologia. Yang et al. (2013), avaliaram a infecção de 3×10^5 cel/mL de *Ehrlichia chaffeensis*, uma bactéria intracelular obrigatório que infecta principalmente monócitos e macrófagos em camundongos C57BL/6 e observaram nas análises histopatológicas de fígado e baço que a diminuição de neutrófilos aumenta quantidade de células CD4⁺ Th1 (YANG et al. 2013).

Estudos mostram que a suscetibilidade de camundongos Balb/c e C3H/HeJ desafiados com *Rickettsia parkeri* apresentam pontos acentuados de vasculite mononuclear no baço e fígado (GRASPERGE et al. 2012), e que a infecção bacteriana em C57BL/6 causa perda de células caliciforme e hiperplasia com infiltração da mucosa com macrofagos, linfócitos e neutrófilos (ZHANG et al. 2015).

Durante a fase aguda de anaplasmoze a carga bacterêmica pode variar de 10% a 90% de eritrócitos infectados. Segundo estudos o limiar da carga bacterêmica para a ocorrência dos sinais clínicos é acima 15% de eritrócitos infectados (RADOSTITS et al. 2007; AUBRY & GEALE 2011).

A infecção persistente de *A. marginale* é caracterizada por ciclos sequenciais de bacteremia, com alta concentração de parasita (10^7 /mL) seguido por declínio rápido de 10^3 /mL, microscopicamente pouco detectável (ERIKS et al. 1989; KIESER et al. 1990; FRENCH et al. 1998). Os sinais clínicos de anaplasmoze como a anemia, icterícia sem hemoglobinemia e anemia hemoglobinúria decorre com a persistência da bactéria e são dependentes da elevação e diminuição dos eritrócitos infectados (KIESER et al. 1990; VISESHAKUL et al. 2000; KOCAN et al. 2003; DE LA FUENTE et al. 2001c; POTGIETER & STOLTSZ 2004).

Os animais do grupo experimental vacinados mostraram proteção, pois não desenvolveram sintomas da doença, sem alterações no leucograma, embora tenha sido detectada uma discreta carga bacterêmica. Esta discreta carga pode refletir o surgimento de colônias bacterianas com variantes antigênicos que escapariam da resposta induzida pela imunização da MSP1a/OMP7/9+ISA.

6. CONCLUSÃO

Os resultados finais deste trabalho permitem concluir que:

1. A análise de regiões preditas de MSP1a e OMP7/9 permitiu a seleção de epítomos vacinais e a síntese química de DNA artificial.
2. A obtenção do gene *msh1a/omp7/9* por síntese química possibilitou um avanço para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra anaplasmosse bovina.
3. A antigenicidade da proteína quimérica MSP1a/OMP7/9 foi alcançada pela reatividade dos epítomos selecionados com soro primário de bezerros em fase aguda de anaplasmosse. Esta reatividade sugere a participação destes epítomos no processo infeccioso, tornando-os um importante candidato vacinal.
4. A detecção de imunoglobulina IgG nos soros de Balb/c do grupo imunizado com MSP1a/OMP7/9 sugere uma imunogenicidade estimulada pela composição vacinal.
5. A imunização de Balb/c com o candidato vacinal (MSP1a/OMP7/9) gerou alta proteção, com baixa carga bacterêmica presente nos esfregaços sanguíneos e sem alterações dos dados leucocitários.
6. A imunização de Balb/c com o candidato vacinal (MSP1a/OMP7/9) emulsificado em adjuvante oleoso ISA 50V2 garantiu aos Balb/c imunizados ausência dos sintomas de anaplasmosse em contraste com os grupos placebos.
7. Os ensaios imunológicos realizados confirmaram que o candidato vacinal (MSP1a/OMP7/9) tem potencial para uso no controle da anaplasmosse.

7. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA-UFT

O projeto intitulado “IMUNOGENICIDADE VACINAL DE PROTEÍNA RECOMBINANTE CONSTITUÍDA DE EPÍTOPOS DOMINANTES E SUB-DOMINANTES DE *anaplasma marginale* AVALIADOS EM CAMUNDONGOS *balb/c*”, processo nº 23101.003595/2015-15, sob a responsabilidade de Alex Sander R. Cangussu, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pelo parecerista da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Araguaína, 21 de outubro de 2015.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita de Alberto Yim Júnior em tinta preta.

Alberto Yim Júnior

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFT

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRAK, S. M.; BROWN, W. C.; NOH, S. M.; REIF, K. E. SCOLES, G. A.; TURSE, J. E.; NORIMINE, J.; UETI, M. W.; PALMER, G. H. Subdominant Antigens in Bacterial Vaccines: AM779 Is Subdominant in the *A. marginale* Outer Membrane Vaccine but Does Not Associate with Protective Immunity. **Plos One**, 7:9 e46372, 2012.
- ALLRED, D. R., MCGHIRE, T. C., PALMER G. H. *et al.* Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *A. marginale*. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 87:3220-3224, 1993.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transbound Emerg Dis.**, 58:1–30, 2011.
- BARBET, A. F.; ALLRED, D. R. The *msp1b* multigene family of *A. marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infect Immun.**, 59:971–73, 1991.
- BIRKNER, K.; STEINER, B.; RINKLER, C.; KERN, Y.; AICHELE, P.; BOGDAN, C. VON LOEWENICH, F. D. The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD4+ T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. **Eur. J. Immunol.**, 38:3395–3410, 2008.
- BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Complete genome sequencing of *A. marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **P Natl Acad Sci USA** 102:844–849, 2005.
- BOCK, R. E.; DE VOS, A. J. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. **Aust Vet. J.**, 79: 832-839, 2001.

- BROWNING, M. D.; GARYU, J. W.; DUMLER, J. S.; SCORPIO, D. G. Role of reactive nitrogen species in development of hepatic injury in a C57BL/6 mouse model of human granulocytic anaplasmosis. **Comp. Med.** 56: 55–62, 2006.
- BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4⁺ T Lymphocytes from Calves Immunized with *A. marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1), a Heteromeric Complex of MSP1a and MSP1b, Preferentially Recognize the MSP1a Carboxyl Terminus That Is Conserved among Strains. **Infect Immun.**, 69:6853-6862, 2001.
- BROWN, W. C.; SHKAP, V. ; ZHU, D.; MCGUIRE, T. C.; TUO, W.; MCELWAIN, T. F; PALMER, G. H. CD4⁺ T-lymphocyte and IgG2 responses in calves immunized with *A. marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infect Immun.**, 66:5406–5413, 1998.
- BRUNET, L, R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int Immunopharmacol.**1:1457-1467, 2001.
- CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDES, J. J.; FERROLHO, J.; MIRAY, T.; POH, A. E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M. F. B.; PENA, A. E.; KOCAN, K. M.; DE LA FUNTE, J. Functional and Immunological Relevance of *A. marginale* Major Surface Protein 1a Sequence and Structural Analysis. **Plos One**, 8:6 e65243, 2013.
- CALLOW, L. L. Arthropod-borne rickettsias of the blood. In: Protozoal and Rickettsial Diseases. Animal Health in Australia, AGPS. **Australian Bureau of Animal Health**, Canberra, pp. 174–201, 1984.
- CANTOR, G. H.; PONTZER, C. H.; PALMER, G. H. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. **Vet Immunol immupathol.**, 37:343-350, 1993.

- CHEN G.; SEVERO, M. S.; SAKHON, O. S.; CHOY, A.; HERRON, M. J. FEELSHEIM, R. F. WIRYAWAN, H.; LIAO, J.; JOHNS, J. L.; MUNDERLOH, U. G.; SUTTERWALA, F. S.; KOTSYFAKIS, M.; PEDRA, J.H. F. *Anaplasma phagocytophilum* Dihydrolipoamide Dehydrogenase 1 Affects Host-Derived Immunopathology during Microbial Colonization. **Infect Immun.**, 80: 3194–3205, 2012.
- COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M. Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *A. marginale* infections in cattle. **Vet. Ther.** 7:347–360, 2006a.
- DARK, M. K.; AL-KHEDERY, B.; BARBET, A. F. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *A. marginale*. **Vaccine**, 29:4923-4932, 2011.
- DA SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Low genetic diversity of *A. marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 7: 20-25, 2016.
- DE LA FUENTA GARCIA et. al., System for the expression of peptides on the bacterial surface. **US. Pat.** 2011/0097354A1, 28 Abril 2011 26p.
- DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; MCEWEN, B. R.; CLAWSON, D; KOCAN, K. M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *A. marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31:1705–1714, 2001c.
- DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface protein MSP1a involved in adhesion of the rickettsia *A. marginale* to host cells. **Vet Microbiol.**, 91:265-283, 2003.
- DE LA FUENTE, J. A.; LEW, H.; LUTZ, M. L.; MELI, R.; HOFMANN-LEHMANN, V.; SHKAP, T.; MOLAD, A. J.; MANGOLD, C.; ALAMAZN, V.; NARANJO, C.; GORTAZAR, A.; TORINA, S.; CARACAPPA, A. L.; GARCIA-PEREZ, M.; BARRAL, B.; OPORTO, L.; CECI, G.; CARELLI, E. F. B.; KOCAN, K. M. Genetic diversity of

Anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Anim. Health Res. Rev.** 6: 75–89, 2005b.

DUMLER, J. S.; BARBERT, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 2145–2165, 2001.

EID, G.; FRENCH, D. M.; LUNDGREN, A. M.; BARBET, A. F.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *A. marginale* rickettsemia. **Infect Immun.**, 64: 836-841, 1996.

ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and quantitation of *A. marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **J. Clin. Microbiol.** 27:279–284, 1989.

FRENCH, D.M.; BROWN, W.C.; PALMER, G. H. Emergence of *A. marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infect Immun.**, 67:5834-5840, 1999.

FRENCH, D. M.; MCELWAIN, T. F.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Expression of *A. marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infect. Immun.** 66:1200–1207, 1998.

GONÇALVES, P. M. Epidemiology and control of bovine babesiosis and anaplasmosis in southeast region of Brazil. **Ciência Rural**, 1:187-194, 2000.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINGS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy*

Server;(In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, 571-607, 2005.

GRASPERGE, B. J.; REIF, E. K.; MORGAN, T. D.; SUNYAKUMTHORN, P.; BYNOG, J.; PADDOCK, C. D.; MACALUSO, K. R. **Susceptibility of Inbred Mice to *Rickettsia parkeri*. Infect Immun.**, 80: 1846-1852, 2012.

HOAR, B. R.; NIETO, N. C.; RHODES, D. M.; FOLEY, J. E. Evaluation of sequential coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* and *A. marginale* in cattle. **Am. J. Vet. Res.** 69:1171–1178, 2008.

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; WILLADSEN, P. A novel antigen from *A. marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. **Vaccine**, 22:407-415, 2004.

JOHNS, J. L.; MACNAMARA, K. C.; WALKER, N. J.; WINSLOW, G. M.; BORJESSON, D. L. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* induces multilineage alterations in hematopoietic progenitor cells and peripheral blood cells.**Infect. Immun.** 77:4070–4080, 2009.

JOHNS, J. L.; BORJESSON, D. L. Downregulation of CXCL12 signaling and altered hematopoietic stem and progenitor cell trafficking in a murine model of acute *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Innate Immun.** 18: 418–428, 2012.

KANO, F. S.; TAMEKUNI, K.; COELHO, A. L.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O.; et al. Induced immune response of DNA vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *A. marginale*. **Vaccine** 26: 3522–3527, 2008.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *A. marginale* infection of cattle. **Infect. Immun.**, 58, 1117–1119, 1990.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *A. marginale*. **Vet Parasitol** 167: 95–107, 2010.

- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *A. marginale* infection in cattle. **Clin Microbiol Rev.**, 16: 698-712, 2003.
- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Co-feeding studies of ticks infected with *A. marginale*. **Vet Parasitol.**, 112: 295–305, 2003.
- KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control past, present and future. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, 916:501-509, 2000.
- LOPEZ, J. E.; BEARE, P. A.; HEINZEN, R. A.; NORIMINE, J.; LAHMERS, K. K; PALMER, G. H.; BROWN, W. C. High-throughput identification of T-lymphocyte antigens from *A. marginale* expressed using in vitro transcription and translation. **J Immunol Methods** 332:129–141, 2008.
- LOSOS, G. J. Anaplasmosis: In: **Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals**, ed. G.J. LOSOS Essex, UK: Longman Press, 742-795, 1986a.
- MACHADO, R. Z.; DA SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MATOS, C. A.; OBREGÓN, D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *A. marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 23: 4438-446, 2015.
- MARTIN, M. E.; CASPERSEN, K.; DUMLER, J. S. Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon-gamma and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. **Am. J.Pathol.**, 158:1881–1888, 2001.
- MCGAREY, D. J.; ALLRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components of the *A. marginale* initial body surface and identification of possible adhesions. **Infect Immun.**, 62: 4587-4593, 1994.
- MICHELON, A.; CONCEIÇÃO, F. R.; BINSFELD, P. C.; CUNHA, C. W.; MOREIRA, A. N.; ARGONDIZZO, A. P. MCINTOSH, D.; ARMÔA, G. R. G.; CAMPOS, A. S.; FABER,

- M.; MCFADDEN, J. DELLAGOSTIN, O. A. Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *A. marginale* MSP1a antigen. *Vaccine*, 24:6332-6339, 2006.
- MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; MICHAELI, S.; SHKAP, V. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *A. marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 100, 2004, 55–64.
- MUSOKE, A. J.; PALMER, G. H.; MCELWAIN, T. F.; NENE, V.; MCKEEVER, D. Prospects for subunit vaccines against tick-borne diseases. **Br Vet. J.**, 152:621-639, 1996.
- NAZIFI, S.; RAZAVI, S. M.; MANSOURIAN, M.; NIKAHVAL, B.; MOGHADDAM, M. Studies on correlations among parasitaemia and some hemolytic indices in two tropical diseases (theileriosis and anaplasmosis) in Fars province of Iran. **Trop Anim Health Prod.**, 40:47-53, 2008.
- NOH, S. M.; BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; AGNES, J. T.; DARK, M. J.; BROWN, W. C.; BASZLER, T. V.; PALMER, G. H. Differential expression and sequence conservation of the *A. marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. **Infect Immun** 74: 3471–3479, 2006.
- OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *A. marginale*. **Infect Immun.**, 61:5245-5251, 1993.
- OIE (World Organisation for Animal Health). Chapter 2.4.1 Bovine Anaplasmosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 6th edn. World Organisation for Animal Health, Paris, 599–610, 2008.
- ONATE, A. A.; CESPEDES, S.; CABRERA, A.; RIVERS, R. GONZALEZ, A. , Rivers R, Gonzalez A, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Infect Immun** 71: 4857–4861, 2003.

PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; NOH, S. M.; BRAYTON, K. A.; Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development. **FEMS Immunol Med Microbiol** 64: 115-119, 2012

PALMER, G. H.; LINCOLN, S. Anaplasmosis. In: **Large Animal internal medicine**, ed. B. P. SMITH, 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1049-1051, 2001.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K. M.; BROWN, W. C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *A. marginale*. **Parasitol Today** 15: 281–286, 1999.

PALMER, G. H.; MUNODZANA, D.; TEBELE, N.; USHE, T.; MCELWAIN, T. F. Heterologous strain challenge of cattle immunized with *A. marginale* outer membranes. **Vet. Immunol Immunopathol.**, 42: 265-273, 1994b.

PALMER, G. H. Anaplasma Vaccines. In: **Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines**, ed. I. G. WRIGHT, Boca Raton, FL: CRC Press, 1-29, 1989a.

PALMER G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G. H.; MACGUIRE, T. C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. **Infect Immun.**, 57:3666-3669, 1989b.

PALMER, G. H.; OBERLE, S. M.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; GOFF, W. L.; MACGUIRE, T. C. Immunization with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *A. marginale* challenge. **Infect Immun.**, 56:1526-1531, 1988a.

PALMER G. H., BARBET, A. F., DAVIS, W. C.; MACGUIRE, T. C. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. **Science**, 23: 1299-1302, 1986.

PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immune serum against *A. marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **J. Immunol.**, 133:1010-1015, 1984.

- PARK, J.; RIKIHISA, Y. L-Arginine-dependent killing of intracellular *Ehrlichia risticii* by macrophages treated with gamma interferon, **Infect. Immun.**, 60:3504–3508, 1992.
- PEDRA, J. H.; TAO, J.; SUTTERWALA, F. S.; SUKUMARAN, B.; BERLINER, N.; BOCKENSTEDT, L.K.; FLAVELL, R.A.; YIN, Z.; FIKRIG, E. IL-12/23p40-dependent clearance of *Anaplasma phagocytophilum* in the murine model of human anaplasmosis. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 50:401-110, 2007a.
- PEDRA, J. H.; SUTTERWALA, F. S.; SUKUMARAN, B.; OGURA, Y.; QIAN, F.; MONTEGOMERY, R. R.; FLAVELL, R. A.; FOKRIG, E. ASC/PYCARD and caspase-1 regulate the IL-18/IFN-gamma axis during *Anaplasma phagocytophilum* infection. **J Immunol.**, 179:4783-4791, 2007b.
- PEDRA, J. H.; MATTNER, J.; TAO, J.; KERFOOT, S. M.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A.; ASKENASE, P. W.; YIN, Z.; FIKRIG, E. c-Jun NH2-terminal kinase 2 inhibits gamma interferon production during *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Infect. Immun.**, 76:308–316, 2008.
- POTGIETER, F. T.; STOLTSZ, W. H. Bovine anaplasmosis. In: **Infectious Diseases of Livestock**, COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (eds), , Oxford University Press, Southern Africa, 3:594–616, 2004.
- RADOSTITS, O. M. C. C.; GAY, K. W. H.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats**, 10th edn. Elsevier Saunders, New York, 2007.
- RICHEY, E. J; PALMER, G. H. Bovine anaplasmosis Compend Contin. **Educ Pract Vet** 12 1661–1668, 1990.
- RICHEY, E. J. Bovine anaplasmosis. Proceedings of the 24th Annual Conference of the **American Association of Bovine Practitioners**, Orlando, FL, 3–11, 1991.

- RISTIC, M.; CARSON, C. A. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *A. marginale* vaccine. **Adv Experim Med Biol**, 93: 151-188, 1977.
- RISTIC, M.; SIBINOVIC, S.; WELTER, C. J. An attenuated *A. marginale* vaccine. **Proceeding VS Livestock Saint Association**, 72: 56-69, 1968.
- SANTOS, P. S.; SENA, A. S.; NASCIMENTO, R.; ARAÚJO, T. G.; MENDES, M. M. MARTINS, J. R. S.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; GOULART, L. R. Epitope-Based Vaccines with the *A. marginale* MSP1a Functional Motif Induce a Balanced Humoral and Cellular Immune Response in Mice. **Plos One**, 8:4 e60311, 2013.
- SCHROEDER, W. F.; RISTIC, N. Anaplasmosis. An analysis of autoantigens in infected and normal bovine erythrocytes. **Am J Vet Res** 26: 679–689, 1965.
- SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity** 33: 530–541, 2010.
- SCOLES, G. A.; BROCE, A. B.; LYSYK, T. J.; PALMER, G. H. Relative efficiency of biological transmission of *A. marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera:Muscidae). **J. Med. Entomol.** 42:668–675, 2005a.
- SCORPIO, D. G.; VON LOEWENICH, F. D.; GOBEL, H.; BOGDAN, C.; DUMLER, J. S. Innate immune response to *Anaplasma phagocytophilum* contributes to hepatic injury. **Clin. Vaccine Immunol.**, 13:806 – 809, 2006.
- SHKAP, V.; MOLAD, T.; FISH, L.; PALMER, G. H. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *A. marginale* in vaccinated and infected cattle. **Parasitol. Res.** 88: 546–552, 2002a.

- SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C. PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. **Infect Immun.**, 70:642–648, 2002b.
- SILVESTRE, B. T.; RABELO, E. M. L.; VERSIANI, A. F.; FONSECA, F. G.; SILVEIRA, J. A. G.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; RIBEIRO, M. F. B. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *A. marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. **Vaccine**, 32: 2160–2166, 2014.
- TAMEKUNI, K.; VIDOTTO, M. C.; FELIX, S. R.; IGARASHI, M.; GARCIA, J. L.; COELHO, A. L.; GASPARINI, M. R. MARANA, E. R. M. SILVA, S. S. VIDOTTO, O. Induced immune response of *Escherichia coli* BL21 expressing recombinant MSP1a and MSP1b proteins of *A. marginale*. **Braz. arch. biol. technol.** 52:113-120, 2009.
- TEBELE, N. T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *A. marginale* initial body membranes. **Infect Immun.**, 59:199-204, 1991.
- TURTON, J.A.; KATSANDE, T.C.; MATINGO, M.B.; JORGENSEN, W.K.; USHE-WOKUNZE-OBATOLU, U.; DALGLEISH, R. J. Observation son the use of *Anaplasma centrale* for immunization of cattle against anaplasmosis in Zimbabwe. Onderstepoort. **J Vet. Res.**, 65: 81-86, 1998.
- VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnosis in bovine anaplasmosis. **Ciência Rural**, 31:361-368, 2001.
- VISSER, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES-JR, D. P. The *A. marginale* msp5 gene encodes a 19kDa protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. **Infect.Immun.**, 60:5139-5144, 1992.

- VIRESHAKUL, N. S.; KAMPEER, M.; BOWIE, M. V.; BARBET, A. F. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *A. marginale*. **Gene** 253: 45–53, 2000.
- VON LOEWENICH, F. D.; SCORPIO, D. G.; REISCH, U.; DUMLER, J. S.; BOGDAN, C. Control of *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4, or the TLR adaptor molecule MyD88. **Eur. J. Immunol.**, 34:1789–1797, 2004.
- WALKER, D. H.; DUMLER, J. S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerg Infect Dis.**, 2:18-29, 1996.
- WANG, S.; WANG, Y.; SUN, X.; ZHANG, Z.; LIU, T.; GADAH, J. A.; YAN, R.; SONG, X.; LI, X. Protective immunity against acute toxoplasmosis in BALB/c mice induced by a DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* 10kDa excretory-secretory antigen (TgESA10). **Vet Parasitol.**, 214:40-48, 2015.
- WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Ames: **Wiley Blackwell**, 2010.
- WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Vet. Parasitol.** 167:108–122, 2010.
- WYATT, C.R.; DAVIS, W.C.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Effect on intraerythrocytic *A. marginale* of soluble factors from infected calf blood mononuclear cells. **Infect. Immun.**, 64:4846–4849, 1996.
- YANG, Q.; GHOSE, P.; ISMAIL, N. Neutrophils Mediate Immunopathology and Negatively Regulate Protective Immune Responses during Fatal Bacterial Infection-Induced Toxic Shock. **Infect Immun.**, 81: 1751–1763, 2013.

ZHANG, W.; JIANG-YUAN, D.; YU Q.; JUN-O, J. Interleukin-7 Produced by Intestinal Epithelial Cells in Response to *Citrobacter rodentium* Infection Plays a Major Role in Innate Immunity against This Pathogen. **Infect Immun.**, 83, 2015.

ZANGARI, T.; MELTON-CELSA, A. R.; PANDA, A.; BOISEN, N.; SMITH, M. A.; TATAROV, I.; DE TOLLA, L. J.; NATARO, J. P.; O'BRIEN, A. D. Virulence of the Shiga Toxin Type 2-Expressing *Escherichia coli* O104:H4 German Outbreak Isolate in Two Animal Models. **Infect Immun.**, 81:1562-1574, 2013.