



Universidade
Estadual de
Londrina

Marcela Ribeiro Gasparini

**Avaliação de uma vacina com proteínas recombinantes de
Anaplasma marginale agregadas ao adjuvante
ISCOMATRIX**

Londrina

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcela Ribeiro Gasparini

**Avaliação de uma vacina com proteínas recombinantes de
Anaplasma marginale agregadas ao adjuvante
ISCOMATRIX**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Marilda Carlos Vidotto

Londrina

2010

Marcela Ribeiro Gasparini

**Avaliação de uma vacina com proteínas recombinantes de
Anaplasma marginale agregadas ao adjuvante
ISCOMATRIX**

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em Ciência Animal da
Universidade Estadual de Londrina

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Odilon Vidotto
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Alessandro Pelegri Minho
IAPAR

Londrina, 10 de Fevereiro de 2010.

Dedicatória

Aos meus pais, aos meus amigos, ao meu amor e a todos pelo imenso carinho.

Epígrafe

“Quem já passou por essa vida e não viveu, pode ser mais, mas sabe menos do que eu, porque a vida só se dá para quem se deu.....”

Vinícius de Moraes

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Odilon Vidotto que sempre me incentivou a pesquisa e pela orientação e confiança.

À Prof^a. Dr^a. Marilda Carlos Vidotto orientação durante o projeto e pela presença nos momentos de dúvida.

Ao Prof. Dr. João Luis Garcia pela contribuição para a realização desse projeto.

À Dr^a. Elizabete Regina Marangoni Marana pela amizade e colaboração durante todo processo.

Ao funcionário Aldair Calisto de Matos pela indispensável ajuda principalmente com os animais durante o experimento e a todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização do projeto.

A todos os professores da graduação e pós-graduação que de alguma forma contribuíram no meu aprendizado.

À Adriana Letícia Mendes Coêlho pela amizade, por todos os momentos de raiva e alegria que passamos juntas durante todo longo período da graduação ao mestrado.

Aos estagiários Daniel Ribeiro Belussi, Denise do Amaral Gomes Nascimento, Amanda Fonseca Zangiolamo, Dennys Fernandes Higashi e Rafaela Guedes Buosi pela colaboração, disposição e amizade durante tempo que estavam presentes.

Aos amigos da pós-graduação pela amizade e companheirismo.

Aos companheiros de trabalho Rafael Felipe da Costa e Gislaine Cristina Ferreira da Silva presentes em todos os momentos de apuro ou de alegria, pela contribuição e carinho.

À minha irmã Bruna Ribeiro Gasparini pela compreensão, amizade e pela ajuda em todos os momentos.

Ao meu namorado Luis Henrique pela compreensão, colaboração, paciência e pelo carinho durante todo processo.

Aos meus pais Edimar e Mauro pela confiança e motivação em todos os momentos da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Lista de figuras

- Figura 1: Gel de poliacrilamida 12% corado com comassie blue, ilustrando a expressão da proteína rMSP1a de *A. marginale*. Canaleta 1: BL21 pura; canaleta 2: BL21/pET102/MSP1a não induzida; Canaleta 3: BL21/pET102/MSP1a induzida; Canaleta 4: rMSP1a R-F3 e canaleta 5: Padrão de peso molecular BenchMark.....54
- Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão do preparado do adjuvante ISCOMATRIX para produção da vacina de proteína recombinante com rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5. Circulo ilustra as micelas típicas constratado com ácido fosfotungistenio 0,02% de vesículas de 40 nm.....55
- Figura 3: Resposta humoral IgG total pela técnica do ELISA de bovinos imunizados Grupo 1 - ISCOMATRIX+rMSPs, Grupo 2 - Controle do ISCOMATRIX e Grupo 3 - Controle negativo. Dia 0 primeira dose, dia 21 segunda dose, 42 terceira dose e 73 desafio.....56
- Figura 4: Resposta humoral IgG1 pela técnica do ELISA de bovinos imunizados Grupo 1 - ISCOMATRIX+rMSPs, Grupo 2 - Controle do ISCOMATRIX e Grupo 3 - Controle negativo. Dia 0 primeira dose, dia 21 segunda dose, 42 terceira dose e 73 desafio.....57
- Figura 5: Resposta humoral IgG2 pela técnica do ELISA de bovinos imunizados Grupo 1 - ISCOMATRIX+rMSPs, Grupo 2 - Controle do ISCOMATRIX e Grupo 3 - Controle negativo. Dia 0 primeira dose, dia 21 segunda dose, 42 terceira dose e 73 desafio.....58
- Figura 6: Western Blotting dos soros dos animais imunizados com a vacina ISCOMATRIX+rMSPs com as MSPs. Canaleta 1 - BL21 pura, 2 - BL21 sem indução, 3 - BL21 induzida e 4 - proteína purificada. A - proteína recombinante MSP1a R-F3; B - proteína recombinante MSP1b; C - proteína recombinante MSP4 e D) proteína recombinante MSP5.....59
- Figura 7: Relação das temperaturas médias e volume globular dos bezerros após o desafio com cepa virulenta de *Anaplasma marginale*.....60

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1 Anaplasmoses.....	11
1.1 <i>Anaplasma marginale</i>	11
1.2 Caracterização protéica.....	13
1.3 Complexos imunoestimulantes.....	16
1.3.1 ISCOMATRIX.....	16
1.4 Vacinas para <i>A. marginale</i>	17
1.5 Conclusões.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	32
“Avaliação de uma vacina com proteínas recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> agregadas ao adjuvante ISCOMATRIX	
Resumo.....	33
Abstract.....	34
3.1 INTRODUÇÃO.....	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2.1 Extração de DNA de <i>Anaplasma marginale</i>	36
3.2.2 Reação em cadeia pela polimerase.....	37
3.2.3 Clonagem e expressão do fragmento do gene MSP1a R-F3.....	37
3.2.4 Produção e purificação de proteínas rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5.....	38
3.2.5 Preparo do ISCOMATRIX e Vacina ISCOMATRIX+rMSPs.....	39

3.2.6	Imunização de bovinos com vacina ISCOMATRIX+rMSPS.....	40
3.2.7	Monitoramento dos animais.....	40
3.2.8	ELISA Indireto para IgG total, IgG1 e IgG2.....	41
3.2.9	Western Blotting.....	42
3.3	RESULTADOS.....	42
3.3.1	Clonagem, expressão e purificação do fragmento R-F3 do gene MSP1a.....	42
3.3.2	Caracterização do ISCOMATRIX.....	43
3.3.3	Resposta humoral induzida pela vacina ISCOMATRIX+rMSPs em bezerros imunizados.....	43
3.3.4	Monitoramento dos animais após o desafio.....	44
3.4	DISCUSSÃO.....	44
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
3.6	FIGURAS.....	54
4	CONCLUSÃO GERAL.....	61
5	APÊNDICE.....	62

GASPARINI, Marcela Ribeiro. Avaliação de uma vacina com proteínas recombinantes de *Anaplasma marginale* agregadas ao adjuvante ISCOMATRIX. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Estadual de Londrina. 2010.

RESUMO

Anaplasma marginale pertencente à ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae* é transmitido por carrapatos e causa anemia hemolítica durante infecção aguda provocando prejuízos econômicos à pecuária bovina, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Seis proteínas principais de superfície (MSPs) foram caracterizadas, MSP1a (105kDa), MSP1b (100Kda), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa) e MSP5 (19 kDa). A partir do sequenciamento do genoma do *A. marginale*, 21 novas proteínas antigênicas foram identificadas nos corpúsculos iniciais, das quais, 14 são proteínas de secreção do tipo IV, incluindo a VirB9 e VirB10. A maioria dessas proteínas são antigênicas e podem induzir a produção de anticorpos em animais durante uma infecção natural ou vacinação com corpúsculos iniciais de *A. marginale*, tornando-as importantes na pesquisa de imunógenos para o diagnóstico e a imunoprofilaxia da infecção. Os objetivos deste trabalho foram a clonagem e expressão do fragmento R-F3 do gene MSP1a no vetor pET102/D-TOPO, produção em grande escala de proteínas recombinantes rMSP1a fração R-F3, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5, elaboração de uma vacina com o adjuvante ISCOMATRIX e as proteínas recombinantes MSP1a fração R-F3, MSP1b, MSP4 e MSP5 de *A. marginale* e avaliação da resposta imune humoral em bovinos imunizados com a vacina ISCOMATRIX+MSPs. Três grupos de bovinos com idade entre 6 e 8 meses foram imunizados utilizando: GI (n=4): ISCOMATRIX+MSPs; GII (n=2): adjuvante ISCOMATRIX e GIII (n=4): salina como controle negativo. A avaliação da resposta imune foi realizada pelo ELISA Indireto e a resposta específica contra as proteínas pelo Western Blotting. Os animais imunizados com a vacina ISCOMATRIX+rMSPs produziram IgG total, IgG1 e IgG2 e responderam especificamente para cada proteína no Western Blotting. Os animais do grupo controle e controle do ISCOMATRIX, não produziram IgG total e não responderam especificamente no Western Blotting. Não houve alterações nos parâmetros clínicos em nenhum dos animais que receberam a vacina ou naqueles dos grupos controles. A infecção pelo *A. marginale* após o desafio foi confirmada pela PCR em todos os animais do experimento, mas parasitemias variando de 0,001% a 0,15% foram detectadas apenas nos animais dos grupos testemunhas. Pelos resultados obtidos podemos concluir que a vacina ISCOMATRIX+rMSPs contra *A. marginale* estimulou a resposta imune específica dos bezerros vacinados, porém não é possível afirmar se houve proteção, uma vez que não ocorreram diferenças nos parâmetros clínicos e parasitológicos entre os grupo de bezerros vacinados e controles.

Palavras chaves: *Anaplasma marginale*, bovinos, proteínas recombinantes, resposta imune humoral, ISCOMATRIX.

GASPARINI, Marcela Ribeiro. Evaluation of a vaccine with recombinant proteins of *Anaplasma marginale* aggregates to the ISCOMATRIX adjuvant. 2010. Dissertation (Master in Animal Science). Universidade Estadual de Londrina. 2010.

ABSTRACT

Anaplasma marginale belongs to the Order *Rickettsiales*, Family Anaplasmataceae and is transmitted by ticks and causes hemolytic anemia during acute infection and is responsible for economic losses in bovine livestock, mainly in tropical and subtropical regions. Six major surface proteins (MSPs) characterized, MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 Kda), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa) e MSP5 (19 kDa). After the sequencing of *A. marginale* genome 21 new proteins was identified on the initial bodies, from which, 14 are type IV secretion proteins including VirB9 and VirB10. Several of these proteins proved to be antigenic and induce antibodies production in animals during natural infection or vaccination within *A. marginale* initial bodies, making them important on research as an immunogens source for the diagnostic and immunoprophylaxis against infection. The aims of this work were cloning and expression the R-F3 fragment of the MSP1a gene into pET102/D-TOPO vector, production in large scale of recombinant proteins rMSP1a fraction R-F3, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5 de *A. marginale*, construction of a vaccine with the adjuvant ISCOMATRIX plus rMSPs and evaluation of the humoral immune response in bovines immunized with this vaccine. Three bovine groups were immunized using: GI: (n=4) ISCOMATRIX+rMSPs; GII: (n=2) ISCOMATRIX adjuvant control and GIII: (n=4) Saline as negative control. The antibody response was analyzed by indirect ELISA and the specific response against the rMSPs, by Western Blotting. Animals immunized with ISCOMATRIX+rMSPs vaccine produced total IgG, IgG1 and IgG2 as demonstrated by indirect ELISA and presented specific response for each protein in Western Blotting. Animals from control group and ISCOMATRIX control did not produce total IgG and did not present specific response in Western Blotting. There were no alterations in the clinical parameters of vaccinated animals neither in animals of control groups. *A. marginale* infection was confirmed, by PCR, in all of experimental animals after challenged with virulent strain, but parasitemias varying from 0.001% to 0.15% were detected only in animals of the group controls. Based on the results obtained in this work we can conclude that ISCOMATRIX+rMSPs vaccine against *A. marginale* stimulated the immune response in vaccinated calves. Otherwise, was not possible to affirm if there was protection or not, because there were no differences in the clinical and parasitological parameters between vaccinated and no vaccinated calves.

Keywords: *Anaplasma marginale*, bovines, recombinant proteins, humoral immune response, ISCOMATRIX.

Revisão de literatura

1 Anaplasmosse

1.1 *Anaplasma marginale*

A anaplasmosse bovina é causada pelo *Anaplasma marginale*, Anaplasmataceae intraeritrocitário obrigatório de bovinos (THEILER, 1910), classificado na Ordem Rickettsiales (RISTIC; KREIER, 1974), Família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). A doença tem distribuição mundial e acomete principalmente bovinos domésticos e selvagens (KOCAN et al., 2004a; de La FUENTE et al., 2005a, de La FUENTE et al., 2009) de regiões tropicais e subtropicais, pois nestas regiões as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento dos transmissores biológicos.

A transmissão ocorre de forma biológica ou mecânica por um grupo diversificado de artrópodes, incluindo carrapatos e insetos hematófagos, e também pela via transplacentária (KREIER et al., 1991; KOCAN et al., 2003, 2004b). A transmissão biológica do *A. marginale* é feita pelo carrapato com envolvimento de aproximadamente 20 espécies em todo mundo (DIKMANS, 1950; EWING, 1981; KOCAN et al., 2004b). O carrapato *Rhiphycephalus (Boophilus) microplus* é considerado o principal transmissor de *A. marginale* no Brasil (MARTINS; CORRÊA, 1995). Pesquisas recentes mostram que a transmissão biológica por carrapato foi mais eficiente que a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans* (SCOLES et al., 2005). Outros vetores como fômites contribuem para a transmissão da doença (GUGLIELMONE, 1994; SOLARI; QUINTANA, 1994; FARIAS, 1995). Em bovinos a forma congênita de transmissão pode ocorrer, ocasionando a anaplasmosse neonatal (ZAUGG, 1985; RIBEIRO et al., 1995).

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer pelo carrapato de estágio para estágio (interestadial) ou dentro de um estágio (intraestadial), enquanto a transmissão transovariana ainda é motivo de discussão, embora já tenha sido relatada para *Dermacentor andersoni* (HOWELL et al., 1941), e recentemente larvas de *R. microplus*, provenientes tanto de pastagens de áreas endêmicas para anaplasmosse, quanto de teleóginas alimentadas em animais positivos para *A. marginale*, tenham sido encontradas positivas na PCR, o que representa uma

possibilidade de transmissão transovariana (STICH et al., 1989; SHIMADA et al., 2004). A transmissão intraestadial é realizada principalmente por carrapatos machos, devido a sua longevidade e mobilidade entre os bovinos (KOCAN et al., 2003). Os machos de *D. andersoni* e *D. variabilis* têm sido apontados como os principais transmissores biológicos nos Estados Unidos (KOCAN et al., 1981, 1985), e *R. microplus* na América do Sul (AGUIRRE et al., 1994).

A. marginale apresenta formação de corpúsculo de inclusão intra-eritrocitários, visualizado em microscopia óptica como um pequeno ponto escuro bem corado, de localização periférica, variando entre 0,1 μm a 0,8 μm (FARIAS, 1995). Sofrem sucessivas fissões binárias formando quatro a oito corpúsculos de inclusão, que são numerosos na fase aguda da infecção, mas que podem persistir em níveis baixos por vários anos (RISTIC, 1981; MARTINS; CORRÊA, 1995), desta forma, os animais tornam-se fontes de infecção permanentes para bovinos susceptíveis (KUTTLER, 1984).

Após a infecção o animal pode desenvolver a doença na forma aguda, superaguda, leve ou crônica (RISTIC, 1981; MARTINS; CORRÊA, 1995), com um período de incubação que pode variar de 7 a 60 dias com média de 28 dias seguido por aumento na parasitemia. Pode ocorrer anemia grave por intensa destruição de eritrócitos no sistema fagocítico (RISTIC, 1981; FARIAS, 1995). No pico de parasitemia mais de 75% dos eritrócitos podem estar infectados e este quadro pode persistir por uma a duas semanas (NASCIMENTO et al., 1981; KEIER et al., 1991).

Os sinais clínicos observados consistem em anemia hemolítica, icterícia, dispnéia, taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorréias, diarreia, micção freqüente, anorexia, perda de peso, aborto, às vezes agressividade e eventualmente morte na infecção aguda (RISTIC 1981; ALDERINK; DIETRICH, 1981; BARBET, 1995). Bovinos que se recuperam da doença aguda, tornam-se persistentemente infectados, mantendo níveis de parasitemia não detectáveis no esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa (ERIKS et al., 1993; KOCAN et al., 2000; PALMER et al., 2001).

A anaplasmosose está entre as mais importantes doenças dos bovinos, constituindo-se em obstáculo ao desenvolvimento da pecuária bovina nacional, os prejuízos econômicos ocasionados são atribuídos à redução na produção de carne e leite, abortamento, morte e aos custos com o tratamento dos animais (RICKEY, 1981; KUTTLER, 1984). Nas áreas endêmicas geralmente existe um estado de

estabilidade enzoótica, caracterizada pela infecção natural da grande maioria dos animais jovens (MADRUGA et al., 1985).

Bezerros são menos susceptíveis à infecção por *A. marginale* e, quando infectados, são menos propensos ao desenvolvimento da doença clínica, esse evento ainda não é claramente entendido, porém, a influência dos anticorpos colostrais provavelmente tem uma importante função (MADRUGA et al., 1985; KOCAN et al., 2003).

No Brasil, os prejuízos específicos causados pelo *A. marginale* são difíceis de calcular, não só pela morbidade e mortalidade, mas pelas seqüelas que impedem o desenvolvimento normal dos animais e conseqüentemente, os índices produtivos do rebanho (ARTECHE et al., 1992). Dados sobre os prejuízos atribuídos aos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que inclui o *A. marginale*, são estimados em 45 milhões de dólares, considerando apenas os gastos com carrapaticidas e medicamentos para o tratamento da doença. Estes gastos não incluem os prejuízos causados pela diminuição na produção de carne, leite, couro, abortos e morte de animais. Nos Estados Unidos, a perda anual causada pela anaplasmose, devido à morbidade e mortalidade dos animais, é estimada em mais de 300 milhões de dólares e na América Latina em 800 milhões de dólares (KOCAN et al., 2003).

As medidas de controle empregadas para anaplasmose incluem: redução ou eliminação dos transmissores utilizando-se tratamentos dos animais com produtos acaricidas, rotação de pastagem, quimioprofilaxia, premunição com sangue contaminado de bovinos portadores, vacinação com vacinas vivas atenuadas ou cepa heteróloga não patogênica (*Anaplasma centrale*) ou com vacinas mortas (PALMER et al., 1989; VIDOTTO et al., 1998a, 1998b; KOCAN et al., 2003). Contudo, as vacinas existentes têm mostrado um desempenho insatisfatório no controle da anaplasmose, além de diversos problemas de natureza sanitária (KUTTLER, 1994).

1.2 Caracterização protéica

Ainda na década de 80 começaram os primeiros estudos na busca de novos antígenos para a imunização de bovinos contra a anaplasmose (PALMER et al., 1986). Seis proteínas principais de superfície (MSPs) foram caracterizadas, designadas de MSP1a (105kDa), MSP1b (100Kda), MSP2 (36kDa), MSP3 (86kDa),

MSP4 (31kDa) e MSP5 (19kDa) (McGUIRE, 1984; TEBELE et al., 1991a; VISSER et al., 1992; OBERLE et al., 1993; ALLEMAN et al., 1997; KAWASAKI et al., 2007a; MARANA, TAMEKUMI et al., 2009). Essas proteínas são antigênicas e induzem a produção de anticorpos em animais que sofrem infecção natural ou vacinação com corpúsculos iniciais de *A. marginale* (TEBELE, 1991a). As proteínas designadas de MSP1a, MSP1b, MSP4 e MSP5 estão presentes em isolados de diferentes regiões geográficas (PATARROYO et al., 1994; KNOWLES et al., 1996; KANO et al., 2002), tornando-as importantes na pesquisa como fonte de imunógenos para o diagnóstico (KNOWLES et al., 1996) e a imunoprophilaxia da infecção (PALMER et al., 1989). O seqüenciamento genômico do *A. marginale* identificou 21 proteínas antigênicas da membrana externa, das quais, 14 são proteínas de secreção do tipo IV (LOPEZ, 2005). Recentemente foi demonstrado que dentre essas proteínas Virb9 e Virb10 são componentes de proteção contra *A. marginale* (LOPEZ et al., 2007).

A MSP1 é um complexo protéico formado pelas proteínas MSP1a e MSP1b, envolvidas na adesão de *A. marginale* em eritrócitos bovinos e células de carrapatos, sendo que a MSP1b tem importância na adesão de eritrócitos bovinos (PALMER, et al., 1987; McGAREY, et al., 1994ab). As duas proteínas inoculadas no animal separadamente induzem a formação de menor quantidade de anticorpos do que as proteínas associadas (MACMILLAN et al., 2008).

A MSP1a é codificada por uma cópia simples do gene (*msp1 α*) e apresenta variação na massa molecular de 70 a 105 kDa devido ao número de repetições *in tandem* de 28 a 29 aminoácidos entre as diferentes cepas de *A. marginale* (ALLRED et al., 1990; de la FUENTE et al., 2001, 2005b). O polimorfismo genético da MSP1a entre os isolados de *A. marginale* é verificada no número de cópias da sequência gênica codificadora para a proteína, demonstrando ser um marcador genético estável entre as cepas norte americanas com o número de repetições variando de dois a oito (de la FUENTE et al., 2001; BOWIE et al., 2002) e entre as cepas brasileiras de *A. marginale* foram identificadas com três, cinco e seis repetições de aminoácidos (VIDOTTO et al., 2006). Esta proteína está ligada covalentemente com a MSP1b, codificada por dois genes (*msp1 β 1* e *msp1 β 2*), formando o complexo MSP1 (PALMER et al., 1986; BARBET et al., 1987, 1991; VIDOTTO et al., 1994; CAMACHO-NUEZ et al., 2000).

A imunização de animais com o complexo MSP1 nativo conferiu uma proteção significativa contra desafios com isolados homólogos e heterólogos de *A.*

marginale (PALMER et al., 1986; 1989; CAMACHO-NUEZ et al., 2000;), indicando que o epitopo T, que estão localizadas na região C terminal da MSP1a, a qual estimula altos níveis de interferon (INF- γ), promovendo uma intensa proliferação de células mononucleares de sangue periférico e de células T-CD4+. A resposta humoral foi observada contra as MSP1a e MSP1b (BROWN et al., 2002).

As MSP2 e MSP3 são codificadas por família multigenes e contém uma ampla região hipervariável entre os isolados de *A. marginale* (ALLEMAN et al., 1997; FRENCH et al., 1998; KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; ABBOTT et al., 2004). A variação antigênica da MSP2 pode ocorrer no mesmo ciclo de parasitemia da infecção aguda (EID, et al., 1996) e foram detectados três variantes antigênicos da MSP2 numa infecção persistente. A atividade dessas proteínas esta ligado ao mecanismo de evasão da resposta imune e, persistência do microrganismo no hospedeiro (FRENCH et al., 1998; PALMER et al., 2000).

A proteína MSP4 é codificada por uma única copia gênica altamente conservada em isolados de diferentes regiões geográficas, são marcadores estáveis para caracterização gênica de cepas de *A. marginale* (de La FUENTE et al., 2003, 2004). A MSP4 apresentou-se conservada nos isolados brasileiros, apresentado imunidade protetora similar a MSP2, sugerindo que essas proteínas apresentam sequências com identidade altamente significativas responsáveis pela resposta imune protetora, antigenicamente polimórficas (KAWASAKI et al., 2007a). A fração de membrana apresenta epitopos antigênicos, pois estimulou a resposta imune de bovinos e os protegeu frente a desafio virulento. (OBERLE, 1993; PALMER et al., 1994; KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; VIDOTTO et al., 2006; KAWASAKI et al., 2007a).

A conservação da MSP5 em todas as espécies de *Anaplasma* (*A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*) aliada à sua presença em glândulas salivares de carrapatos infectados com *A. marginale*, sugere a importância dessa proteína no ciclo de vida do parasita (VISSER et al., 1992; KNOWLES et al., 1996). Estudos epidemiológicos e imunológicos utilizando diferentes MSPs revelaram que a proteína MSP5 em particular apresenta características antigênicas que possibilitam seu emprego como antígeno nos ensaios de diagnóstico de anaplasmose bovina conferindo sensibilidade e especificidade aos testes (KNOWLES et al., 1996; VIDOTTO et al., 1998b).

1.3 Adjuvantes

O primeiro relato do uso de adjuvantes foi realizado em 1926 com um composto de alumínio para difteria (GLENNY, 1926), ainda hoje se utiliza o alumínio como adjuvante em vacinas humanas (VOGEL et al., 1995). O objetivo de uma vacina é gerar uma resposta forte e duradoura contra infecções, ao contrário de vacinas vivas atenuadas e inativadas, a vacina de subunidade geralmente necessita da adição de um adjuvante para ser eficiente na produção de uma resposta imune contra um patógeno (PETROVSKY, 2004). Os adjuvantes podem ser usados para diversos fins como potencializar a imunogenicidade de um antígeno recombinante, reduzir a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias para proteção imunológica, para melhorar a eficácia em recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos ou melhorar a adsorção de antígenos pela mucosa (RAMON et al, 1926).

Um adjuvante ideal tem que ser estável e de longa duração, biodegradável, baixo custo de produção, não causar resposta imunológica quando administrada sem antígeno e aumentar a resposta humoral e celular (EDELMAN, 1980). Em contrapartida o uso de adjuvantes pode acarretar reações locais como dor, inflamação, necrose local, linfadenopatia e abscessos e/ou reações sistêmicas incluindo náusea, febre, eosinófilia, alergia e anafilaxia (ALLISON, 1991).

1.3.1 ISCOMATRIX

Os complexos imunoestimulantes (ISCOMs) têm sido muito utilizados na elaboração de vacinas de subunidades. A incorporação das MSPs recombinantes em ISCOM pode reconstituir a disposição natural dessas proteínas, que poderá induzir uma imunidade protetora contra *A. marginale*. ISCOMs são complexos coloidais estáveis constituídos pelo adjuvante Quil A mais colesterol e fosfolípidos (MOREIN et al., 1984; COPLAND et al., 2000; ANDERSSON et al., 2000), são partículas coloidais simétricas estabilizadas por interações hidrofóbicas durante a junção de subunidades formando vesículas de 40-100 nm (LÖVGREN; MOREIN, 1988; KERSTEN et al., 1991). Este estimulante tem sido utilizado na incorporação de proteínas nativas e recombinantes de bactérias, vírus e protozoários e tem

demonstrado aumento dos títulos de anticorpos para proteínas de membrana (MOREIN et al., 1984; KERSTEN et al., 1998).

O ISCOMATRIX é semelhante ao ISCOM, exceto pela falta de antígeno na mesma estrutura (LÖVGREN; MOREIN, 1988). A combinação do antígeno com ISCOMATRIX adjuvante é denominado vacina ISCOMATRIX. Muitos estudos têm demonstrado a habilidade do ISCOM e vacina ISCOMATRIX em induzirem alta produção de anticorpos antígeno-específico e resposta imune celular para vários antígenos, em várias espécies animais (TAKAHASHI et al., 1990; MOWAT et al., 1991; BARR; MITCHELL, 1996; SJÖLANDER et al., 1998; KAWASAKI et al., 2007b), incluindo primatas não-humanos e humanos (ENNIS et al., 1999; POLAKOS et al., 2001; RIMMELZWAAN et al., 2001).

Quil A aumenta a imunogenicidade devido à lenta liberação do antígeno e localização dentro do baço com aumento específico de ambas as respostas dos linfócitos B e T para antígenos e mitógenos. ISCOM e vacina ISCOMATRIX induzem forte resposta de linfócito T helper 1 (Th1) e helper 2 (Th2), um bom alvo, apresentação e uma excelente resposta de linfócito T citotóxico (CTL) (HÖGLUND et al., 1989; CLASSEN; OSTERHAUS, 1992; MOREIN et al., 1995; BENGTSSON; SJÖLANDER 1996).

1.4 Vacinas para *A. marginale*

As medidas empregadas no controle da anaplasmoose bovina incluem: redução ou eliminação dos transmissores utilizando-se tratamentos dos animais com produtos acaricidas, rotação de pastagem, quimioprofilaxia, premunição com sangue contaminado de bovinos portadores, vacinação com vacinas vivas atenuadas ou cepa heteróloga não patogênica (*Anaplasma centrale*) ou com vacinas mortas (PALMER, 1989; VIDOTTO et al., 1998ab; KOCAN et al., 2000, 2003). Recentemente, uma cepa de *A. marginale* menos virulenta e que aparentemente não é transmissível por *R. microplus* foi descoberta na Austrália por Bock et al. (2003). A cepa denominada “Dawn” vem sendo avaliada como imunógeno naquele país.

As vacinas existentes comercialmente, compostas por cepas vivas atenuadas ou pela cepa heteróloga de *A. centrale*, apresentam limitações pela necessidade de criopreservação, pela eficácia, pois apresentam incapacidade de proteger contra

isolado heterólogo de *A. marginale* e pela possibilidade de indução de isoanticorpos de eritrócitos que são transferidos pelo colostro e causam isoeritrólise dos recém nascidos (KUTTLER et al., 1984).

As vacinas derivadas de sangue infectado apresentam desvantagens, sendo difícil a padronização, e conferem risco de transmissão de outros patógenos, tais como o vírus da diarreia bovina e da leucose bovina, *Babesia* spp, *Trypanossoma* spp, *Brucella* spp, *Mycobacterium* spp e cepas heterólogas de *A. marginale* (ROGERS et al., 1988).

Os corpúsculos iniciais de *A. marginale* semipurificados produzem imunidade eficaz contra a doença clínica (MONTENEGRO et. al., 1991). Segundo Tebele et al. (1991b) bovinos imunizados com fração de membrana externa de *A. marginale* apresentaram uma significativa redução da anemia e parasitemia, demonstrando proteção total aos desafios homólogos e heterólogos.

1.5 Conclusões

Desde a sua descrição no começo do século passado (THEILER, 1910) o *A. marginale* foi objeto de inúmeros estudos devido a sua ampla distribuição geográfica e prejuízos causados à bovinocultura mundial. Apesar dos avanços nos aspectos biológicos, imunológicos, epidemiológicos e genético-moleculares sobre esse patógeno, as medidas contra a anaplasmoze ainda são paliativas, incluindo o controle dos vetores, o manejo dos animais e o uso de cepas virulentas (prémunição clássica) ou de cepas heterólogas (*A. centrale*) para a imunização de bovinos susceptíveis à infecção. Contudo, as pesquisas mais recentes têm se concentrado no conhecimento dos mecanismos de invasão celular e nas chamadas vacinas de segunda geração (proteínas recombinantes) ou de terceira geração (plasmídios recombinantes), abrindo novas e promissoras perspectivas para o controle dessa importante doença dos bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT J.R.; PALMER G.H.; HOWARD C.J.; HOPE J.C.; BROWN W.C.
Anaplasma marginale major surface protein 2 CD4⁺-T-cell epitopes are evenly distributed in conserved and hypervariable regions (HVR), whereas linear B-cell epitopes are predominantly located in the HVR. *Infection and Immunity*, v. 72, p.7360-7366, 2004.
- AGUIRRE D.H.; GAIDO A.B.; VIÑABAL A.E.; de ECHAIDE S.T.; GUGLIELMONE A.A. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different level rickettsaemia. *Parasite*, v.1, p. 405-407, 1994.
- ALDERINK, F. J.; DIETRICH, J. 1981. *Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey*. p. 27-44. In Proceedings of the Seventh National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University Press, Starkville, Miss.
- ALLEMAN, A.R.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PERRYMAN, L.E.; BARBET, A.F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infection and Immunity*, v.65, p.156-163, 1997.
- ALLISON, A.C.; BYARS, N.E. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology*, v.28, p.279-284, 1991.
- ALLRED, D.R.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; LEIB, S.R.; HARLLINS, T.M.; MCELWAIN, T.F.; BARBET, A.F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, v.87, p.3220-3224, 1990.
- ANDERSSON, C.; SANDBERG, L.; WERNERUS, H.; JOHANSSON, M.; LOVGREN-BENGTSSON, K.; STAHL, S. Improved systems for hydrophobic tagging of recombinant immunogens for efficient iscom incorporation. *Journal Immunological Methods*, v.21, n.238(1-2), p.181-193, 2000.

ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas da *Babesia spp* e de cepa de *Anaplasma*. *A Hora Veterinária*, ano 11, n. 66, p. 39-42, 1992.

BARBET, A.F.; PALMER, G.H.; MYLER, P.J.; MCGUIRE, T.C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infection and Immunity*, v.55, p.2428-2435, 1987.

BARBET, A.F.; ALLRED, D.R. The *msp1b* multigene family of *Anaplasma marginale*: Nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infection and Immunity*, v. 59, n.3, p. 971-976, 1991.

BARBET, A.F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 43-49, 1995.

BARR, I.G.; MITCHEK, G.F. ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunology and Cell Biology*, v.74, p.8-25, 1996.

BENGTTSSON, K.A.; SJÖLANDER A. Adjuvant activity of ISCOMs: effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine*, v.14, p.753-760, 1996.

BOCK R.E.; de VOS A.J.; KINGSTON T.G.; CARTER P.D. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v.118, p.121-131, 2003.

BOWIE, M.V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; BARBET, A.F. Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cycling transmission between ticks and cattle. *Gene*, v.282, p.95-102, 2002.

BROWN, W.C.; MCGUIRE, T.C.; MWANGI, W.; KEGERREIS, K.A.; MACMILLAN, H.; LEWIEN, H.A.; PALMER, G.H. Major Histocompatibility complex class II- derived DR- restricted memory CD4+ T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infection and Immunity*, v.70, p.5521, 2002.

CAMACHO-NUEZ, M.; MUNHOZ, M. L.; SUAREZ, C.E.; MCGUIRE, T.C.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Expression of polymorphic *msp1b* genes during acute

Anaplasma marginale rickettsemia. *Infection and Immunity*, v. 68, p.1946-1952, 2000.

CLASSEN, I.; OSTERHAUS, A. The ISCOM structure as an immune enhancing moiety: experiences in viral systems. *Research in Immunology*, v.743, p. 531-541, 1992.

COPLAND, M.J.; RADES, T.; DAVIES, N.M. Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.196, n.2, p.135-139, 2000.

de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOWIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of de erlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and ticks cells. *Internal of Journal of Parasitology*, v.31, p.145-153, 2001.

de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOWIN, E.F.; KOCAN, K.M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Veterinary Microbiology*, v.91, n.2-3, p.265-283, 2003.

de la FUENTE, J.; PASSOS, L.M.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; RIBEIRO, M.F.B.; FACURY-FILHO, E.J.; KOCAN, K.M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.121, p.307-316, 2004.

de la FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; HOFLE, U.; FERNÁNDEZ de MERA, I.G.; VILLANUA, D.; ALMAZÁ N.C.; TORINA, A.; KOCAN, K.M.; GORTÁZAR, C. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v.5, p.390–401, 2005a.

de la FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M.L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal Health Research Reviews*, v. 6, p.75-89, 2005b.

de la FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; ZIVKOVIC, Z.; NARANJO, V.; ALMAZÁN, C.; ESTEVES, E.; JONGEJAN, J.; DAFFRE, S.; MANGOLD, A.J. Functional genomics and evolution of tick-Anaplasma interactions and vaccine development. *Veterinary Parasitology*, in press, 2009.

DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. *American Journal Veterinary Research*, v.11, p.5–16, 1950.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S.T.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.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 *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and Immunity*, v.64, p.836-841, 1996.

EDELMAN, R. Vaccine adjuvants. *Reviews Infectious Diseases*, v.2, p.370-383, 1980.

ENNIS, F.A.; CRUZ, J.; JAMESON, J.; KLEIN, M.; BURT, D.; THIPPHAWONG, J. Augmentation of human influenza A virus-specified cytotoxic T lymphocyte memory by influenza vaccine and adjuvanted carriers (ISCOMs). *Virology*, v.259, p.256-261, 1999.

ERIKS, I.S.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p. 2091-2096, 1993.

EWING, S.A. *Transmission of Anaplasma marginale by arthropods*. In: Hidalgo, R.J., Jones, E.W. (Eds.), Proc. 7th Nat. Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS, pp. 395–423, 1981.

FARIAS, N. A. da R. *Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina*, Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS, p.80 , 1995.

FRENCH, D.M.; MCELWAIN, T.F.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and Immunity*, v.66, n.3, p.1200-1207, 1998.

GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H.; WALLACE, V. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *Journal Patch Bacteriology*, v.29, p. 38-45, 1926.

GUGLIELMONE, A. Epidemiologia y Prevencion de los Hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en la Argentina. In: NARI, A.; FIEL, C. *Enfermedades parasitarias de importancia econômica en bovinos*. Editorial Hemisferio Sur. 1994, Cap. 23, p. 460-479, 1994 .

HÖGLUND, S.; DALSGARD, K.; LÖVGREN, K.; SUNDQUIST, B.; OSTERHAUS, A.; MOREIN, B.; HARRIS, R.J. *Subcellular Biochemistry*, v.39-68. Plenum, New York, 1989.

HOWELL, D.E.; STILES, G.W.; MOE, L.H. The fowl tick (*Argas persicus*), a new vector of anaplasmosis. *American Journal Veterinary Research*, n.4, p.73-75, 1941.

KANO, F.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R.C.; VIDOTTO, M.C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.87, p. 131-138, 2002.

KAWASAKI, P.M.; KANO, F.S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C. Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of rMSP4 from *Anaplasma marginale* isolated from Paraná State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.6, p.15-22, 2007a.

KAWASAKI, P.M.; KANO, F.S.; TAMEKUMI, K.; GARCIA J.L.; MARANA E.R.M.; VIDOTTO O.; VIDOTTO M.C. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). *Research in Veterinary Science*, v. 83, p. 347–354, 2007b.

KERSTEN, G.F.A.; SPIEKSTRA, A.; BEUVERY, E.C.; CROMMELIN, D.J.A. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (ISCOMs). *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1062, p. 165-171, 1991.

KERSTEN, G.F.A.; TEERLINK, T.; DERKS, H.J.G.M.; VERKLEIJ, A.J.; VAN WEZEL, T.L.; CROMMELIN, D.J.A.; BEUVERY, E.C. Incorporation of the major outer

membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae* in saponin-lipid complexes (Iscoms): chemical analysis, some structural features, and comparison of their immunogenicity with three other antigen delivery systems. *Infection and Immunity*, v.56, p.432-438, 1998.

KNOWLES, D.; TORIONI de ECHAIDE, S.; PALMER, G.H.; McGUIRE, T.C.; STILLER, D.; MCELWAIN, T.F. Antibody against *Anaplasma marginale* MSP-5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p. 2225-2230, 1996.

KOCAN, K.M.; HAIR, J.A.; EWING, S.A.; STRATTON, L.G. Transmission the *Anaplasma marginale* Theyler by *Dermacentor andersoni* stiles and *Dermacentor variabilis* say. *American Journal Veterinary Research*, v.42, p.15-18, 1981.

KOCAN, K.M.; BARRON, S.J.; EWING, S.A.; HAIR, J.A. Transmission the *Anaplasma marginale* by adult *Dermacentor andersoni* during feeding calves. *American Journal Veterinary Research*, v.46, p.1565-1567, 1985.

KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; BARBET, A.F. Anaplasmosis control past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.916, p.501-509, 2000.

KOCAN, K.M.; de la FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KOCAN, K.M.; de la FUENTE, J.C.; GOLSTEYN THOMAS, E.J.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; HAMILTON, R.G.; TANAKA, E.E.; DRUHAN, S.E.; KOCAN, K.M. Recent studies on the characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1026, p. 114–117, 2004a.

KOCAN, K.M.; de la FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, v.129, p.285–300, 2004b.

KREIER, J.P.; GOTHE, R.; IHLER, G.M.; KRAMPITZ, H.E.; MERNAUGH, G.;

PALMER, G.H. The Hemotrophic Bacteria: The Families Bartonellaceae and Anaplasmataceae. In: BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DOWORKIN, M.; HARDA, W.;

SCHLEIFER, K.H. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2^a ed. Springer-Verlag, New York. c. 225, p. 3994-4022, 1991.

KUTTLER, K.L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *Journal Wildlife Diseases*, v. 20, p.12-20, 1984.

KUTTLER, K.L.; ZAUGG, J.L.; JOHNSON, L.W. Serologic and clinical responses of premunized vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale*. *American Journal Veterinary Research*, v.45, p.2233, 1994.

LOPEZ, J.E.; SIEMS, W.F.; PALMER, G.H.; BRAYTON, K.A.; MCGUIRE, T.C.; NORIMINE, J.; BROWN, W.C. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immugen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infection and Immunity*, v.73, p.8109-8118, 2005.

LOPEZ, J.E.; PALMER, G.H.; BRAYTON, K.A.; DARK, M.J.; LEACH, S.E.; BROWN, W.C. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infection and Immunity*, v.75, n.5, p.2333-2342, 2007.

LÖVGREN, K.; MOREIN, B. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (ISCOMs). *Biotechnology and applied Biochemistry*, v.10, p. 161-172, 1988.

MACMILLAN, H.; NORIMINE, J.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Physical linkage of naturally complexed bacterial outer membrane proteins enhances immunogenicity. *Infection and Immunity*, v.76, n.3, p.1223-1229, 2008.

MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; GOMES, A.; SCHENK, M.A.M.; De ANDRADE, D.F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 1, p. 135-142, 1985.

MARANA, E.R.M.; KANO, F.S.; VICENTINI, J.C.; SPURIO, R.S.; GASPARINI, M.R.; COELHO, A.L.M.; VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O. Clonagem, expressão, caracterização molecular da proteína de superfície MSP5 da amostra PR-1 de

anaplasma marginale e sua aplicação em um teste de ELISA por competição.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v.18, n.2, p.5-12, 2009.

MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L. Babesiose e anaplasmoses bovina: aspectos destas enfermidades. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 51-58, 1995.

MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; GOFF, W.L.; JOHNSON, M.I.; DAVIS, W.C. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, v.45, n.3, p.697-700, 1984.

MCGAREY, D.J.; ALLRED, D.R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infection and Immunity*, v.62, p.4587-4593, 1994a.

MCGAREY, D.J.; BARBET, A.F.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ALLRED, D.R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a e 1b. *Infection and Immunity*. v. 62, n. 19, p. 4594-4601, 1994b.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M.A.; BENITEZ, M.T.; LEON, E.; BAEK, B.K.; GUILLEN, A T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitology Research*, v.77, p. 93-101, 1991.

MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HOGLUND, S.; DALSGAARD, K.; OSTERHAUS, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, v.308, p.457-460, 1984.

MOREIN, B.; LÖVGREN, K.; RÖNNBERG, B.; SJÖLANDER, A.; VILLACRÉS-ERIKSSON, M. Immunostimulating complexes. *Clinical potential in vaccine development. Clinical Immunotherapy Adis International Ltd.*, v.3, p.409-448, 1995.

MOWAT; A.M.; DONACHIE, A.M.; REID, G.; JARRET, O. Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes in vivo and are immunogenic by the oral route. *Immunology*, v.72, p.317-322, 1991.

OBERLE, S.M.; PALMER, G.H.; BARBET, A.F. Expression and immune recognition of the conserved MSP-4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.61, p.5245-5251, 1993.

OLIVEIRA, J.B.; MADRUGA, C.R.; SCHENK, M.A.M.; KESSLER, R.H.; MIGUITA A.M.; ARAÚJO, F.R. Antigenic characterization of four Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* Rickettsiaceae: Ehrlichiae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.395-400, 2003.

PALMER, G. H.; BARBET, A.F.; DAVIS, W.; MCGUIRE, T.C. Immunization with an isolate common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science*, v.231, p.1299-1302, 1986.

PALMER, G.H.; WAGUELA, S.D.; BARBET, A.F.; DAVIS, W.C.; MCGUIRE, W.C. Characterization of a neutralization sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *International Journal for Parasitology*, v.17, n.7, p.1279-1285, 1987.

PALMER, G.H., 1989. *Anaplasma vaccines*. In: I.G. Wright (Ed.) *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 1-29.

PALMER, G.H.; EID, G.; BARBET, A.F.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by polymorphic multigene family. *Infection and Immunity*, v.62, p.3808-3816, 1994.

PALMER, G.H.; BROWN, W.C.; RURANGIRWA, F.R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the Ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infection*, v.2, p.167-176, 2000.

PALMER, G.H., RURANGIRWA, F.R., MCELWAIN, T.F. Strain composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *Journal Clinical Microbiology*, n.39, p.631-635, 2001.

PATARROYO, J.H.; HENCKEL, D.J.; PRATES, A. A.; MAFRA, C.L. Antigenic profile of pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin using western blot technique. *Veterinary Parasitology*, v.52, p.124-137, 1994.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*, v.82, p.488-496, 2004.

POLAKOS, N.K.; DRANE, D.; COX, J. Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a non-classical ISCOM vaccine. *Journal of Immunology*, v.166, p.3589-3598, 2001.

RAMON, G. Procédes pour accroître la production des antitoxins. *Annals Institutes Pasteur*, v.24, p.1-10, 1926.

RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M.; SCATAMBURLO, M.A.; MARTINS, N.E. Transmissão congênita de anaplasmoze bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 47, n. 3, p. 297-304, 1995.

RICHEY, E.J. Bovine anaplasmosis. In: Howard, R. J. (ed.) Current Veterinary Therapy. *Food Animal Practice*, p.767-772, 1981.

RIMMELZWAAN, G.F.; NIEUWKOOP, N.; BRANDENBURG, A. A randomised, double blind study in young healthy adults comparing cell mediated and humoral immune responses induced by influenza ISCOM vaccines and conventional vaccines. *Vaccine*, v.19, p.1180-1187, 2001.

RISTIC, M.; KREIER, J.P. *Family Anaplasmataceae*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan RE, Gibbons NE, ed. Baltimore: Williams & Wilkins, ed. 8. p.906-914, 1974.

RISTIC, M.; MCINTYRE, I. Diseases of Cattle in the Tropics - Economic and Zoonotic Relevance. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, v. 6, p. 327-344, 1981.

ROGERS, R.J.; DIMMOCK, C.K.; VOS, A.J.; RODWELL, B.J. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Australian veterinary journal*, v.65, p.285-287, 1988.

SHIMADA, M.K.; YAMAMURA, M.H.; KAWASAKI, P.M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, v.1026, p.95-102, 2004.

SCOLES G.A.; BROCE A.B.; LYSYK T.J.; PALMER G.H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, v.4, p. 668-675, 2005.

SJÖLANDER, A.; COX, J.C.; BARR, I.G. ISCOMs. Na adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 64, p. 713-723. 1998.

SOLARI, M. A.; QUINTANA, S. Epidemiologia y Prevencion de los Hemoparasitos (Babesia y Anaplasma) en el Uruguay. In: NARI, A.; FIEL, C. *Enfermedades parasitarias de importancia econômica en bovinos*. Editorial Hemisferio Sur, 1994, Cap. 24, p. 481-507, 1994.

STICH R.W.; KOCAN, K.M.; PALMER, G.H.; EWING, S.A.; HAIR, J.A.; BARRON, S.J. Transestadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *American Journal Veterinary Research*, v.50, p.1377-1380, 1989.

TAKAHASHI, H.; TAKESHITA, T.; MOREIN, B.; PUTNEY, S.; GERMAIN, R.N.; BERZOFSKY, J.A. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelop protein in ISCOMs. *Nature*, v.344, p.873-875, 1990.

TAMEKUNI, K.; KANO, F.S.; ATALIBA, A.C.; MARANA, E.R.M; VENÂNCIO, E.J.; VIDOTTO, M.C.; GARCIA, J.L.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. Cloning, expression, and characterization of the MSP1a and MSP1b recombinant proteins from PR-1 *Anaplasma marginale* strain, Brazil. *Research in Veterinary Science*, v.86, p.98-107, 2009.

TEBELE, N.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity*, v.59, p3199-3204, 1991a.

TEBELE, N.; PALMER, G.H. Cross protective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Tropical Animal Health and Production*, v.23, p.197-202, 1991b.

VIDOTTO, M.C.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, H.G.; KNOWLES, D.P. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.62, n.7, p.2940-2946, 1994.

VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MACHADO, R. Z.; ROCHA, M. A.; SILVA, S. S. Avaliação do desempenho de uma vacina constituída por *Anaplasma centrale* e cepas atenuadas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* contra a Tristeza Parasitária Bovina. *Semina. Ciências Agrárias*, v.19, p.26-30, 1998a.

VIDOTTO, O., BARBOSA, C. S., ANDRADE, G. M., MACHADO, R. Z., ROCHA, M. A., SILVA, S. S. Evaluation of a frozen trivalent attenuated vaccine against

babesiosis and anaplasmosis in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.849, p.420 - 423, 1998b.

VIDOTTO, M.C.; KANO, F.S.; GREGORI, F.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the msp1a and msp4 genes. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.53, p.404-411, 2006.

VISSER, F.S.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D.P. The *Anaplasma marginale* MSP-5 gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, v.60, p.5139-5144, 1992.

VOGEL, F.R.; POWELL, M.F. *A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients*. In: Powell M.F.; Newman, M.J., editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Publishing Corp., p.234-250, 1995.

ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal Veterinary Research*, v. 46, n. 3, p. 570-572, Mar, 1985.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar a resposta imune humoral em bovinos imunizados com proteínas recombinantes do *Anaplasma marginale*

Objetivos Específicos:

- Clonar o fragmento R-F3 do gene MSP1a no vetor de expressão pET102/D-TOPO
- Expressar e purificar a MSP1a R-F3
- Produzir as proteínas recombinantes MSP1b, MSP4 e MSP5
- Avaliar a resposta imune humoral da vacina ISCOMATRIX+rMSPs em bovinos

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**“Avaliação de uma vacina com proteínas recombinantes
de *Anaplasma marginale* agregadas ao adjuvante
ISCOMATRIX”**

Resumo

Anaplasma marginale é o agente etiológico da anaplasmosse bovina que se encontra distribuída mundialmente afetando principalmente regiões tropicais e subtropicais. A doença é caracterizada por febre, anemia hemolítica, aborto, perda de peso e morte. *A. marginale* possui seis proteínas principais de superfície (MSPs) caracterizadas e denominadas MSP1a (105kDa), MSP1b (100Kda), MSP2 (36kDa), MSP3 (86kDa), MSP4 (31kDa) e MSP5 (19kDa). Estas proteínas estão envolvidas em importantes eventos entre as células do hospedeiro e o parasita, como resposta celular e humoral, transporte de nutrientes, adesão e invasão dos eritrócitos e variação antigênica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta humoral de bovinos imunizados com as proteínas recombinantes MSP1a fração R-F3, MSP1b, MSP4 e MSP5 de *A. marginale* agregadas ao ISCOMATRIX. A avaliação da resposta imune foi realizada pelo ELISA Indireto e a resposta específica contra tais proteínas pelo Western Blotting. Os animais imunizados com a vacina ISCOMATRIX+rMSPs produziram IgG total, IgG1 e IgG2 e responderam especificamente para cada proteína no Western Blotting. Os animais do grupo controle e controle do ISCOMATRIX, não produziram IgG total e não responderam especificamente no Western Blotting. Não houve alterações nos parâmetros clínicos em nenhum dos animais que receberam a vacina ou naqueles dos grupos controles. A infecção pelo *A. marginale* após o desafio foi confirmada pela PCR em todos os animais do experimento, mas parasitemias variando de 0,001% a 0,15% foram detectadas apenas nos animais dos grupos testemunhas. Conclui-se que a vacina ISCOMATRIX+rMSPs contra *A. marginale* estimulou a resposta imune específica dos bezerros vacinados, porém não foi possível afirmar se houve proteção, uma vez que não ocorreram diferenças nos parâmetros clínicos e parasitológicos entre os grupos de bezerros vacinados e controles.

Palavras chave: *Anaplasma marginale*, bovinos, proteínas recombinantes, resposta imune humoral, ISCOMATRIX.

Abstract

Anaplasma marginale is the agent of bovine anaplasmosis with worldwide distribution, affecting mainly tropical and subtropical regions. The disease is characterized by fever, hemolytic anemia, abortions, weight loss and death. *A. marginale* present six major surface proteins (MSPs) well characterized, known MSP1a (105kDa), MSP1b (100Kda), MSP2 (36kDa), MSP3 (86kDa), MSP4 (31kDa) e MSP5 (19kDa). These proteins are involved in important events between host and parasite cells, as humoral and cellular immune response, nutrient transport, adhesion, erythrocyte invasion and antigenic variation. The aim of this work was to humoral immune response from bovines immunized with recombinant proteins: fragment R-F3 from MSP1a, MSP1b, MSP4 and MSP5 of *A. marginale* aggregated to ISCOMATRIX. Immune response evaluation was performed by indirect ELISA and Western Blotting. Animals immunized with ISCOMATRIX+rMSPs vaccine produced total IgG, IgG1 and IgG2 as demonstrated by indirect ELISA and presented specific response for each protein in Western Blotting. Animals from control group and ISCOMATRIX control did not produce total IgG and did not present specific response in Western Blotting. There were no alterations in the clinical parameters of vaccinated animals neither in animals of control groups. *A. marginale* infection was confirmed, by PCR, in all of experimental animals, after challenged with virulent strain, but parasitemias varying from 0.001% to 0.15% were detected only in animals of the controls group. Based on the results obtained in this work we can conclude that ISCOMATRIX+rMSPs vaccine against *A. marginale* stimulated the immune response in vaccinated calves. Otherwise, it is not possible to affirm if there was protection or not, because there were no differences in the clinical and parasitological parameters between vaccinated and no vaccinated calves.

Keywords: *Anaplasma marginale*, bovines, recombinant proteins, humoral immune response, ISCOMATRIX.

3.1 INTRODUÇÃO

Anaplasma marginale (THEILER, 1910) pertencente à ordem *Rickettsiales*, família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001) é transmitido por carrapatos que infestam animais. É o principal agente etiológico da anaplasmosse bovina que atinge rebanhos em todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (KREIER, 1981; RISTIC, 1981) causando uma doença economicamente importante na produção bovina (RICHEY; PALMER, 1990), caracterizada clinicamente por febre, anemia hemolítica, perda de peso, aborto e morte (ALDERINK; DIETRICH 1981).

Apesar de vários estudos com o intuito de entender a imunologia e obter imunógenos para obtenção de uma vacina contra *A. marginale*, ainda não foi encontrada uma vacina que possa controlar de maneira eficaz a anaplasmosse bovina. Antígenos imunoprotetores foram identificados na membrana externa da cepa Florida de *A. marginale* (TEBELE et al., 1991; VIDOTTO et al., 1994). Seis proteínas denominadas MSPs (proteínas de superfície principais) foram bem caracterizadas MSP1a (105kDa), MSP1b (100Kda), MSP2 (36kDa), MSP3 (86kDa), MSP4 (31kDa) e MSP5 (19kDa) (McGUIRE, 1984; TEBELE et al., 1991; VISSER et al., 1992; OBERLE et al., 1993; ALLEMAN et al., 1997).

MSP1 é apresenta-se como um complexo protéico constituído pela MSP1a e MSP1b que estão envolvidas nos mecanismos de transporte de nutrientes, adesão e invasão dos eritrócitos (McGAREY et al., 1994). A MSP1a varia em tamanho pelo número de repetições *in tandem* de 28-29 aminoácidos (PALMER; McELWAIN, 1995; ALLEMAN et al., 1997). O número de repetições varia de dois a oito (de la FUENTE et al. 2001; BOWIE et al., 2002) e os isolados de *A. marginale* do Paraná PR1, PR2, PR3 apresentaram três, cinco e seis repetições de aminoácidos (VIDOTTO et al., 2006). Essa região variável, contendo as repetições da MSP1a, é a região R e as regiões F1, F2 e F3, próximas à R, são regiões da MSP1a usadas para mapear os epítomos de células T, os quais estão localizados nas regiões F2 e F3 (BROWN et al., 2002; MACMILLAN et al., 2008).

A MSP4 e MSP5 estão presentes e são conservadas em todos os isolados brasileiros de *Anaplasma marginale* analisados (McGUIRE et al., 1984; OBERLE et al., 1993; KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). A proteína rMSP4 expressa

pela bactéria recombinante BL21/pET102 e a MSP4 nativa foram reconhecidas pelo anticorpo anti-MSP4, mostrando que a rMSP4 apresenta epitopos conservados e sua antigenicidade preservada (KAWASAKI et. al., 2007a).

Adjuvantes Imunoestimulantes (ISCOMs) tem sido utilizado na elaboração de vacinas de subunidades. ISCOMs são complexos coloidais estáveis de adjuvante Quil A, colesterol e fosfolípidos (MOREIN et al., 1984; COPLAND et al., 2000; ANDERSSON, et al., 2000). O ISCOMATRIX é semelhante ao ISCOM, exceto pela falta de antígeno na mesma estrutura (LÖVGREN; MOREIN, 1998) e a combinação do antígeno com ISCOMATRIX adjuvante é denominado vacina ISCOMATRIX.

ISCOM e vacina ISCOMATRIX têm demonstrado habilidade em induzirem alta produção de anticorpos antígeno-específico e resposta imune celular para vários antígenos, em várias espécies animais (TAKAHASHI et al., 1990; MOWAT et al., 1991; BARR; MITCHELL, 1996; SJÖLANDER et al., 1998; KAWASAKI et al., 2007b). Induzem forte resposta de linfócito T helper 1 (Th1) e helper 2 (Th2), um bom alvo, apresentação e uma excelente reposta de linfócito T citotóxico (CLT) (HÖGLUND et al., 1989; CLASSEN; OSTERHAUS, 1992; MOREIN et al., 1995; BENGTSSON; SJÖLANDER, 1996).

As proteínas recombinantes MSP1a, MSP1b, MSP4 e MSP5, obtidas da cepa de *A. marginale* PR1, foram agregadas ao adjuvante ISCOM e ISCOMATRIX e a resposta imune humoral foi avaliada em camundongos Balb/c (KAWASAKI et. al., 2007b). A vacina ISCOMATRIX pode reconstituir a disposição natural das proteínas recombinantes, induzindo uma resposta humoral (KAWASAKI et al., 2007b).

Este trabalho teve como objetivos desenvolver uma vacina com proteínas recombinantes de *Anaplasma marginale* agregadas a ISCOMATRIX e avaliar a resposta imune humoral em bovinos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA de *Anaplasma marginale*

A cepa do *A. marginale* foi obtida a partir de sangue parasitado de bezerros experimentalmente infectados com a cepa PR-1 de Londrina (KANO et al., 2002). A extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial (Purigene DNA Extract Kit™), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.2 Reação em cadeia da polimerase

A técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi utilizada para fazer o monitoramento dos bovinos durante o experimento, desde o momento da seleção dos animais negativos para *A. marginale* até a verificação da positividade após o desafio, foram utilizados os *primers* (F: 5' TGTGCTTATGGCAGACATTTCC 3' e R: 5' AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC 3'), do gene MSP1a que amplificou um fragmento de 964 kD (LEW et al., 2002).

A reação de amplificação do gene pela técnica da PCR foi realizada com a enzima *taq* DNA polimerase® (Invitrogen™ Life Technologies) uma unidade, 20 pmoles de cada primer, 100 mM dioxinucleotídeo trifosfato, 1,5 mM MgCl₂, tampão da PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl) e água. As condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos 94°C/1minuto, 55°C/1minuto e 72°C/1minuto, extensão final 72°C por 7 minutos em termociclador (Eppendorf Mastercycler personal™ Alemanha). O DNA amplificado foi visualizado em gel de agarose 1-2% contendo brometo de etídeo e tampão TEB 1X pH 8,4 (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 6 mM EDTA) e visualizado sob luz UV.

3.2.3 Clonagem e expressão do fragmento R-F3 do gene MSP1a

A subclonagem do gene *msh1α* (região R-F3) foi realizada do plasmídeo recombinante pcDNA3.1/R-F3 (dados inéditos) para o vetor de expressão em *E. coli* pET102, utilizando as enzimas de restrição Xba e HindIII. O fragmento de 1,6 Kb retirado do gel e purificado foi ligado ao vetor de expressão pET102, segundo Sambrook; Maniatis (1990). A mistura de ligação foi utilizada na transformação da *Escherichia coli* TOP10 competente. Colônias isoladas da placa LB contendo ampicilina e incubada a 37°C foram selecionadas e crescidas em meio LB para extração do plasmídeo. Após extração com kit comercial (Qiaprep Spin Miniprep Kit Qiagen™), os plasmídios clonados com o Fragmento R-F3 foram submetidos a PCR com os *primers* (F: 5' TTCCTCGACGCTAACCTG 3' e R: 5' AAGCTGTGTAGTAGTGTCCG 3') para verificar a presença do gene inserido no vetor e analisado em gel de agarose 1%. Após a confirmação da presença do gene R-F3, o plasmídeo recombinante foi utilizado na transformação da *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot, para expressão da proteína recombinante.

As células cresceram em meio de cultura LB caldo contendo 100 µg/ml de ampicilina a 37°C até a obtenção da densidade óptica (D.O.)₅₀₀ 0,7 medido em espectrofotômetro (PG instruments™ UV/VIS Spectrometer T80, China). Para a indução da proteína recombinante é necessário a adição de 1 mM de Isopropil-thio-D-Galactoside (IPTG) o tempo de indução da expressão das proteínas foi de aproximadamente quatro horas. A cultura foi centrifugada a 9200 rpm por 15 minutos (JOUAN™ MR23i, França) para obtenção de um precipitado de células, uma alíquota da cultura analisada a expressão em gel SDS-Poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) em cuba para eletroforese (BioRad™ Mini-Protein Tetra cell, Estados Unidos da América) e outra alíquota, as bactérias foram ressuspensas com uma solução adequada para proteína solúvel. As proteínas foram expressas fusionadas a cauda de poli-histidina (6xHis tag), para facilitar sua purificação em coluna contendo níquel ligado a resina (Qiagen Ni-NTA™).

3.2.4 Produção e purificação de proteínas rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5

Para produção das proteínas recombinantes rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5 bactérias *E.Coli* BL21 Star (DE3) One Shot previamente transformadas em vetores de expressão (KAWASAKI et al., 2007; MARANA et al., 2009, TAMEKUMI et al., 2009), foram crescidas em meio de cultura LB conforme descrito no item 3.2.3. Para a purificação das proteínas solúveis MSP1a R-F3 e MSP1b, o precipitado de células foi ressuspendido em tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl e 10 mM imidazole, (pH 8), adicionado lisozima, α-pTosyl L-lysine chloromethyl Ketone (TCLK) e Phenylmethylnilfonyl fluoride (PMSF). Homogeneizado por 1 hora no gelo, seguidas por ciclos de sonicação, congelamento e descongelamento. Esta suspensão foi centrifugada a 9200 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado na purificação protéica em coluna de resina ligada ao níquel (Qiagen™), fazendo 3 lavagens com tampão de lavagem (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl e 20 mM imidazole, pH 8) e 3 eluições com tampão de eluição (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl e 500mM imidazole, pH 8). A purificação foi analisada em gel SDS-PAGE e a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro.

Para a purificação das proteínas insolúveis MSP4 e MSP5 o precipitado de células foi ressuspendido em tampão de lise A (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 6M

GuHCl pH 8), homogeneizado por 1 hora a temperatura ambiente e adicionado TLCK e PMSF. Em seguida, sonificado com 6 ciclos de 15 segundos e intervalo de 30 segundos, depois centrifugado por 20 minutos a 9200 rpm 4°C e o sobrenadante utilizado na purificação protéica em coluna de resina ligada ao níquel (Qiagen™). A coluna foi previamente preparada com lavagens com água destilada e equilibrada com tampão B (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH8). O lisado foi colocado na coluna e homogeneizado por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de 4 lavagens com tampão C (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH 6,4) e duas lavagens com tampão D (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH 5,9). Posteriormente, 1 eluição com tampão E (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH 4,5) e mais 3 eluições com tampão E (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH4). O produto dessa purificação foi analisado em gel SDS-PAGE e a concentração da proteína foram determinadas pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro.

3.2.5 Preparo do ISCOMATRIX e Vacina ISCOMATRIX+rMSPs

Para o preparo do ISCOMATRIX foram adicionados 500 mg de Fosfatidilcolina e 250 mg de colesterol, dissolvido em 2,5 mL de clorofórmio, mantido em estufa a 45°C até evaporar. O filme formado foi hidratado com 15 mL tampão tris (140 mM, pH 7,4) contendo 500mg de Quil-A. Homogeneizado por 15 horas em temperatura ambiente e liofilizado por 5 horas a -82°C. Finalmente o adjuvante foi hidratado em 30 mL de água por 2 horas, sob agitação (Kawasaki et al., 2007b).

O ISCOMATRIX adjuvante foi corado negativamente com ácido fosfotungstênio e examinado em microscópio eletrônico para confirmar a formação das vesículas características.

A vacina ISCOMATRIX+rMSPs foi preparada adicionando-se 200 µg de cada uma das proteína recombinante rMSP1a R-F3, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5 ao ISCOMATRIX na proporção 1:1. A dose de vacina para cada animal continha 800 µg de rMSPs + 1,5 mL de ISCOMATRIX 5x concentrado, totalizando um volume de 8mL.

3.2.6 Imunização de bovinos com vacina ISCOMATRIX+rMSPs

Os animais utilizados neste experimento eram oriundos do município de Castro, região Sul do Paraná e foram adquiridos de propriedades que mantem seus rebanhos livres de carrapatos. Todos os bezerros escolhidos eram livres da infecção pelo *A. marginale*, confirmado pela PCR e ELISA. Foram utilizados 10 bezerros machos, com idade entre 6 e 8 meses, da raça holandesa, distribuídos aleatoriamente entre os seguintes grupos: GI: 4 animais receberam vacina ISCOMATRIX+rMSPs; GII: 2 animais para o controle do adjuvante ISCOMATRIX e GIII: 4 animais para o controle negativo.

Cada animal do GI recebeu, via intramuscular (IM), três doses de 8,0 mL da vacina ISCOMATRIX+MSPs, com intervalo de 21 dias. Nas mesmas condições, os animais do GII e GIII foram inoculados com o adjuvante ISCOMATRIX e PBS, respectivamente. Todos os animais dos três grupos foram desafiados 30 dias após a última dose da vacina, por via IM, com 2 mL contendo 10^7 eritrócitos infectados da cepa PR-1 *A. marginale*, isolada de um bezerro com anaplasmosse clínica (Kano et al., 2002) e multiplicada em bezerros esplenectomizados um mês antes da inoculação.

3.2.7 Monitoramento dos animais

Os animais foram mantidos em currais separadas com alimentação a base de silagem e concentrado duas vezes ao dia e água a vontade. Os bezerros foram acompanhados diariamente através da aferição da temperatura retal e observação de possíveis manifestações clínicas decorrente do desafio com cepa virulenta de *A. marginale*. Amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular em tubos contendo EDTA, nos dias -7, 0, 21, 42, 73 após a imunização dos bezerros e, a cada dois dias, a partir 10º dia até o final do experimento. Hematócritos e esfregaços sanguíneos corados pelo panótico foram realizados em dias alternados para o acompanhamento do volume globular e da parasitemia. Após o desafio foram realizadas PCR para verificação da infecção pelo *A. marginale* em todos os bezerros.

3.2.8 ELISA Indireto para IgG total, IgG1 e IgG2

Para avaliar a resposta humoral dos bezerros foi utilizado um ELISA Indireto de acordo com Andrade et al., (2004). Placas de ELISA (NUNC™) foram adsorvidas com 1µg/100µL em cada cavidade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* (PALMER; McGUIRE, 1984) em tampão de adsorção (carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6), incubadas overnight a 4°C e bloqueadas com tampão de bloqueio 200µL (Tampão de adsorção 0,1 M + 8% de leite em pó desnatado), após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes com 200 µL de tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,01 M, pH7,4) utilizando-se uma lavadora de placa de ELISA (BioRad™ImmunoWash 8C, França).

Amostras de soros dos grupos foram diluídas 1:400 em PBS-tween 20 (pH 7,4) com 5% de soro de coelho, aplicados 100µL por cavidade e incubadas a 37 °C por 90 minutos. Após 5 lavagens com tampão de lavagem, as placas foram incubadas com conjugado contendo peroxidase anti-bovino IgG (Sigma™) diluídos em PBS-Tween 20 1:20.000 e incubadas por 90 minutos a 37°C em câmara úmida e lavadas novamente com tampão de lavagem. A reação foi revelada com substrato cromógeno OPD 0,4 mg/ML (o-fenilenediamina di-hidroclorídrico, Sigma™) diluído em tampão do substrato (0,1 M ácido cítrico, 0,6 M Na₂HPO₄) e H₂O₂ 0,04%. A reação foi bloqueada com 50µl de 1N HCl. A leitura foi feita em leitor de ELISA com filtro de 490nm (BioRad™imark Microplate Reader, Japão)

Para a determinação de IgG1 e IgG2 os soros foram testados por ELISA indireto conforme Andrade et al. (2004) com pequenas modificações. As placas adsorvidas com o antígeno foram mantidas em temperatura de 4°C por uma noite e após lavagem foram bloqueadas com tampão de bloqueio (tampão de adsorção com 8% de soro equino) por 1 hora a 37°C. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas 1:200 em PBS-tween 20 (pH 7,4) com 5% de soro equino e novamente incubadas a 37°C em câmara úmida por 1 hora. Após as lavagens as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida com conjugado contendo peroxidase anti-bovine IgG1 e IgG2 (BETHYL™), com PBS-Tween 20, diluídos 1:10.000 e 1:15.000, respectivamente. A revelação, bloqueio e leitura das reações seguiu os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a detecção de IgG total.

3.2.9 Western-blotting

Proteínas recombinantes rMSP1a R-F3, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5 purificadas foram solubilizadas em tampão de amostra (0,025 M Tris-HCl, 2% SDS, 15% de glicerol, 2,5% 2-mercaptoetanol, pH 6,8), e submetidos à eletroforese em gel SDS-Poliacrilamida 12% a 100 Volts e 50 mA, em tampão Tris-Glicina (pH 8,8). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL™) durante 12 horas a 30 Volts e 15 mA a 4°C, para realização da técnica de Western-blotting previamente descrito por Towbin et al., 1984. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada sob agitação com PBS-Tween 20 (7 mM Na₂HPO₄; 3 mM KH₂PO₄; 140 mM NaCl; 0,1% Tween 20 e 5% de leite em pó) por uma hora a temperatura ambiente, lavada três vezes por 10 minutos com PBS-T (PBS + 0,1% Tween 20). Em seguida, a membrana foi incubada sob agitação com o um “pool” do soro do GI, na diluição 1:500 em PBS-T +5% de leite em pó. Após 5 lavagens de 10 minutos com PBS-T, a membrana foi incubada sob agitação novamente por uma hora a temperatura ambiente com proteína G ligada a peroxidase na diluição 1:1000 em PBS-T+5% de leite em pó. A membrana foi lavada cinco vezes por 10 minutos e revelada com DAB 5 mg/15mL PBS e 150 µL Peróxido de hidrogênio 30% H₂O₂. Um marcador de peso molecular para proteínas foi utilizado como padrão (BenchMark™ Invitrogen).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Clonagem e expressão do gene *msp1a* R-F3

A inserção do fragmento R-F3 do gene *msp1α* foi confirmado através da clivagem com as enzimas de restrição Xba e HindIII, liberando o fragmento de 1,6Kb do gene MSP1a R-F3 e 6,3Kb do vetor pET102.

A *E. coli* BL21/pET102+*msp1α* induzida com IPTG produziu uma proteína de massa molecular de aproximadamente 74kDa e outra banda menor de 28kDa (Figura 1). A rMSP1a induzida foi recuperada do sobrenadante no teste de solubilidade que a caracterizou como proteína solúvel.

3.3.2 Caracterização do ISCOMATRIX

O adjuvante ISCOMATRIX foi corado negativamente com ácido fosfotúngstico 0,02% na diluição 1:5 e 1:10 e analisado em microscópio eletrônico por transmissão, observou-se a formação de vesículas de 40 nm típicas do adjuvante.

3.3.3 Resposta humoral induzida pela vacina ISCOMATRIX+rMSPs em bezerros imunizados.

A cinética da resposta de anticorpos IgG total pode ser visto na Figura 3. Os animais que receberam a vacina ISCOMATRIX+rMSPs (GI) apresentaram resposta humoral de IgG total, pelo teste de ELISA, 42 dias após a primeira dose da vacina. Aos 73 dias (dia do desafio) houve uma pequena redução na média dos valores de DOs, os quais aumentaram novamente 30 dias após o desafio com a cepa virulenta de *A. marginale*. Os animais do GII (Controle do vetor ISCOMATRIX) e do GIII (Controle negativo) apresentaram DOs abaixo do ponto de corte em todas as dosagens realizadas até o dia do desafio. Vinte dias após o desafio a resposta de anticorpos contra *A. marginale* apresentada por esses dois grupos foi semelhante à do grupo vacinado.

Na figura 4 está a cinética da resposta de anticorpos IgG 1 e a figura 5 a cinética da resposta do IgG2. No GI os subtipos IgG1 e IgG2, conforme constatado pelo ELISA para IgG total, foram detectados após 42 dias da primeira imunização. Os animais do GII e GIII mantiveram-se negativos até 20 dias após o desafio.

A figura 6 mostra a reatividade dos soros dos bovinos do GI que receberam a vacina ISCOMATRIX+rMSPs pelo Western Blotting. Todos os animais reagiram especificamente para cada proteína: MSP1a, MSP1b, MSP4 e MSP5, com bandas de peso molecular 74kDa, 100kDa, 47kDa e 31kDa, respectivamente. Os soros pré imunes e pós imunização do GII (controle do Adjuvante) e GIII (PBS) não reagiram com as proteínas recombinantes.

3.3.4 Monitoramento dos animais após o desafio

Os animais dos GI, GII e GIII não apresentaram alterações clínicas no decorrer do experimento. A figura 7 mostra a variação das médias das temperaturas do volume globular do dia zero até o 47º dia do experimento. Os animais não apresentaram alterações significativas no volume globular e nas temperaturas, mas foram todos positivos pela PCR após o desafio. No esfregaço sanguíneo foram encontrados corpúsculos de inclusão de *A. marginale* nos animais dos GII e GIII, com variação na parasitemia de 0,001% a 0,15%, valores esses que não foram suficientes para causar sinais clínicos evidentes de anaplasmosse.

3.4 DISCUSSÃO

As proteínas de membrana externas (OMPs) dos agentes patogênicos bacterianos são essenciais para o seu crescimento e sobrevivência e especialmente para fixação e invasão nas células do hospedeiro. Desde que a membrana externa é a interface entre a bactéria e a célula hospedeira, as OMPs são direcionadas para o desenvolvimento de vacinas contra muitas doenças bacterianas. Frações de membrana externa frequentemente protegem contra a doença, e essa proteção não pode ser totalmente reproduzida usando as OMPs individuais. As OMPs são geralmente proteínas grandes ricas em epítomos da célula T. No entanto, os epítomos de células T em uma OMP individual não são suficientes para induzir uma resposta forte de células T ou não podem ser eficientemente apresentados para o complexo MHC classe II (MACMILLAN et al., 2008).

As proteínas MSP1a e MSP1b (genes *msp1β1* e *msp1β2*) ocorrem naturalmente sob a forma de complexos na membrana externa do *A. marginale* (PALMER et al., 1986; BARBET et al., 1987, 1991; VIDOTTO et al., 1994; CAMACHO-NUEZ et al., 2000). As OMPs do *A. marginale* também apresentam outras associações através de interações covalentes, bem como não covalentes. Por exemplo, MSP2 e MSP5 podem ocorrer como monômeros ou vinculadas através de ligações dissulfeto, enquanto MSP1, MSP2, MSP3 e MSP4 são as vizinhas mais próximas (VIDOTTO et al., 1994). Estudos anteriores demonstraram que imunização com o complexo nativo MSP1a e 1b induzem forte resposta de imunoglobulina G

(IgG) às duas proteínas, mas apenas MSP1a estimulou fortes respostas de células T CD4. A ligação da MSP1a, que é rica em epítomos da célula T na região R-F3, com a MSP1b1 produziu um efeito imunológico significativo, com altos níveis de produção de anticorpos contra o MSP1b1, o que não foi obtido com a administração de MSP1b1 individual (MACMILLAN et al., 2008).

Neste trabalho, os bezerros do GI imunizados com a vacina ISCOMATRIX+rMSPs (rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5) apresentaram boa resposta de IgG total, IgG1 e IgG2. As proteínas rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5 também foram reconhecidas especificamente no soro dos bezerros imunizados com a vacina ISCOMATRIX-rMSPs pelo Western Blotting, sugerindo a eficácia da vacina de subunidade em uma infecção inicial por *A. marginale*, onde os anticorpos desempenham importante função. Esses resultados estão de acordo com Macmillan et al. (2008), indicando que as interações intermoleculares naturais entre OMPs influenciam a resposta imunológica e podem conduzir à uma vacina mais eficaz.

Os resultados encontrados neste trabalho com bezerros são semelhantes aos obtidos por Kawasaki et. al., (2007b) quando verificaram que camundongos imunizados com uma vacina ISCOMATRIX/rMSPs semelhante a utilizada no presente trabalho, produziram IgG total e reagiram com as rMSPs especificamente pelo Western blotting, evidenciando a rMSP1a (60 a 105 kDa), rMSP1b (100 kDa), rMSP4 (47 kDa) e rMSP5 (31 kDa).

A utilização do adjuvante ISCOMATRIX na elaboração da vacina recombinante para anaplasnose (ISCOMATRIX+rMSPs) contribuiu para a boa resposta imune humoral em bezerros. Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos com ISCOMATRIX+rMSPs em camundongos (KAWASAKI et al., 2007b) e com outros patógenos, onde os animais tiveram alta produção de IgG total e foram protegidos contra desafios (CROUCH et al., 2004; McARTHUR et al., 2004).

No corrente experimento cada bezerro foi desafiado com a dose de 10^7 eritrócitos infectados com a cepa PR1 de *A. marginale*, recentemente multiplicada em bezerros esplenectomizados que apresentaram altas parasitemias e sinais clínicos evidentes de anaplasnose. Os animais do GI que receberam a vacina ISCOMATRIX+rMSPs não apresentaram nenhum sinal clínico evidente de anaplasnose, com as temperaturas corpóreas e volume globular oscilando dentro dos limites de normalidade, resultados que poderiam sugerir uma proteção da vacina contra a infecção do desafio. Entretanto os animais do GII (Adjuvante ISCOMATRIX)

e do GIII (PBS - controle negativo), também não apresentaram sinais clínicos da infecção embora tivessem apresentados baixas parasitemias detectáveis pela microscopia óptica. Ao final do experimento todos os animais estavam positivos para *A. marginale* pela PCR.

Objetivando avaliar o efeito da dose infectante sobre a infecção de bovinos com *A. marginale* Gale et al. (1996), utilizou três grupos de bovinos inoculados com 10^{10} , 10^8 e 10^6 eritrócitos infectados com *A. marginale*. O tempo médio para a parasitemia alcançar 1% dos eritrócitos foi, respectivamente, de aproximadamente 7, 14 e 20 dias para as doses de 10^{10} , 10^8 e 10^6 e as parasitemias máximas, nessa ordem das doses, foram de 23,7, 14,7 e 8,7%. Ainda que os períodos de incubação tenham sido diferentes para cada dose, o tempo médio para as parasitemias de cada grupo alcançar o limite de 15% foram similares. Como não houve diferenças nas variáveis estudadas entre as doses de 10^8 e 10^6 eritrócitos infectados, os autores **sugeriram** a dose de 10^8 para o desafio de animais em experimentos com vacinas.

Pelo critério sorológico há indícios de que pode ter havido proteção nos animais vacinados, uma vez que antes do desafio houve resposta humoral de IgG total, IgG1 e IgG2 significativa apenas no grupo vacinado. **Porém**, pelos critérios clínicos e parasitológicos não é possível afirmar que houve proteção dos animais vacinados, uma vez que os animais do grupo controle negativos também não apresentaram nenhum sinal clínico sugestivo de anaplasmose e tampouco variações significativas no volume globular e da parasitemia.

Não ficou claro o porquê da dose desafio considerada ideal para experimentos (GALE et al. 1996) com vacinas contra *Anaplasma* sp e *Babesia* sp não ter reproduzido infecções evidentes pelo *A. marginale*, **até mesmo** nos animais que não receberam a vacina. Vidotto et al. (1998 a,b) em experimentos de vacinação de bovinos adultos importados com cepa heteróloga de *A. centrale* fizeram desafios com 10^6 eritrócitos infectados com cepa virulenta de *A. marginale*, após duas doses da vacina e aqueles animais que não respondiam à vacina desenvolveram sinais evidentes da doença e na maioria das vezes foram medicados. Andrade et al (2004) em um experimento com vacina de DNA (pcDNA3.1/MSP1b) que obteve proteção parcial, desafiou os bezerros com 10^4 eritrócitos infectados por *A. marginale* e constatou sinais clínicos evidentes de anaplasmose, parasitemias de 0,8 a 1,34% e redução de até 36,0% no volume globular.

Explicações para o não estabelecimento da infecção com sinais clínicos e/ou alterações nos parâmetros avaliados nesse experimento existem e podem estar ligados ao hospedeiro ou ao inóculo utilizado. Os animais apresentavam excelentes condições corpóreas, idade entre 6 e 8 meses e alimentação balanceada rica em proteínas, fatores esses que naturalmente reforçam a imunidade nata do hospedeiro. Por outro lado, pode ter havido problemas no congelamento ou descongelamento, o que poderia causar uma redução na capacidade infectante do inóculo, embora o exame de esfregaço sanguíneo tenha mostrado os corpúsculos iniciais de *A. marginale* com morfologia normal após o descongelamento da cepa.

Como conclusões desse trabalho, podemos afirmar que a vacina ISCOMATRIX+rMSPs contra *A. marginale* estimulou a resposta imune específica dos bezerros vacinados, porém, não é possível afirmar se houve proteção, uma vez que não foram detectadas diferenças nos parâmetros clínicos e parasitológicos entre os grupos vacinado e controle.

3.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERINK, F. J.; DIETRICH, J. *Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey*. p. 27-44. In Proceedings of the Seventh National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University Press, Starkville, Miss, 1981.
- ALLEMAN, A.R., PALMER, G.H., MCGUIRE, T.C., MCELWAIN, T.F., PERRYMAN, L.E., BARBET, A.F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infection and Immunity*, v.65, p.156-163, 1997.
- ANDERSSON, C.; SANDBERG, L.; WERNERUS, H.; JOHANSSON, M.; LOVGREN-BENGTSSON, K.; STAHL, S. Improved systems for hydrophobic tagging of recombinant immunogens for efficient iscom incorporation. *Journal Immunological Methods*, v.21, n. 238, suppl.1-2, p.181-193, 2000.
- ANDRADE, G.M.; MACHADO, R.Z.; VIDOTTO, M.C., VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1026, p. 257–266, 2004.
- BARBET, A.F.; PALMER, G.H.; MYLER, P.J.; MCGUIRE, T.C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infection and Immunity*, v.55, p.2428-2435, 1987.
- BARR, I.G. AND MITCHEKK, G.F. ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunology and Cell Biology*, v.74, p.8-25, 1996.
- BENGTSSON, K.A., SJÖLANDER A. Adjuvant activity of ISCOMs: effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine*, v.14, p.753-760, 1996.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. *Analytical Biochemistry*, v.12, p.234-248, 1976.
- BROWN, W.C.; MCGUIRE, T.C.; MWANGI, W.; KEGERREIS, K.A.; MACMILLAN, H.; LEWIEN, H.A.; PALMER, G.H. Major Histocompatibility complex class II- derived DR- restricted memory CD4+ T lymphocytes recognize conserved immunodominant

epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infection and Immunity*, v.70, p.5521, 2002.

CAMACHO-NUEZ, M.; MUNHOZ, M. L.; SUAREZ, C.E.; MCGUIRE, T.C.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Expression of polymorphic *msp1b* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and Immunity*, v. 68, p.1946-1952, 2000.

CLASSEN, I.; OSTERHAUS, A. The ISCOM structure as an immune enhancing moiety: experiences in viral systems. *Research in Immunology*, v.743, p.531-541, 1992.

COPLAND, M.J.; RADES, T.; DAVIES, N.M. Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.196, n.2, p.135-139, 2000.

CROUCH, C.F; DALY, J.; HANNANT, D.; WILKINS, J.; FRANCIS, M.J. Immune responses and protective efficacy in ponies immunized with an equine influenza ISCOM vaccine containing an 'American lineage' H3N8 virus. *Vaccine*, v.23, n.3, p.418-425, 2004.

de la Fuente, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOWIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of de erlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and ticks cells. *International of Journal of Parasitology*, v.31, p.145-153, 2001.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S.T.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "EGH agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.2145-2165, 2001.

GALE, K.R.; LEATCH, G.; DeVOS, A.J.; JORGENSEN, W.K. *Anaplasma marginale*: Effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology*, v.26, n.12, p.1417-1420, 1996.

HÖGLUND, S.; DALSGAARD, K.; LÖVGREN, K.; SUNDQUIST, B.; OSTERHAUS, A.; MOREIN, B.; HARRIS, R.J. *Subcellular Biochemistry*. Plenum, New York, p.39-68, 1989.

KANO, F.S.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R.C.; VIDOTTO, M.C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.87, p.131-138, 2002.

KAWASAKI, P.M.; KANO, F.S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C. Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of rMSP4 from *Anaplasma marginale* isolated from Paraná State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.6, p.15-22, 2007a.

KAWASAKI, P.M.; KANO, F.S.; TAMEKUMI, K.; GARCIA J.L.; MARANA E.R.M.; VIDOTTO O.; VIDOTTO M.C. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). *Research in Veterinary Science*, v. 83, p. 347–354, 2007b.

KREIER, J.P.; RISTIC, M. The biology of Hemotrophic bacteria. *Annual Review Microbiology*, v.35, p.325-380. 1981.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, v.227, p.680-684, 1970.

LEW, A. E.; BOCK, R.E.; MINCHIN, C.M.; MASAKA, S. A. msp1 polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Veterinary Microbiology*, v. 86, p.325–335, 2002.

LÖVGREN, K. AND MOREIN, B. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (ISCOMs). *Biotechnology and applied Biochemistry*, v.10, p.161-172, 1998.

MACMILLAN, H.; NORIMINE, J.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Physical linkage of naturally complexed bacterial outer membrane proteins enhances immunogenicity. *Infection and Immunity*, v.76, n.3, p.1223-1229, 2008.

McARTHUR, J.; SCHULZE, K.; CHIN, J.; CURRIE, B.J.; SRIPRAKASH, K.S.; TALAY, S.R.; CHATWAL, G.S.; GUZMAN, C.A.; WALKER, M.J. Immune responses of a liposome/ISCOM vaccine adjuvant against streptococcal fibronectin binding

protein 1 (Sfb1) in mice. The Indian Journal of medical research, v.119, p.20-115, 2004.

McGAREY, D.J.; BARBET, A.F.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ALLRED, D.R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a e 1b. *Infection and Immunity*. v. 62, n. 19, p. 4594-4601, 1994.

MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; GOFF, W.L.; JOHNSON, M.I.; DAVIS, W.C. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, v.45, n.3, p.697-700, 1984.

MOREIN, B., SUNDQUIST, B., HOGLUND, S., DALSGAARD, K., OSTERHAUS, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, v.308, p.457-460, 1984.

MOREIN, B.; LÖVGREN, K.; RÖNNBERG, B.; SJÖLANDER, A.; VILLACRES-ERIKSSON, M. Immunostimulating complexes. Clinical potential in vaccine development. *Clinical Immunotherapy Adis International Ltd.*, v.3, p.409-448. 1995.

MOWAT, A.M.; DONACHIE, A.M.; REID, G.; JARRET, O. Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes in vivo and are immunogenic by the oral route. *Immunology*, v.72, p.317-322, 1991.

OBERLE, S.M.; PALMER, G.H.; BARBET, A.F. Expression and immune recognition of the conserved MSP-4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.61, p.5245-5251, 1993.

OLIVEIRA, J.B.; MADRUGA, C.R.; SCHENK, M.A.M.; KESSLER, R.H.; MIGUITA A.M.; ARAÚJO, F.R. Antigenic characterization of four Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* Rickettsiaceae: Ehrlichiae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.395-400, 2003.

PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralize infectivity for cattle. *Journal of Immunology*, v.133, n.2, p.1010-1015, 1984.

PALMER, G. H.; BARBET, A.F.; DAVIS, W.; MCGUIRE, T.C. Immunization with an isolate common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science*, v.231, p. 1299-1302, 1986.

- PALMER, G.H.; McELWAIN, T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v.57, p.233-253, 1995.
- RICHEY, E.J.; PALMER, G.H. Bovine anaplasmosis. *Continuing Education Article* 10, v.12, n.11, p.1661-1668, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning- A laboratory manual*. 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- SJÖLANDER, A.; COX, J.C.; BARR, I.G. ISCOMs. Na adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology*, v.64, p.713-723, 1998.
- TAKAHASHI, H.; TAKESHITA, T.; MOREIN, B.; PUTNEY, S.; GERMAIN, R.N.; BERZOFSKY, J.A. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelop protein in ISCOMs. *Nature*, v.344, p.873-875, 1990.
- TEBELE, N.; PALMER, G.H. Cross protective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Tropical Animal Health and Production*, v.23, p.197-202, 1991.
- TOWBIN, H.; GORDON, H. Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and out look. *Journal of Immunological Methods*, v.72, p.313-340, 1984.
- VIDOTTO, M.C.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, H.G.; KNOWLES, D.P. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.62, n.7, p.2940-2946, 1994.
- VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MACHADO, R. Z.; ROCHA, M. A.; SILVA, S. S. Avaliação do desempenho de uma vacina constituída por *Anaplasma centrale* e cepas atenuadas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* contra a Tristeza Parasitária Bovina. *Semina. Ciências Agrárias*, v.19, p.26-30, 1998a.
- VIDOTTO, O., BARBOSA, C. S., ANDRADE, G. M., MACHADO, R. Z., ROCHA, M. A., SILVA, S. S. Evaluation of a frozen trivalent attenuated vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.849, p.420 - 423, 1998b.
- VIDOTTO, M.C.; KANO, F.S.; GREGORI, F.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. Phylogenetic Analysis of *Anaplasma marginale* Strains from Parana' State, Brazil, Using the msp1a and msp4 genes. *The Journal of Veterinary Medicine*, v.53, p.404-411, 2006.

VISSER, F.S.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D.P. The *Anaplasma marginale* MSP-5 gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, v.60, p.5139-5144, 1992.

3.6 FIGURAS

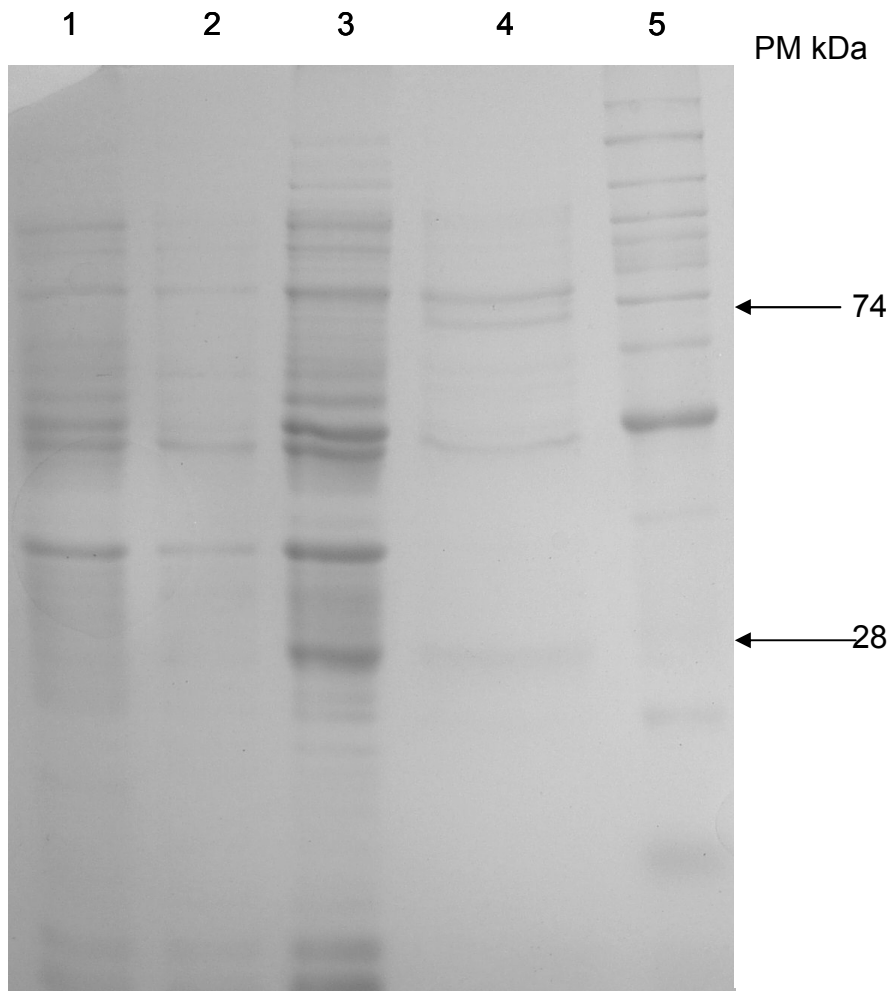


Figura 1: Gel de poliacrilamida 12% corado com comassie blue, ilustrando a expressão da proteína rMSP1a de *A. marginale*. Canaleta 1: BL21 pura; canaleta 2: BL21/pET102/MSP1a não induzida; Canaleta 3: BL21/pET102/MSP1a induzida; Canaleta 4: rMSP1a R-F3 e canaleta 5: Padrão de peso molecular BenchMark.

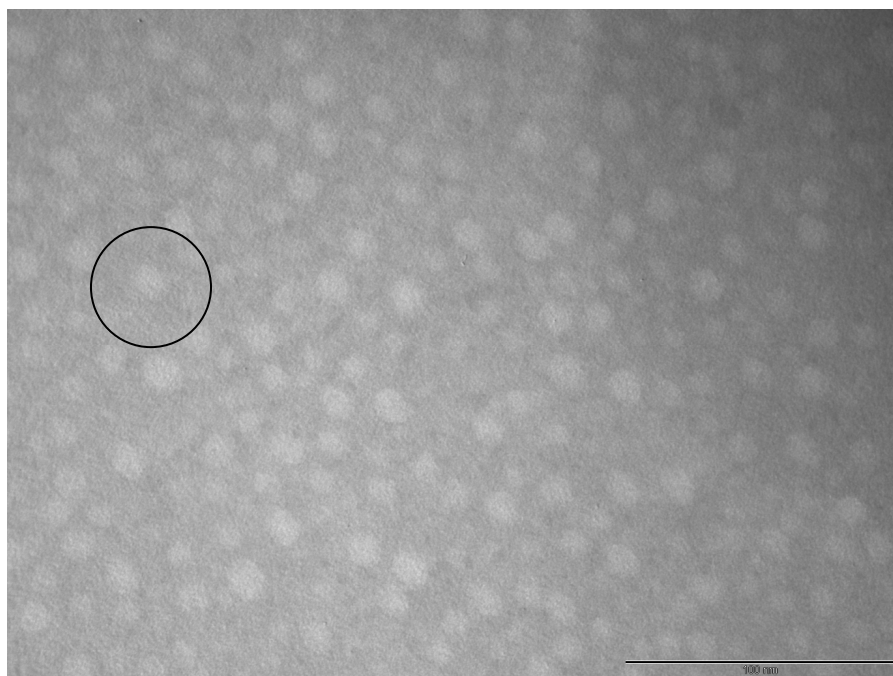


Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão do preparado do adjuvante ISCOMATRIX para produção da vacina de proteína recombinante com rMSP1a, rMSP1b, rMSP4 e rMSP5. Circulo ilustra as micelas típicas constratado com ácido fosfotungistenio 0,02% de vesículas de 40 nm.

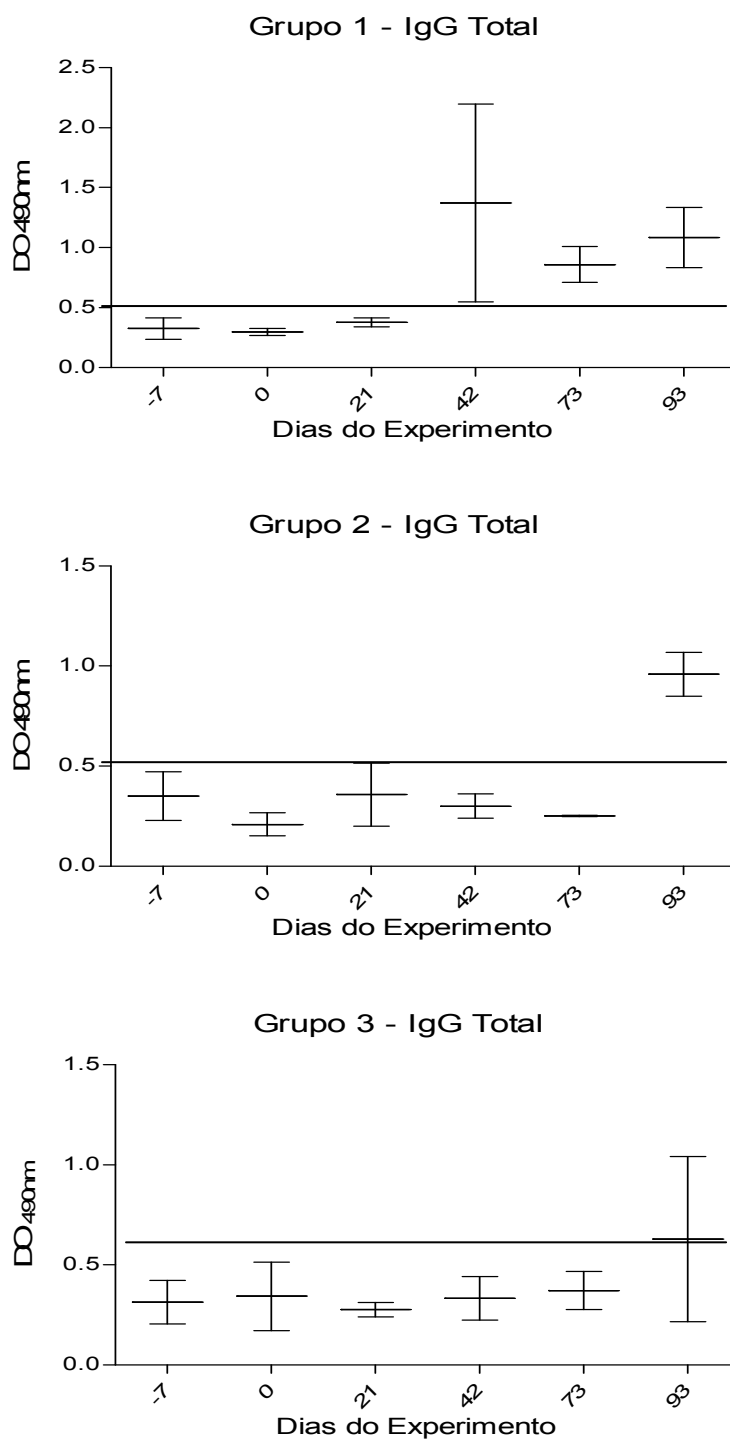


Figura 3: Resposta humoral IgG total pela técnica do ELISA de bovinos imunizados Grupo 1 - ISCOMATRIX+rMSPs, Grupo 2 - Controle do ISCOMATRIX e Grupo 3 - Controle negativo. Dia 0 primeira dose, dia 21 segunda dose, 42 terceira dose e 73 desafio.

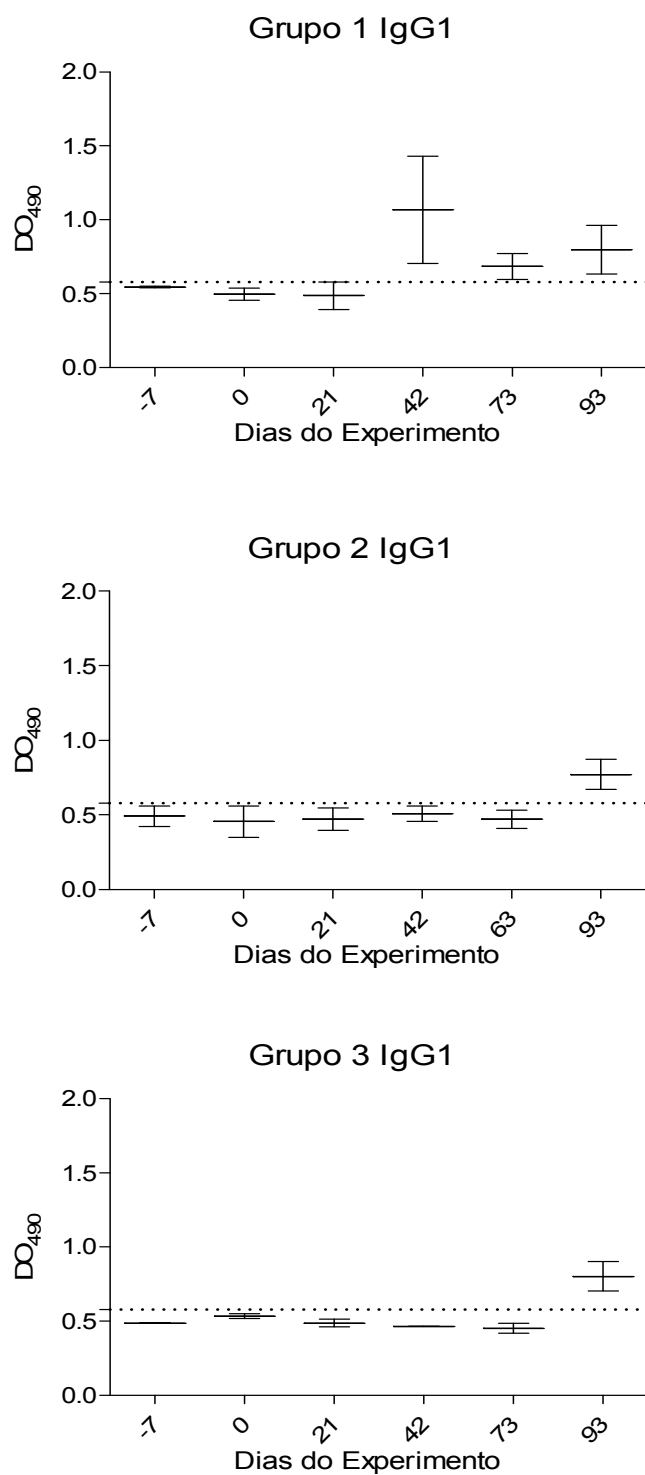


Figura 4: Resposta humoral IgG1 pela técnica do ELISA de bovinos imunizados Grupo 1 - ISCOMATRIX+rMSPs, Grupo 2 - Controle do ISCOMATRIX e Grupo 3 - Controle negativo. Dia 0 primeira dose, dia 21 segunda dose, 42 terceira dose e 73 desafio

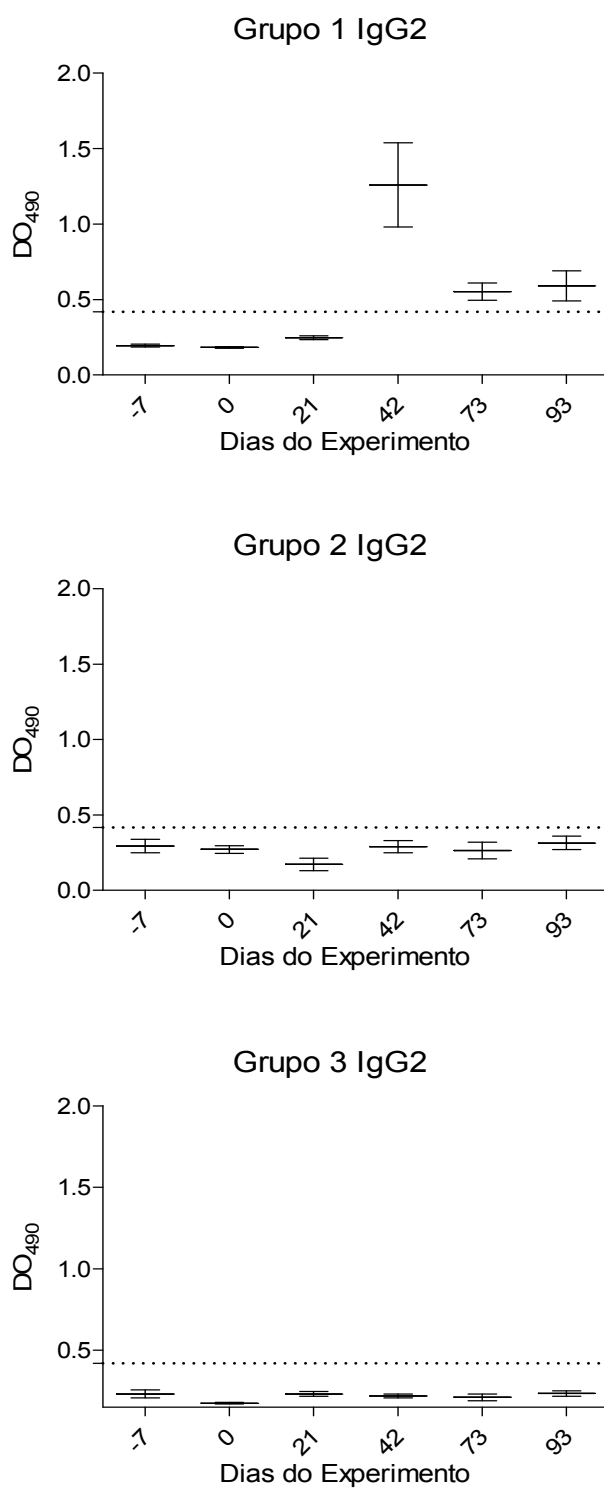


Figura 5: Resposta humoral IgG2 pela técnica do ELISA de bovinos imunizados Grupo 1 - ISCOMATRIX+rMSPs, Grupo 2 - Controle do ISCOMATRIX e Grupo 3 - Controle negativo. Dia 0 primeira dose, dia 21 segunda dose, 42 terceira dose e 73 desafio.

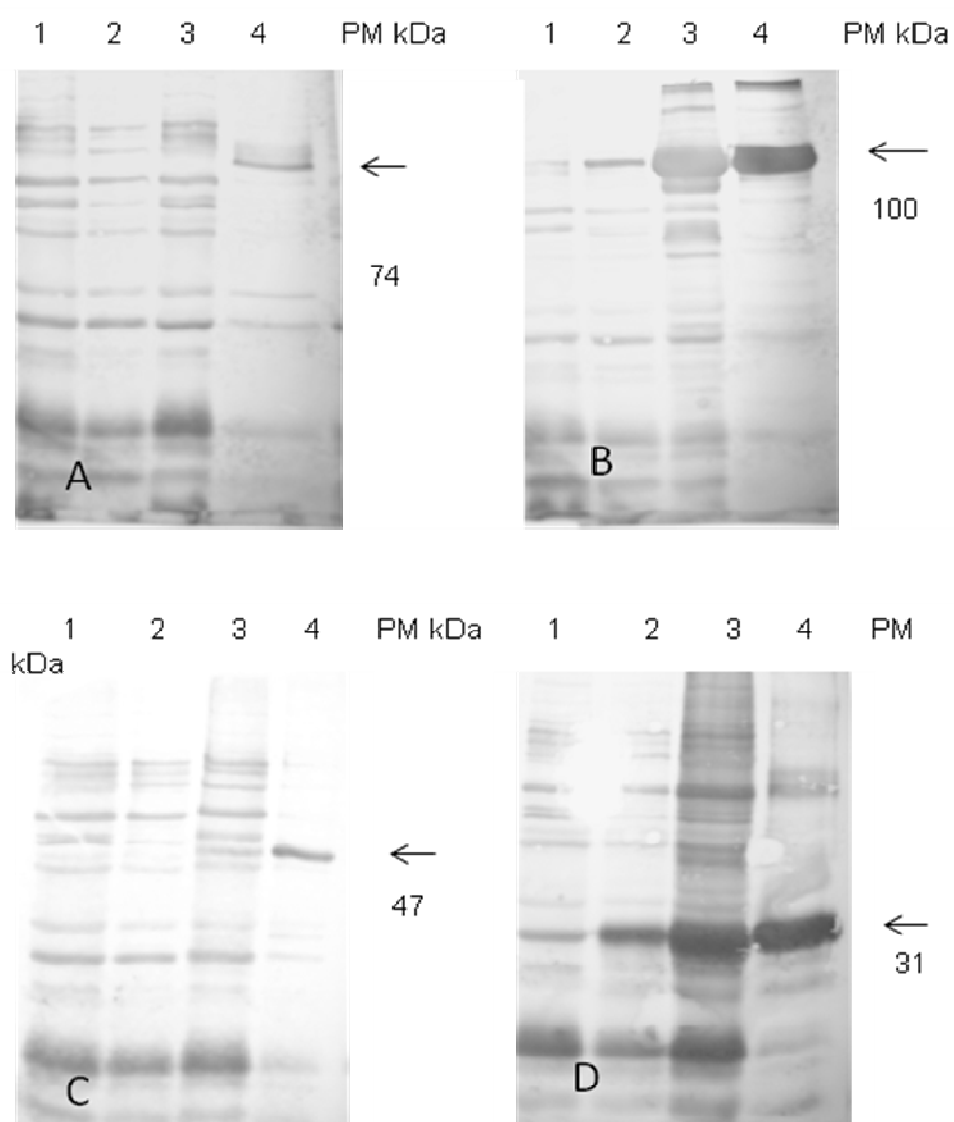


Figura 6: Western Blotting dos soros dos animais imunizados com a vacina ISCOMATRIX+rMSPs com as MSPs. Canaleta 1 - BL21 pura, 2 - BL21 sem indução, 3 - BL21 induzida e 4 - proteína purificada. A - proteína recombinante MSP1a R-F3; B - proteína recombinante MSP1b; C - proteína recombinante MSP4 e D) proteína recombinante MSP5.

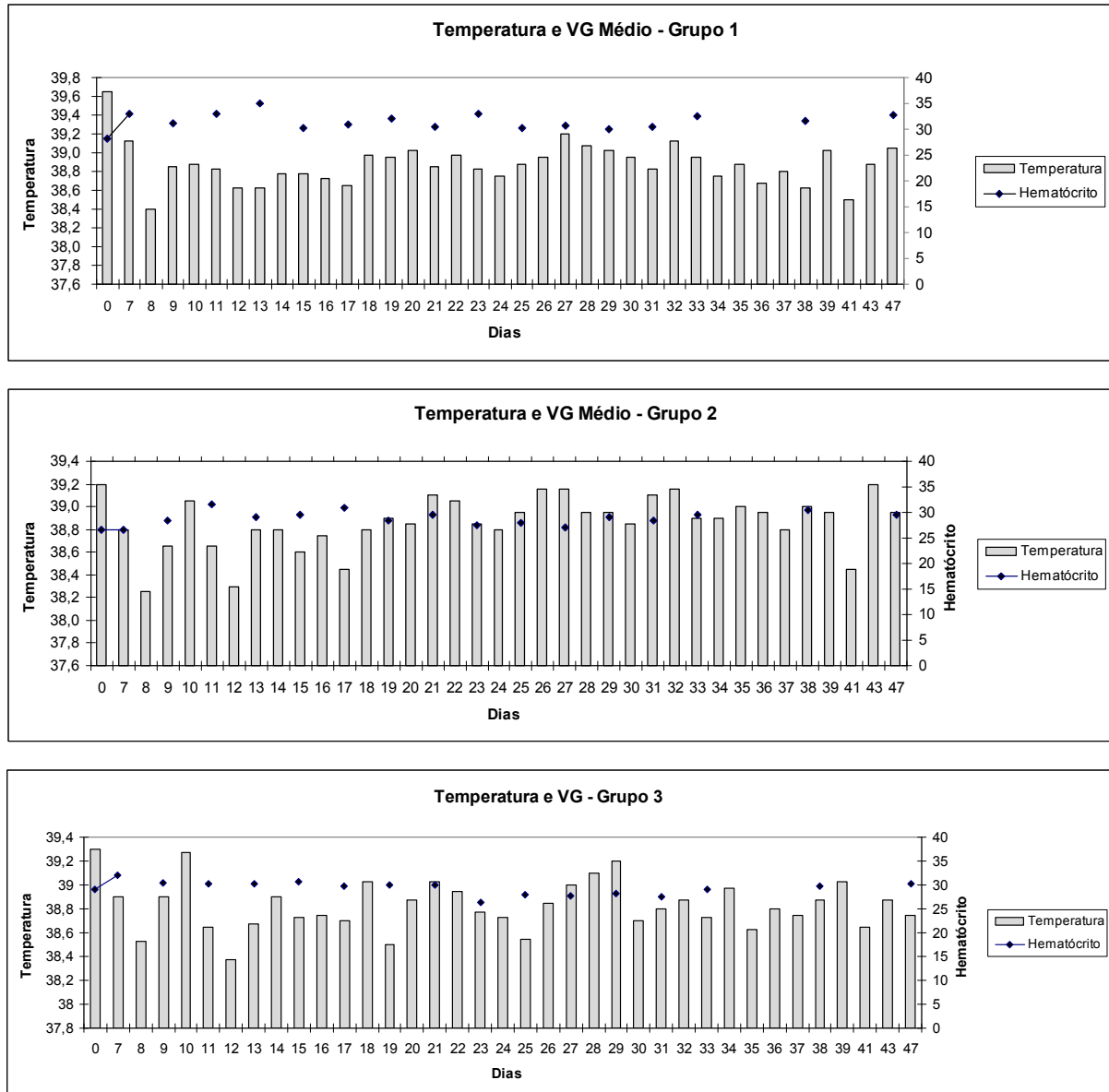


Figura 7: Relação das temperaturas médias e volume globular dos bezerros após o desafio com cepa virulenta de *Anaplasma marginale*.

4 CONCLUSÃO GERAL

1. Duas doses da vacina ISCOMATRIX+rMSPs foram suficientes para estimular a resposta imune humoral de bezerros vacinados;
2. Os animais vacinados apresentaram respostas específicas contra as proteínas recombinantes incorporadas na vacina;
3. Animais vacinados tiveram uma boa resposta imune humoral de IgG total, IgG1 e IgG2.

5 APÊNDICE

Extração de DNA Qiagen™

1. 200 µL da amostra de sangue total com EDTA do bezerro experimentalmente infectado com o a cepa PR-1 de *Anaplasma marginale* em um microtubo de 2 mL e adicionar 20 µL de proteinase K.
2. Adicionar 200 µL do buffer AL, homogeneizar em vortex por 15 segundos.
3. Incubar por 10 minutos a 56°C.
4. Centrifugar por 10-20 segundos.
5. Adicionar 200 µL de etanol, homogeneizar por em vortex por 15 segundos e centrifugar brevemente.
6. Cuidadosamente colocar o conteúdo do microtubo na coluna com o coletor de 2 mL e centrifugar a 6000xg por 1 minuto.
7. Descartar o conteúdo que passou pela coluna e adicionar 500 µL do buffer Aw-1.
8. Centrifugar a 6000xg por 1 minuto.
9. Descartar o conteúdo do coletor e adicionar 500 µL do buffer AW-2. Centrifugar com a velocidade de 20000xg por 3 minutos. Trocar o coletor da coluna e centrifugar por 15-20 segundos.
10. Colocar a coluna em microtubo de 1,5 mL, adicionar 200 µL do buffer AE e incubar a temperatura ambiente por 1-5 minutos.
11. Centrifugar a 6000xg por 1 minuto.
12. Estocar o DNA extraído a -20°C.

Gel de agarose

1. Pesar a agarose em um erlenmeyer, adicionar 50 ml de TEB 1X (89 mM tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM de EDTA) e leve ao forno microondas até a fusão da agarose.
2. Adicionar 25 µL de brometo de etídeo 0,1% quando a solução estiver morna.
3. Colocar a agarose em recipiente previamente preparado para a solidificação.

Concentração do gel	1%	1,5%	2%
Agarose	0,5g	0,75g	1,0g
TEB [1x]	50 mL	50 mL	50 mL
Brometo de etídeo	25 µL	25 µL	25 µL

TEB [5X] solução estoque

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27 g
EDTA	2,65 g
Água destilada	1000 mL

Brometo de etídeo 1%

Brometo de etídeo	0,1 g
Água destilada	10 mL

Brometo de etídeo 0,1% concentração de 1mg/mL

Solução de brometo de etídeo	1 mL
Água destilada	10 mL

Corante para corrida eletroforética em agarose

Ficoll	1,25 g (armazenada a vácuo)
Azul de bromofenol (AB)	0,0125 g
TEB [5X]	10 mL

Ficoll	1,5 g (armazenada a vácuo)
Xylenecyanol	0,0125 g
Água destilada	10 mL

Reação em cadeia da polimerase (PCR)**Mix PCR [2X] concentração de 1,5 mM**

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	60 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	724 µL

Mix PCR [2X] concentração 2,0 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	80 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	544 µL

Mix PCR [2X] concentração 2,5 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	100 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	684 µL

PCR protocolo 1 reação total 25 µl

Mix [2X]	12,5 µL
Primer F	1 µL
Primer R	1 µL
Taq polimerase	0,25 µL
Água Milliq	5 µL
DNA extraído	5 µL

Competência da *E. coli* BL21/TOP10

1. Pré-inóculo: Inocular 30 μ L da *E. coli* BL21 em 3 mL de caldo LB, incubar a 37°C overnight, sob agitação.
2. Inocular 200 μ L (300 μ L) do pré-inóculo de BL21 em 20 mL de caldo LB e incubar a 37°C, sob agitação, por $\pm$ 2 horas, até a obtenção de DO₆₀₀ = 0,5.
3. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 5 min.
4. Ressuspender em 6,7 mL de tampão de transformação (TT) com MÊS
 - usar pipeta de vidro ou ponteira do pipetador regulável resfriadas no freezer, de preferência overnight
5. Incubar em gelo por 20 min.
6. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 5 min.
7. Ressuspender em 1,6 mL de TT.
 - usar pipeta de vidro ou ponteira do pipetador regulável resfriadas no freezer, de preferência overnight
8. Adicionar 15% de glicerol a 100% estéril ao volume das alíquotas a serem congeladas (15 μ L de glicerol para 100 μ L da cultura).
9. Aguardar 30 minutos incubados no gelo para iniciar a transformação ou congelar em freezer -80°C até o uso.

Caldo Luria Bertani (LB)

Triptona.....10 g
 NaCl.....5 g
 Extrato de levedura.....5 g
 Água destilada.....1L

Tampão de Transformação (TT)

KCl.....0,74 g
 CaCl₂.....0,75 g

Dissolver em 80 mL de água MilliQ e autoclavar por 20 minutos.

Diluir 0,2 g de MÊS[2(N-morpholino) ethane sulfonic acid] em 15 mL de água MilliQ e filtrar na solução anterior gelada e no fogo para evitar contaminação.

Transformação do *E. coli* BL21/TOP10

1. Adicionar 2-4 μ L de plasmídeo recombinante (vetor + DNA inserido) em 100 μ L de célula competente. Misture delicadamente utilizando o pipetador com movimentos circulares (sem pipetar de cima para baixo).
2. Incubar no gelo por 30 minutos.
3. Efetuar choque térmico por 1 minuto a 42°C.
4. Transferir imediatamente no gelo.
5. Adicionar 250 μ L de meio SOC ou LB a temperatura ambiente.
6. Tampar o tubo firmemente prendê-lo inclinado para aumentar a superfície de aeração. Agitar o tubo horizontalmente (200 rpm) a 37°C por 1 hora.
7. Semear 100 μ L da célula competente em Agar LB com antibiótico adequado, com alça de drigalski e incubar overnight.

- Adicionar 250 μ L da célula transformada em 20 mL de Caldo LB contendo antibiótico, incubar a 37°C overnight.

Meio SOC

Triptona 2%
 Extrato de levedura 0,5%
 NaCl 2,5 mM
 KCl 2,5 mM
 MgCl₂ 10 mM
 MgSO₄ 10 mM
 Glicose 20 mM

Western Blotting

- Retirar a membrana de nitrocellulose do tampão de transferência;
- Enquanto seca a membrana de nitrocelulose, marcar com um lápis, os respectivos pesos moleculares do padrão;
- Reidratar a membrana em água destilada;
- Bloquear a membrana com o tampão de bloqueio (PBS + 0.1% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado) por, pelo menos, 1 hora em agitador à temperatura ambiente;
- Lavar a membrana em PBS-T (PBS +0,1% Tween 20) 3 x 10 minutos em agitador à temperatura ambiente;
- Incubar com o anticorpo por 1 hora diluídos em tampão de bloqueio pH 7,2 em agitador à temperatura ambiente;
 - Soro total de bovino experimentalmente infectado (PR1) diluído 1:500
- Lavar a membrana em PBS-T 5 vezes por 10 minutos em agitador à temperatura ambiente;
- Incubar com anticorpo anti-proteína G, na proporção de 1:1000 por 1 hora em agitador à temperatura ambiente;
- Lavar 5 vezes por 10 minutos em agitador à temperatura ambiente;
- Revelar a reação com DAB 5mg/15 mL PBS e 150 μ L de Hidrógeno peróxido 30%.

PBS-Tween 20 pH 7,2 – 7,4

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 mL
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1000 mL

Tampão de Bloqueio (100 mL)

PBS-Tween 20 pH 7,2 – 7,4	100 mL
Leite em Pó Molico	5 g

Tampão de Transferência (2000 mL)

Tris Base	6,82 g
Glicina	32,4 g
Metanol	450 mL
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	2000 mL

ELISA Indireto

1. Sensibilizar as placas com 100 μ L do tampão de adsorção (Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6). Concentração do antígeno 1 μ g/ml do corpúsculo inicial de *A. marginale*. Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20.
2. Cobrir os orifícios com 200 μ L de tampão de bloqueio (Tampão adsorção 0,1 M + 8% de leite em pó desnatado IgG total e 8% soro eqüino IgG1 e 2). Deixar agitando por 1 hora a 37°C.
3. Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20.
4. Adicionar em duplicata 100 μ L do soro diluído (1:50). O soro deve ser diluído em PBS-Tween 20 contendo 5 % de leite em pó desnatado ou 5% de soro eqüino para IgG 1 e 2. Incubar a placa a 37°C por 1 hora em câmara úmida.
5. Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20.
6. Adicionar 100 μ l de conjugado peroxidase anti-bovino diluído 1:20000 IgG, 1:10000 IgG1 e 1:15000 IgG2 em PBS-Tween 20. Incubar a 37°C durante 1 hora em câmara úmida.
7. Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20.
8. Adicionar 100 μ L de tampão cromógeno. Manter em agitação, parar a reação adicionando 50 μ L de 1M HCl. Fazer a leitura com filtro de 490nm.

Salina Tamponada (PBS) pH 7,2

Fosfato de sódio dibásico	1,05 g
Fosfato de sódio monobásico	0,36 g
Cloreto de sódio	8,17 g
Água destilada	1000 mL

Tampão de sensibilização (0,05M Carbonato/Bicarbonato pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Água destilada	1000 mL

Tampão de bloqueio

Tampão de sensibilização + 8% de leite em pó desnatado.

PBS-Tween 20 pH 7,2 – 7,4

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 mL
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1000 mL

Tampão de substrato cromógeno

0,1M Ácido Cítrico (21g/litro)	24,3 ml
0,2M Fosfato (28g Na ₂ HPO ₄ /litro)	25,7 ml
Água destilada	50 ml

Substrato cromógeno

Tampão substrato	100 mL
OPD	40 mg
H ₂ O ₂ PA 30%	40 μ L

Purificação dos corpos iniciais (PALMER; MCGUIRE, 1984)

1. Descongelar os estabilizados a 37°C por 10 – 15 minutos.
2. Transferir o sangue para um tubo de centrífuga e lavar o tubo original com PBS pH 7,2 estéril.
3. Centrifugar o sangue a 12000 rpm por 20 minutos.
4. Desprezar metade do sobrenadante. Nas lavagens subsequentes desprezar o sobrenadante até atingir o precipitado. Repetir as lavagens até obter sobrenadante límpido, cerca de 4 a 5 vezes. Nas 2 últimas lavagens remover o precipitado membranoso.
5. Transferir para tubos plásticos mantendo a suspensão de eritrócitos no gelo e sonicar por 2 minutos a 50 W (15 segundos de sonicação por 30 segundos de descanso)
6. Centrifugar por 20 minutos a 20.000 X g. (10000 rpm)
7. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em PBS sem azida e sonicar novamente por 30 segundos a 50 W.
8. Centrifugar a 20.000 x g (10000 rpm) por 20 minutos.
9. Ressuspender o precipitado em tampão contendo inibidores de proteases:
Tris 50 mM pH 8,0
EDTA 5 mM
Iodoacetamida 5 mM
TCLK 0,1 mM
PMSF 0,1 mM
10. Determinar a concentração de proteínas pelo método de Bradford.

Determinação da solubilidade de proteína

1. Ressuspender o precipitado de 1 mL de cultura com 1mL buffer lysis de purificação solúvel de proteínas.
2. Adicionar 20 µL de lisozima na concentração final de 50 mg/mL.
3. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Congelar em nitrogênio líquido e descongelar em banho Maria a 37°C, repetir a operação.
5. Sonicar 6 vezes de 15 minutos com intervalo de 30 segundos.
6. Centrifugar 10000 x g por 20 minutos a 4°C.
7. Retirar o sobrenadante (fração solúvel) em outro microtubo. Separar 20µl adicionar 10 µl de TA 5X.
8. Ressuspender o precipitado (fração insolúvel) com 100 µl de TA 1X, separar 5 µl para aplicar no gel.
9. Ferver as amostras por 5 minutos e aplicar em gel SDS-Poliacrilamida.

Purificação de proteína solúvel MSP1a R-F3 e MSP1b

Preparo lisado proteínas solúveis pET102/msp1a R-F3 e pET102/msp1b

1. Retire o precipitado de células de 100mL de cultura do freezer, descongele 15 minutos no gelo.
2. Ressuspenda em 8 mL de Lysis buffer e homogeneíze por uma hora no gelo.
3. Adicione:
 - Lisozima na concentração de 50 mg/mL 160 μ L
 - PMSF na concentração de 44 mM 180 μ L
 - TCLK na concentração de 10 mM 800 μ L
4. Sonique 100 hz por três vezes de 15 segundos de sonicação x 30 seg de intervalo, em gelo.
 - Caso esteja viscoso, adicione:
 - RNase (10 mg/mL) para a concentração final de 10 μ g/mL
 - DNase para a concentração final de 10 μ g/mL $\rightarrow$ 0,3 μ L para 5 mL de solução
5. Centrifugue 20 minutos a 9200 rpm a 4°C para formar precipitado de debris celulares e guardar o sobrenadante.
Sobrenadante pronto para ser purificado em coluna com resina de níquel.

Preparação da coluna

1. Retire a coluna da geladeira, ressuspenda e desconecte a tampa inferior e deixe pingar.
2. Lave com 2 mL de água destilada por 2 vezes.
3. Lave com 3 mL de tampão de lise pH 8,0 por duas vezes.
 - Coluna pronta para uso.
 - Após o uso guardar na geladeira com 3 mL de álcool 30%.

Purificação das proteínas solúveis em coluna de níquel (Qiagen®)

1. Adicione o lisado da cultura ressuspenso em tampão de lise, homogeneizado, sonicado e centrifugado à coluna com resina equilibrada e homogeneíze por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Adicione 4 mL do tampão lavagem, homogeneíze por 15 minutos no gelo e despreze o sobrenadante após ser filtrado na coluna. Repetir 2 vezes.
3. Adicione 1 mL do tampão eluição, homogeneíze por 15 minutos no gelo e filtre a proteína eluída e guarde em recipiente novo. Repetir 3 vezes.
4. Guardar 30 μ L de cada etapa para ser analisado em gel SDS-Poliacrilamida.

Tampão de lise (100ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	0, 69 g
NaCl	1, 75 g
Imidazole	0, 068 g

Tampão lavagem (100 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	0,69 g
NaCl	1,75 g
Imidazole	0,136 g

Tampão eluição (100 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	0,69 g
NaCl	1,75g
Imidazole	3,4 g

Purificação de proteína insolúvel MSP4 e MSP5*Preparo lisado proteínas insolúveis*

1. Descongelar o precipitado de células de 100 mL de cultura por 15 minutos no gelo
2. Ressuspender em 16 mL do tampão A
3. Homogeneizar por 1 hora a temperatura ambiente
4. Adicionar 544,5 µL de PMSF e 160 µL de TLCK
5. Sonicar 6 vezes de 15 segundos com intervalo de 30 segundos, no gelo
6. Centrifugar por 20 minutos 9200 rpm, reservar o sobrenadante para passar na coluna.

Preparo coluna

1. Retire a coluna da geladeira, ressuspenda e desconecte a tampa inferior e deixe pingar.
2. Lave com 2 mL de água destilada por 2 vezes.
3. Lave com 3 mL de tampão B pH 8,0 por duas vezes.
Coluna pronta para uso.
Após o uso guardar na geladeira com 3 mL de álcool 30%.

Purificação das proteínas insolúveis em coluna de níquel (Qiagen®)

1. Colocar o sobrenadante do lisado na coluna equilibrada e deixar homogeneizar por 1 hora em temperatura ambiente
2. Deixar pingar por gravidade todo lisado, adicionar 4ml do tampão C (pH 6,3), para fazer lavagens e retirar todo o resto celular. Repetir a operação por mais 3 vezes com intervalo de 15 minutos homogeneizando no gelo.
3. Fazer 2 lavagens com 2 mL tampão D (pH 5,9) com intervalo de 15 minutos homogeneizando no gelo
4. Fazer eluição com tampão E (pH 4,5) e mais 3 eluições com tampão E (pH4), com intervalo de 15 minutos entre as eluições no gelo
5. Reservar 30µL de cada etapa para análise em gel SDS-Poliacrilamida.

Tampão A (1000 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
GuHCl	573 g

Tampão B (1000 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480,5 g

Tampão C (1000 ml) pH 6, 3

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1, 2 g
Uréia	480, 5 g

Tampão D (1000 ml) pH 5, 9

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480,5 g

Tampão E (1000 ml) pH 4, 5

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480, 5 g

Tampão E (1000 ml) pH 4

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1, 2 g
Uréia	480, 5 g

Gel SDS-Poliacrilamida*Gel separador (Slab gel) 12%*

Água destilada	2,75 mL
Tris/SDS pH8,8	2,03 mL
Acrilamida 30%	3,2 mL
Persulfato de amônio	80 µL
TEMED	3,2 µL

Gel concentrador (Stacking gel) 5%

Água destilada	1,68 mL
Tris/SDS pH6,8	0,75 mL
Acrilamida 30%	0,54 mL
Persulfato de amônio	15 µL
TEMED	1,5 µL

Tris/SDS 1,5M pH 8,8

Tris	18,171 g
SDS	0,4 g
Água milliQ	60 mL

Ajustar o pH para 8,8 com HCl 10N, deixar overnight na geladeira e conferir o pH no outro dia, completar para 100 mL.

Tris/SDS 0,5M pH 6,8

Tris	6,055 g
SDS	0,4 g
Água milliq	60 mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 10N, deixar overnight na geladeira e conferir o pH no outro dia, completar para 100 mL.

Tampão de glicina 1X (Tampão de corrida) pH 8,8

Tris	3g
Glicina	14,4 g
SDS	1g
Água destilada	1000 mL

SDS 10%

Dodecil Sulfato de sódio	10 g
Água milliq	100 mL

Aquecer a 68°C para dissolver

Solução azul bromofenol 0,5%

Azul bromofenol	0,05 g
Água milliq	10 mL

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	10 g
Água milliq	10 mL

Diluição IPTG na concentração de 1M

IPTG	1g
Água milliq	4,2 mL

Acrilamida 30%

Acrilamida	29g
Bis acrilamida	1 g
Água milliq q.s.p	100 mL

Misturar a bis acrilamida em 40 mL de água e agitar por 1 hora acrescente a acrilamida, agitar até dissolver, completar para 100 mL e corrigir o pH para 7. Armazenar na geladeira em frasco escuro.

Tampão de amostra SDS-PAGE 1X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
Glicerol (100%)	1,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,2 mL
Azul bromofenol	0,01g
SDS	0,2 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 2X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50 mL
Glicerol (100%)	2,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol	0,02 g
SDS	0,4 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 3X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	3,75 mL
Glicerol (100%)	3,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,6 mL
Azul bromofenol	0,03 g
SDS	0,6 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 4X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5 mL
Glicerol (100%)	4 mL
B-Mercaptoetanol	0,8 mL
Azul bromofenol	0,04 g
SDS	0,8 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 5X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol (100%)	1,6 mL
B-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol (Sol 0,5%)	0,4 mL
SDS 10%	1,6 mL
Água destilada	3 mL

Corante comassie blue

Comassie brilhante blue R	0,625 g
Metanol	125 mL
Ácido acético	17,5 mL
Água destilada q.s.p.	250 mL

Descorante do comassie blue

Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Água destilada	500 mL

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)