

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**VACINA DE DNA QUIMÉRICO COMO ESTRATÉGIA PARA O  
CONTROLE *DE Anaplasma marginale* E *Babesia* spp. EM BOVINOS**

**STEFFANY MORCELI RIBEIRO**

**CAMPO GRANDE – MS**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**VACINA DE DNA QUIMÉRICO COMO ESTRATÉGIA PARA O  
CONTROLE *DE Anaplasma marginale* E *Babesia* spp. EM BOVINOS**

**CHIMERICAL DNA VACCINE AS STRATEGY FOR THE CONTROL OF  
*Anaplasma marginale* AND *Babesia* spp. IN CATTLE**

**Steffany Morceli Ribeiro**

**Orientador: Dr. Cleber Oliveira Soares**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lenita Ramires dos Santos**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Gracia Maria Soares Rosinha**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**CAMPO GRANDE – MS**

**2018**

## ATA DA DEFESA

Dedico com carinho, à minha mãe Jacqueline, ao meu pai Sabino (*in memoriam*), à minha madrinha Dalzere, à minha irmã Suellen e ao meu esposo Edvaldo. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir viver este momento tão sublime.

Ao meu orientador, Dr. Cleber Oliveira Soares, pelo exemplo de profissionalismo, seriedade e pela oportunidade de desenvolver o mestrado como sua aluna.

À Dr. Grácia Maria Soares Rosinha, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de desenvolver o estágio no Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA), pela orientação e carinho.

À Dr. Lenita Ramires dos Santos, agradeço de todo meu coração por tudo que aprendi, por contribuir com meu progresso como aluna durante todo o mestrado, pelo carinho e delicadeza de ensinar-me a crescer como pessoa e profissional.

À técnica do laboratório, Maria Goretti dos Santos por todas as contribuições que fez ao longo desse mestrado e por todas as explicações e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Genética Animal: Laís Alvarenga, Cynthia Mantovani, Juliana Gomes, Marrielen Caetano, Anna Letícia Lozan, Matheus Santana, Cleber Galvão, Aline Gonçalves e Renata Bastos. Obrigada por todo o apoio, pelas risadas e pela troca de conhecimento.

À Embrapa Gado de Corte, por proporcionar uma excelente estrutura e possibilitar o convívio com profissionais envolvidos na área da pesquisa os quais admiro pelo trabalho e dedicação.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, aos docentes do mestrado agradeço por todo o ensino e dedicação.

À Fundect por prestar auxílio financeiro ao projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos animais que foram submetidos a essa experimentação. A eles todo o meu respeito e seriedade.

“A melhor maneira de nos prepararmos para o futuro é concentrar toda a imaginação e entusiasmo na execução perfeita do trabalho de hoje.”

Dale Carnegie

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<i>A.marginale:</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
APC's:	Células Apresentadoras de Antígeno
<i>B. bigemina:</i>	<i>Babesia bigemina</i>
<i>B.bovis:</i>	<i>Babesia Bovis</i>
CIBio:	Comissão Interna de Biossegurança
CTNBio:	Comissão Técnica Nacional em Biotecnologia
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA:	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	Ácido sulfúrico
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- $\gamma$ :	Interferon gama
IgG1:	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2a:	Imunoglobulina G subclasse 2a
IL-10:	Interleucina-10
IPTG:	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
MHC:	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MAS:	Antígeno de Superfície de Merozoítos
NK:	<i>Natural Killer</i>
OPD:	O-phenylenediamine dihydrochloride
PCR:	Reação em cadeia da Polimerase
SDS:	Dodecil Sulfato de Sódio
TCR:	Teste de Conglutinação rápida
TFSS:	Sistema de Secreção do Tipo Quatro

TNF- $\alpha$ :	Fator de Necrose Tumoral
TPB:	Tristeza Parasitária Bovina
Treg:	Célula T regulatória
PPS:	Proteínas Principais de Superfície
MAS:	Antígenos de superfície de membrana de merozoítos
MAS 2b:	Antígenos de superfície de membrana de merozoítos 2b
MAS 2c:	Antígenos de superfície de membrana de merozoítos 2c
sodB:	Superoxide Dismutase
EF-tu:	Fator de Enlongação termoestavel
BmVDAC:	Canal aniônico dependente da tensão

**LISTA DE FIGURAS**

Fig. 1. Análise da inserção do DNA quimérico <i>anabab</i> em pcDNA3.1A. por digestão enzimática com enzima de restrição em gel de agarose a 0,8%.....	40
Fig. 2. Avaliação da indução da proteína quimérica ANABAB em <i>E.coli</i> da linhagem <i>Rosetta</i> após indução com IPTG .....	40
Fig. 3. Avaliação da purificação da proteína quimérica ANABAB após processo em coluna de níquel ProBond® .....	41
Fig. 4. Produção de IgG total específica contra ANABAB em camundongos BALB/c.....	41
Fig. 5. Produção de IgG1 e IgG2a específica contra ANABAB em camundongos BALB/c. ....	42

## RESUMO

RIBEIRO, S.M. Vacina de DNA quimérico como estratégia para o controle de *Anaplasma marginale* e *Babesia spp.* em bovinos. 2018. 46 p. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

A babesiose e a anaplasmosose tem como agentes etiológicos *Anaplasma marginale* e *Babesia spp.* e causa perdas econômicas significativas em rebanhos bovinos. A indisponibilidade atual de um controle preventivo por vacinação demonstra a necessidade de alternativas para o desenvolvimento de novas vacinas. Assim, o desenvolvimento de uma vacina recombinante pode ser uma opção para prevenção da doença nestes animais. Construções proteicas ricas em epítomos com potencial imunogênico são utilizadas atualmente como proposta para a construção de candidatos a vacinas recombinantes. Objetivou-se neste trabalho a avaliação de um imunógeno obtido pelo uso do DNA recombinante a partir da combinação de porções de genes ricos em epítomos de *A. marginale* e *Babesia spp.* Para tanto, foram utilizados camundongos BALB/c inoculados com: PBS, Montanide™ ISA 70 (Seppic®), pcDNA3.1<sup>a</sup>, pcDNA3.1A/*anabab*, ANABABr e pcDNA3.1A/*anabab* com *booster* de ANABABr. Os soros obtidos foram testados para presença de IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a. Foi realizado o cultivo de esplenócitos, estimulados com a proteína recombinante (ANABABr), para detecção de Interleucina-10 (IL-10) e Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Os resultados não demonstraram diferença na produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 nos diferentes grupos testados. No entanto, foi detectada produção de IgG total no grupo que recebeu a proteína recombinante (ANABABr), como também, no grupo que recebeu o DNA associado ao *booster* de proteína (pcDNA3.1A/*anabab* com *booster* de ANABABr), indicando indução de resposta imune humoral. A produção de IgG1 e IgG2a foram avaliadas, nos grupos com resultado positivo para produção de IgG total, de modo a determinar o perfil de resposta imune induzida pela vacina nos camundongos. Essas análises não detectaram diferença significativa entre as imunoglobulinas testadas.

Palavras chave: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, vacinas recombinantes, resposta imune.

**ABSTRACT**

35

36

37 RIBEIRO, S.M. Chimeric DNA vaccine as strategy for the control of *Anaplasma*  
38 *marginale* and *Babesia spp.* in cattle. 2018. 46 f. Dissertation - Faculdade de  
39 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,  
40 Campo Grande, MS, 2018.

41

42 Babesiosis and anaplasmosis have the etiological agents *Anaplasma*  
43 *marginale* and *Babesia spp.* and causes significant economic losses in cattle herds.  
44 The current unavailability of preventive control by vaccination demonstrates the need  
45 for alternatives for the development of new vaccines. Thus, the development of a  
46 recombinant vaccine may be an option for disease prevention in these animals.  
47 Protein constructs rich in epitopes with immunogenic potential are currently used as a  
48 proposal for the construction of recombinant vaccine candidates. The objective of this  
49 work was to evaluate an immunogen obtained by the use of recombinant DNA from  
50 the combination of portions of genes rich in epitopes of *A. marginale* and *Babesia*  
51 *spp.* BALB / c mice inoculated with: PBS, Montanide<sup>TM</sup> ISA 70 (Seppic®),  
52 pcDNA3.1<sup>a</sup>, pcDNA3.1A / anabab, ANABABr and pcDNA3.1A / anabab with  
53 ANABABr booster were used. The sera obtained were tested for the presence of total  
54 IgG and its subclasses IgG1 and IgG2a. Spleen cells were stimulated with the  
55 recombinant protein (ANABABr) for the detection of Interleukin-10 (IL-10) and  
56 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). The results showed no difference in the production of IFN-  
57  $\gamma$  and IL-10 in the different groups tested. However, total IgG production was  
58 detected in the group that received the recombinant protein (ANABABr), as well as in  
59 the group that received the DNA associated with the protein booster (pcDNA3.1A /  
60 anabab with ANABABr booster), indicating induction of response humoral immune.  
61 The production of IgG1 and IgG2a were evaluated in the groups with positive result  
62 for total IgG production, in order to determine the immune response profile induced  
63 by the vaccine in the mice. These analyzes did not detect a significant difference  
64 between the immunoglobulins tested.

65 Key words: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, recombinant  
66 vaccines, immune response.

67

## SUMÁRIO

68

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.2 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Anaplasmosose - Aspectos Gerais.....	17
3.2 Babesiose – Aspectos Gerais.....	18
3.3 Tristeza Parasitaria Bovina – TPB.....	20
3.4 Resposta Imune.....	21
3.5 Potenciais imunógenos em estudo.....	23
3.6 Proteínas recombinantes de <i>Anaplasma</i> como imunógenos.....	23
3.7 Proteínas recombinantes de <i>Babesia</i> como imunógenos.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
ARTIGO: VACINA DE DNA QUIMÉRICO COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE <i>Anaplasma marginale</i> E <i>Babesia sp.</i> EM BOVINOS.....	33
ABSTRACT.....	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
Obtenção do gene quimérico.....	37
Cultivo de <i>Escherichia coli</i> para amplificação do DNA recombinante e produção da proteína recombinante.....	38
Análise da produção e purificação da proteína recombinante.....	39
Animais e grupos experimentais.....	39
Aspectos Éticos.....	40
Protocolo de imunização.....	40
Avaliação da resposta imune humoral.....	40
Avaliação da resposta imune celular.....	41
Análise Estatística.....	42
RESULTADOS.....	42
Produção do DNA quimérico pcDNA3.1 <i>anabab</i> .....	42

Produção da proteína quimérica ANABABr.....	43
Avaliação da resposta imune humoral.....	44
Avaliação da resposta imune celular.....	46
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	48
AGRADECIMENTOS.....	49
REFERÊNCIAS.....	49

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

## 94 1 INTRODUÇÃO

95

96 A associação dos patógenos denominada Tristeza Parasitaria Bovina  
97 (TPB) possui como agentes etiológicos *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e  
98 *Babesia bigemina* (DE VOS, 1992) os quais são responsáveis por grandes  
99 prejuízos econômicos, sociais e epidemiológicos nos animais infectados (DE  
100 LA FUENTE; KOCAN; CONTRERAS, 2015; NARI, 1995; SUAREZ; NOH,  
101 2011).

102 O principal vetor responsável pela transmissão dos agentes causadores  
103 da doença é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As perdas  
104 econômicas atribuíveis às doenças que acometem o rebanho, em decorrência  
105 de infecções por *Anaplasma* e *Babesia*, podem chegar a 3.236.35 milhões de  
106 dólares no Brasil (GRISI et al., 2014) e em vários países do mundo (BROWN et  
107 al., 1997), entre eles Austrália e Estados Unidos (MADRUGA et al., 1987).

108 As enfermidades decorrentes da infecção por *A. marginale* e *Babesia*  
109 *spp.* são responsáveis por altos índices de morbidade e de mortalidade em  
110 rebanhos bovinos susceptíveis. As perdas causadas são avaliadas por  
111 parâmetros como redução do peso corporal dos animais, queda na produção  
112 de leite, redução do ganho de peso corporal, abortos em fêmeas e a morte dos  
113 animais acometidos pela infecção (GUGLIELMONE; MANGOLD; VIÑABAL,  
114 1991).

115 A produção agropecuária no Brasil é de grande relevância para o país,  
116 levando por favorecer a economia. O IBGE divulgou o número de 7.369  
117 milhões de bovinos abatidos sob inspeção da vigilância sanitária, no primeiro  
118 trimestre de 2017. O estado de Mato Grosso do Sul está classificado em  
119 segundo lugar no *ranking* nacional com percentual de 11,5% do total. Assim, a  
120 condição sanitária dos rebanhos se faz necessária para manter uma produção  
121 de qualidade, ressaltando que não apenas doenças de bovinos controladas  
122 pela vigilância sanitária comprometem os rebanhos, mas diversas outras que  
123 também trazem prejuízos aos produtores, como exemplo a anaplasmose e a  
124 babesiose bovina (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E  
125 ESTATÍSTICA - IBGE, 2017).

126 Inúmeros métodos profiláticos vêm sendo utilizados para a redução na  
127 população do vetor da doença, entre eles o uso de acaricidas, o uso de

128 quimioterápicos e de vacinas (JABBAR et al., 2015). Os sinais clínicos  
129 atribuídos a manifestação da doença incluem redução do peso corporal dos  
130 animais, queda na produção de leite, redução do ganho de peso corporal,  
131 abortos em fêmeas e a morte dos animais acometidos pela infecção  
132 (GONÇALVES, 2000).

133 O diagnóstico específico da TPB é realizado através de exame  
134 laboratorial, sendo os mais utilizados os de identificação indireta de anticorpos  
135 contra os agentes envolvidos nesta enfermidade, tais como as técnicas de  
136 imunofluorescência indireta (IFI) (MARANA et al., 2006), congutinação rápida  
137 (TCR) e teste de imunoabsorção imunoenzimática - ELISA. Esses testes são  
138 mais comumente realizados para levantamentos epidemiológicos de  
139 propriedades ou regiões. Métodos de diagnóstico direto podem ser feitos por  
140 confecção de esfregaços sanguíneos e reação em cadeia da polimerase – PCR  
141 (FIGUEROA et al., 1992). Estas últimas técnicas podem auxiliar na escolha do  
142 tratamento dos animais acometidos pela enfermidade, principalmente para  
143 diferenciação dos casos de anaplasmoze e babesiose, já que existem  
144 tratamentos específicos para cada uma delas (ANDREOTTI; KOLLER, 2013).

145 A dificuldade de se realizar estes diagnósticos a campo, a demanda de  
146 animais a ser analisados para esta enfermidade e o custo onerado com tais  
147 métodos de diagnóstico e posteriormente com profilaxia e tratamento  
148 demonstram a necessidade de se estudar uma medida capaz de prevenir a  
149 doença antes que o animal seja exposto e que promova resistência frente a um  
150 futuro desafio.

151 Imunizações feitas a partir de vacinas vivas atenuadas provenientes de  
152 sangue de animais infectados eram disponibilizadas comercialmente, no  
153 entanto essas apresentavam desvantagens, por necessitarem de  
154 armazenamento em nitrogênio, o que as torna de difícil manejo a campo. Outro  
155 problema relacionado às vacinas vivas é a transmissão de outros patógenos  
156 nocivos aos animais que irão recebê-la, como também ao veterinário que fará a  
157 manipulação da mesma.

158 A vista desse cenário, diversos grupos de pesquisa estão à procura de  
159 imunógenos com alto potencial de proteção e que combinados a diferentes  
160 adjuvantes e a formas de administração promovam resposta contra os

161 patógenos em estudo. Para isso, o animal deve receber antígenos com  
162 potencial de estimular uma resposta imunológica eficaz, protetora e duradoura.

163 Em estudos prévios, regiões proteicas ricas em epítomos provindos de  
164 genes de proteínas específicas de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e  
165 *Babesia bigemina* foram estudadas levando em consideração conservação e a  
166 preservação dos isolados entre essas espécies. Em seguida, porções  
167 específicas de DNA de cada um desses agentes foram selecionadas e unidas  
168 sinteticamente como uma quimera.

169 Apresentaremos neste trabalho formulações vacinais baseadas no  
170 cultivo em larga escala de DNA quimérico (*anabab*) e proteína quimérica  
171 (ANABAB), bem como os ensaios de purificação, associação a adjuvante e  
172 inoculação destas formulações em camundongos da linhagem BALB/c. Assim,  
173 serão apresentados os resultados das análises referentes a produção de  
174 anticorpos e citocinas nos animais testados com as diferentes formulações.

175

176

## 177 **2 OBJETIVOS**

178

### 179 **2.1 Objetivo geral**

180

181 Avaliar a eficiência, da resposta imune humoral e celular, de um  
182 imunógeno obtido pelo uso de DNA e proteína recombinante a partir da  
183 combinação de porções de genes de *Anaplasma marginale* (*Virb9* e *Virb10*) e  
184 *Babesia bovis*, conservada em *Babesia bigemina* (P0), por meio de inoculações  
185 *in vivo*.

186

187

### 188 **2.2 Objetivos específicos**

189

- 190 • Produzir em larga escala DNA recombinante para as imunizações *in vivo*  
191 e para estoque.
- 192 • Produzir em larga escala e purificar a proteína recombinante ANABAB  
193 em sistema heterólogo (*Escherichia coli*) para uso em imunização *in vivo*  
194 e em ensaios de ELISA.

- 195 • Imunizar com a formulação vacinal camundongos BALB/c.
- 196 • Avaliar a resposta imune humoral e celular conferida pela formulação
- 197 vacinal utilizando a técnica de ELISA.

198

### 199 **3 REVISÃO DE LITERATURA**

200

#### 201 **3.1 Anaplasmosose - Aspectos Gerais**

202

203 O gênero *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez por Arnold Theiler  
204 relatando a presença de pontos marginais em eritrócitos, porém esta era uma  
205 característica similar às babesioses. No entanto, devido à ausência de  
206 protoplasma, este hemorapaso foi incluído em um novo gênero denominado  
207 *Anaplasma* sp., sendo visto parasitando eritrócitos de bovinos simultaneamente  
208 com *Babesia* e causando uma enfermidade com sinais clínicos similares neste  
209 hospedeiro (THEILER, 1910).

210 *Anaplasma marginale* é um patógeno gram-negativo (AUBRY; GEALE,  
211 2011; JIRAPATTHARASATE et al., 2017) intraeritrocitário obrigatório,  
212 pertencente à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales (DUMLER et al.,  
213 2001; OCHIRKHUU et al., 2017) presente em países da Ásia, África, Austrália,  
214 Europa e América do Sul (JONGEJAN; UILENBERG, 2005), regiões em que há  
215 predomínio de clima tropical e temperado (JABBAR et al., 2015).

216 Além da transmissão pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus)*  
217 *microplus*, dípteros hematófagos e fômites, podem ser fonte de infecção por  
218 *Anaplasma marginale* (DREHER et al., 2005). A infecção com *Anaplasma* sp.  
219 ocorre durante o repasto sanguíneo, o ciclo é caracterizado pela adesão de  
220 corpúsculos iniciais à superfície de eritrócitos, através de invaginação da  
221 membrana citoplasmática, embolsamento do microrganismo e a formação de  
222 um vacúolo parasitóforo na membrana celular do hospedeiro (FRANCIS;  
223 KINDEN; BUENING, 1979). Subsequentemente, ocorre a multiplicação de  
224 *Rickettsia* neste vacúolo, por divisão binária, formando o corpo elementar. Os  
225 corpúsculos de inclusão resultantes podem infectar outros eritrócitos (KOCAN  
226 et al., 2003; PALMER; BROWN; RURANGIRWA, 2000).

227 A manifestação da doença pode variar de subclínica a fatal dependendo  
228 da estirpe de *Anaplasma*, espécie, susceptibilidade do hospedeiro infectado e a

229 presença de outra doença coexistente. Os sinais clínicos relacionados incluem  
230 pirexia, anemia progressiva, icterícia, anorexia, depressão, redução da  
231 produção de leite, aborto em fêmeas, hemoglobinúria e morte. Animais que se  
232 recuperam da doença tornam-se portadores assintomáticos (DE LA FUENTE et  
233 al., 2002; EMMANUEL; GERRIT, 2010).

234 Estudos apontam perdas econômicas severas em decorrência da  
235 enfermidade causada pela anaplasmose e estão ligadas diretamente a  
236 medidas preventivas e terapêuticas de alto custo, índices significantes de  
237 morbidade e mortalidade, perdas no abate, redução da produção de carne e  
238 leite Um estudo recente sobre a soroprevalência de anticorpos de bovinos  
239 contra *A. marginale* no Sul do Egito revelou que essa enfermidade deve ser  
240 considerada como um potencial risco para a indústria de alimentos, pois a  
241 pecuária é uma importante fonte de renda neste país. Medidas de controle e  
242 prevenção devem ser consideradas como fortes aliadas na proteção de  
243 bovinos. Levando em consideração a importância dessa enfermidade é  
244 necessário o desenvolvimento de mais pesquisas promovendo a sanidade do  
245 rebanho e contribuindo para a economia (FEREIG et al., 2017).

246

247

### 248 **3.2 Babesiose – Aspectos Gerais**

249

250 Em 1888, na Romênia, Babes descreveu microrganismos no interior de  
251 eritrócitos bovinos e, por acreditar que se tratava de uma bactéria, o  
252 denominou como *Haematococcus bovis*. Em 1893 Smith e Kilborne associaram  
253 este achado a “Febre do Texas” e classificaram o agente como um protozoário,  
254 transmitido por carrapato, e denominaram como *Pyrosoma bigemina*. Starcovici  
255 (1893) entendeu como sendo o mesmo agente o microrganismo descrito por  
256 Babes, Smith e Kilborne, e homenageando o pesquisador romeno, incluiu-o  
257 em um novo gênero denominado *Babesia* (TRINDADE; ALMEIDA; FREITAS,  
258 2011) pertencente à família *Babesiidae*, ordem Eucoccidiorida, subordem  
259 Pirolasma, classe Sporozoasida e filo Apicomplexa (ALLSOPP et al., 1994;  
260 NARI, 1995).

261 A babesiose é causada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis* e  
262 *Babesia bigemina* (WESONGA et al., 2017). Estas espécies ocorrem

263 frequentemente em bovinos (Chauvin et al., 2009). Em países como Argentina  
264 (região nordeste e noroeste), Brasil (região centro sul) e outras regiões de  
265 clima tropical e subtropical, esses patógenos ocorrem com maior frequência  
266 (BOCK et al., 1995; FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2014; GIMENEZ et al.,  
267 2016).

268 Nos animais infectados por *Babesia* sp. a multiplicação dos protozoários  
269 ocasiona um aumento da fragilidade osmótica nas hemácias parasitadas,  
270 acometendo até 45% dos eritrócitos totais. Este fato está relacionado ao  
271 desequilíbrio na produção de citocinas próinflamatórias e de óxido nítrico  
272 resultando em destruição das células (BROWN; PALMER, 1999).

273 Os sinais clínicos envolvidos no desenvolvimento da doença incluem:  
274 hemoglobinemia, hemoglobinúria e febre. Nos animais infectados por *B. bovis*  
275 podem ocorrer sinais neurológicos (EGBE-NWIYI; SALAKO; OTUKONYONG,  
276 1997).

277 Estudos relacionados a diferentes espécies de *Babesia* demonstram  
278 diferença no ciclo de vida de cada uma, no entanto *B. bovis* e *B. bigemina*  
279 seguem os mesmos padrões na infecção do carrapato *Rhipicephalus*  
280 (*Boophilus*) *microplus* (BOCK et al., 1995).

281 As hemácias contendo a forma merozoítos e gametócitos são ingeridos  
282 pelos carrapatos durante o repasto na luz da região intestinal do carrapato,  
283 estas hemácias rompem e liberam as formas gametocíticas, que por ação  
284 bioquímica, se transformam em gametas masculino ou feminino. A fusão dos  
285 gametas origina o zigoto e deste origina o cineto (forma móvel), que penetra no  
286 epitélio intestinal do carrapato e da origem a novos cinetos. Os cinetos são  
287 liberados na hemolinfa e invadem vários órgãos realizando novas divisões. No  
288 ovário da teleógena, os ovócitos são infectados por cinetos, ocorre  
289 multiplicação nos ovos, embriões e larvas. Os cinetos penetram nas células  
290 epiteliais das glândulas salivares dos carrapatos, se transformam em  
291 esporontes, que se rompem e liberam os esporozoítos, formas infectantes para  
292 os vertebrados (WILLDSEN; JONGEJAN, 1999).

293 A resposta do sistema imune está relacionada à citocinas e outros  
294 agentes farmacologicamente ativos contra *Babesia*, o resultado dessa resposta  
295 está ligado ao tempo e a quantidade produzida destas células, podendo  
296 contribuir para o processo da doença causando outros sinais clínicos, entre

297 eles pode-se citar: vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade  
298 capilar, edema, colapso vascular, distúrbios de coagulação, lesão endotelial e  
299 estase circulatória (BOCK et al., 1995).

300 Em infecções subagudas o animal pode apresentar também icterícia,  
301 variando conforme a espécie afetada. *Babesia bovis* tem caráter hiperagudo ou  
302 agudo e caracteriza-se por manifestações neurológicas, causando convulsões,  
303 paralisia, choque, angústia respiratória e morte do animal infectado (BROWN;  
304 PALMER, 1999; SUAREZ; NOH, 2011). Outras alterações patológicas  
305 características de infecção por *Babesia bovis* também relatadas incluem:  
306 modificações na membrana dos eritrócitos, expressão de proteínas de  
307 superfície que fazem adesão dos eritrócitos às células endoteliais dos capilares  
308 e sequestro de hemácias parasitadas nos capilares de órgãos vitais (MOLLOY  
309 et al., 2003; O'CONNOR; LONG; ALLRED, 1999). A hemólise intravascular  
310 causada por essa parasitemia ocasiona, no plasma, uma coloração marrom-  
311 acastanhada em decorrência da hemoglobinemia, sendo este um achado  
312 característico da infecção.

313

### 314 **3.3 Tristeza Parasitaria Bovina – TPB**

315

316 A enfermidade denominada Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é  
317 composto pelos agentes etiológicos: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e  
318 *Anaplasma marginale*. Estes organismos em conjunto desencadeiam nos  
319 animais infectados alta morbidade e mortalidade ocorrendo com mais  
320 frequência em zonas de instabilidade enzoótica (SOUZA et al., 2000).

321 A condição sanitária dos rebanhos é necessária para manter uma  
322 produção de qualidade, ressaltando que não apenas doenças de bovinos  
323 controladas pela vigilância sanitária comprometem os rebanhos, mas diversas  
324 outras que também trazem prejuízos aos produtores, citando como exemplo a  
325 anaplasnose e a babesiose bovina.

326 Os sinais clínicos da TPB surgem após o desenvolvimento e a  
327 multiplicação dos patógenos no animal e são dependentes de fatores como  
328 períodos favoráveis a ocorrência de seu ciclo biológico, quando não há  
329 imunidade prévia no animal infectado, baixa quantidade do agente inoculado,

330 sensibilidade dos hospedeiros ligados à raça, idade e a outros fatores  
331 individuais (ANDREOTTI; KOLLER, 2013).

332 Na região Sul dos Estados Unidos da América (EUA), campanhas de  
333 controle foram criadas para a erradicação do vetor *Rhipicephalus (boophilus)*  
334 *microplus* com a finalidade de reduzir os prejuízos econômicos ligados a  
335 criação de bovinos (DE LA FUENTE; KOCAN; CONTRERAS, 2015). No Brasil,  
336 a situação epidemiológica encontra-se diretamente relacionada ao clima e ao  
337 ciclo desse vetor, sendo dividida em:

338 Áreas de estabilidade enzoótica, onde devido as condições climáticas o  
339 vetor se desenvolve durante todo o ano, há equilíbrio entre imunidade e  
340 doença, ou seja, 75% dos animais são portadores da infecção aos nove meses  
341 de idade apresentando a doença de forma subclínica quando mais velhos  
342 (KOCAN et al., 2010).

343 Áreas de instabilidade enzoóticas, onde as condições climáticas são  
344 desfavoráveis para o ciclo do vetor e o manejo e controle destes são realizados  
345 de maneira inadequada. A infecção ocorre em animais acima de nove meses  
346 acometendo entre 20 e 75% do rebanho, surtos da doença são vistos com  
347 maior frequência em animais adultos e nestes apresentam altos índices de  
348 mortalidade (KOCAN et al., 2010; MAHONEY; ROSS, 1972).

349 Áreas livres da doença incluem os municípios de Santa Vitória do  
350 Palmar, Jaraguão e Arroio Grande, localizados no Rio Grande do Sul. Nesses  
351 locais os animais são susceptíveis e a doença ocorre quando há entrada  
352 acidental de carrapatos infectados e quando os animais são alocados em  
353 zonas endêmicas (FARIAS, 1995; SOUZA et al., 2000).

354 Os estados que apresentam maiores índices de surto de TPB, no Brasil,  
355 são Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e São  
356 Paulo (BARCI et al., 1995; MADRUGA C.R.; AYCARDY E.; PUTT N., 1983;  
357 PATARROYO; SANTOS, 1984; SACCO; KESSLER; MADRUGA, 2001).  
358 Estudos sorológicos, parasitológicos e moleculares, relatados em São Luís no  
359 estado do Maranhão, verificaram alta prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina* em  
360 bovinos leiteiros infectados naturalmente classificando essa região como de  
361 estabilidade enzoótica (COSTA et al., 2015). A ocorrência de novos surtos  
362 foram relatados recentemente na mesorregião de Ouricuri, no Sertão de

363 Pernambuco, e na mesorregião de Petrolina, São Francisco (SANTOS et al.,  
364 2017).

365 Os fatores que desencadeiam a ocorrência de surtos são: a introdução  
366 de animais de áreas livres da doença em áreas enzoóticas, introdução de  
367 animais infectados nas áreas ou rebanhos livres da doença e ausência da  
368 população de carrapatos devido a medidas profiláticas ou a fatores  
369 relacionados ao clima. De modo a prevenir a ocorrência dessa enfermidade  
370 nos bovinos é necessária a realização da vacinação combatendo, assim, a  
371 ocorrência desses patógenos no rebanho e evitando que estes se disseminem  
372 para áreas livres da doença (SANTOS et al., 2017).

373

### 374 **3.4 Resposta Imune**

375

376 A imunidade inata é a primeira linha de defesa, sendo composta por  
377 citocinas e células natural killers (NK). Fatores como a especificidade entre  
378 parasitas e hospedeiros, características genéticas, idade dos indivíduos e a  
379 resposta imune celular dos mesmos, podem influenciar na construção da  
380 imunidade inata. No que se refere a resposta imune adaptativa, o organismo  
381 deve construir uma proteção duradoura e eficaz contra os microrganismos  
382 invasores, para isso, linfócitos T e B devem ser disponibilizados (NARI, 1995).

383 Células T CD4+, também conhecidas como células T auxiliares, são  
384 ativadas ao interagir seu respectivo receptor com antígenos peptídicos exibidos  
385 pelas moléculas MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe  
386 II apresentadas na superfície das células apresentadoras de antígeno e, após  
387 ativação, podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17, Th9, TFH e célula T  
388 regulatória (Treg). Essas células secretam citocinas atuando em diferentes  
389 tipos de resposta imune para eliminar agentes patogênicos (KALKUM; SEMIS,  
390 2017).

391 Em animais infectados de forma persistente, ou que possuam  
392 parasitemia controlada, ou mesmo animais imunizados com sucesso, as  
393 células T CD4+ específicas de antígenos são efetivas para a construção de  
394 uma resposta imune adaptativa através da produção de IFN $\gamma$ . Caso ocorra  
395 infecção aguda por parasitas virulentos, há necessidade de uma resposta

396 imune inata elevada de modo a ativar macrófagos por IFN- $\gamma$ , contribuindo para  
397 a produção de IgG2a que em associação ao IgG1 pode proteger de maneira  
398 passiva os bovinos infectados (BROWN et al., 2006, 2002; MAHONEY, 1986).

399        Microrganismos intracelulares se internalizam dentro de fagócitos de  
400 células hospedeiras, a defesa contra estes é mediada por células promovendo  
401 a destruição e morte das células infectadas eliminando reservatório da infecção  
402 (JABBAR et al., 2015). Estudos relacionados ao mecanismo de resposta imune  
403 contra infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos demonstram resposta  
404 mediada por linfócitos TCD4+, produtores de IFN- $\gamma$ , que são ativadores de  
405 macrófagos e atuam em linfócitos B para produção de anticorpos IgG2a  
406 garantindo opsonização e destruição do microrganismo. Estes estudos  
407 demonstram também que os anticorpos não conseguem por si só combater a  
408 parasitemia, sendo necessária a ação em conjunto da resposta humoral e  
409 celular (BROWN et al., 2001).

410

### 411 **3.5 Potenciais imunógenos em estudo**

412

413        Apesar do extenso número de pesquisas com antígenos para o uso  
414 como vacina contra a TPB, o que se tem em evidência no presente momento é  
415 a descoberta de potenciais imunógenos que poderiam ter papel fundamental na  
416 elaboração de uma resposta imune frente a um desafio.

417        A vacinação com parasitas atenuados é realizada ainda na Austrália,  
418 Argentina, Paquistão e diversos outros países. Essas vacinas podem ser  
419 mantidas refrigeradas ou mesmo congeladas e são uma das medidas de  
420 controle mais utilizadas atualmente.

421        As desvantagens dessas vacinas estão relacionadas aos seus altos  
422 custos de produção, logística de distribuição e o risco de contaminação com  
423 organismos patogênicos durante sua produção, especialmente quando  
424 bezerros esplenectomizados são usados. Portanto, há uma necessidade  
425 urgente de substituir essas vacinas por alternativas novas, mais seguras e  
426 eficazes.

427        O que se mostra de mais avançado na busca por uma vacina com  
428 potencial de proteção contra esses agentes são as proteínas. Pesquisas em  
429 torno dessas proteínas estão sendo desenvolvidas de modo a identificar

430 promotores de resposta imune para a construção de um imunógeno efetivo,  
431 além disso, essas proteínas são utilizadas também para identificar estirpes e  
432 sua localização geográfica de acordo com suas sequências de aminoácidos e  
433 peso molecular (BROWN et al., 1997; GOMES, 2015).

434

### 435 **3.6 Proteínas recombinantes de *Anaplasma* como imunógenos**

436

437 A condução de estudos na busca por antígenos imunogênicos baseia-se  
438 na intensão de produzir uma vacina recombinante multi subunidade que seja  
439 atraente do ponto de vista econômico, que proporcione segurança, que seja  
440 simples de se produzir em larga escala e que tenha custo reduzido (GIMENEZ  
441 et al., 2016).

442 A membrana externa purificada de *A. marginale* está sendo utilizada  
443 com frequência em imunizações por demonstrar resultados favoráveis na  
444 indução da proteção contra infecção de estirpes homólogas (Brown et al., 1998;  
445 Zhao et al., 2016). Entre as mais estudadas pode se citar as Proteínas  
446 Principais de Superfície (MSP) de *A. marginale* caracterizadas como: MSP1,  
447 MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (KAWASAKI et al., 2007; PALMER; MCGUIRE,  
448 1984; TEBELE; MCGUIRE; PALMER, 1991).

449 Outros antígenos recombinantes MSA, MSA-2b e MSA-2c foram  
450 utilizados para a confecção de uma formulação vacinal contendo adjuvante  
451 para análise de resposta imune. Os testes foram realizados em camundongos  
452 e mostraram que a formulação conferia altos níveis de IgG contra todos os  
453 antígenos avaliados. A resposta imune celular foi avaliada mensurando níveis  
454 de linfócito T CD4+, que são produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , por meio de  
455 estimulação com MAS-2a e MAS-2c. Os resultados mostraram-se  
456 encorajadores para utilização em bovinos com a possibilidade de conferir  
457 resposta imune protetora (BROWN et al., 2006).

458 Algumas dessas proteínas destacam-se por pertencer ao sistema de  
459 secreção do tipo IV (TFSS). Este sistema possui três funções: montagem e  
460 retração do pilus durante a conjugação propicia que a bactéria importe DNA  
461 exógeno e incorpore em seu genoma e transferência de seu próprio substrato  
462 as células alvo por meio de contato direto (LOPEZ et al., 2007).

463 Assim, as proteínas do TFSS mostram-se importantes em eventos  
464 relacionados à manutenção da sobrevivência e virulência bacteriana. O sistema  
465 T4SS possui doze proteínas e está arranjado com um óperon que codifica uma  
466 série de genes, sendo eles: *sodB*, *virb3*, *virb4* e *virb6* e um outro óperon  
467 contendo os genes *virb8*, *virb9*, *virb10*, *virb11* e *virD4*. As proteínas codificadas  
468 por esses genes estão ligadas ao transporte de fatores de virulência, algumas  
469 localizadas na membrana sendo potenciais imunógenos contra os agentes  
470 envolvidos na TPB. Mecanismos do sistema imune do hospedeiro reconhecem  
471 essas proteínas (VIRB9, VIRB10 e Proteína de Transferência Conjugal)  
472 induzindo a proliferação de células CD4+. Estas células atuam respondendo a  
473 três cepas distintas de *A. marginale*, isto confirma a atuação destas células  
474 contra epítomos da proteína nativa (LOPEZ et al., 2007).

475 O fator de Elongação Termoestável (*EF-tu*) de peptídeos associado a  
476 membrana de *A. marginale* em experimentos realizados *in vivo* induziu  
477 resposta imune humoral, havendo títulos elevados de IgG1 e IgG2a. As  
478 proteínas recombinantes VIRB9 e VIRB10 induziram resposta frente a  
479 estímulos *in vitro*. A EF-tu pode induzir a produção de anticorpos IgG2a  
480 específicos contra essas proteínas, dessa forma, ela pode estimular o sistema  
481 imune em animais naturalmente infectados ou imunizados com a membrana  
482 externa de *A. marginale*. A proteção conferida pela membrana externa de *A*  
483 *marginale* pode estar associada aos macrófagos que ativam IFN- $\gamma$  e mediados  
484 por linfócitos TCD4+ e IGg2 agem contra os epítomos da membrana  
485 (CASTELÃO et al., 2013).

486 A desvantagem deste método é o alto custo para o método de  
487 purificação da membrana inviabilizando a produção da vacina de forma  
488 econômica. Assim, a utilização de vacinas construídas a partir de proteínas  
489 recombinantes seria uma forma de reverter esse problema (ZHAO et al., 2016).

490 Novas proteínas antigênicas de *A. marginale* estão sendo estudadas  
491 utilizando técnicas de espectrometria de massa e mapeamento genômico.  
492 Dentre estas proteínas estão VIRB-9-1 e VIRB9-2 que pertencem ao sistema  
493 de secreção do tipo IV e tem demonstrado induzir imunidade humoral e celular  
494 quando utilizadas individualmente, em nano formulações ou associadas.

495 Em se tratando de nano formulações, estas podem estimular alta  
496 proliferação de citocinas, neste caso IFN- $\gamma$  mediada por resposta do tipo Th1. A

497 associação das proteínas VIRB9-1, VIRB9-2, VIRB9-10 mostrou forte potencial  
498 imunogênico, sendo responsáveis por proliferação significativa dos linfócitos T  
499 CD4+ e IFN- $\gamma$  e produção de IgG2 em bovinos imunizados com a membrana  
500 externa desses agentes, conferindo assim uma imunidade protetora (ZHAO et  
501 al., 2016).

502 No entanto estas proteínas recombinantes, quando utilizadas  
503 separadamente não demonstraram o mesmo potencial imunogênico do que  
504 quando associadas e requerem ainda um adjuvante de forma a otimizar sua  
505 ação (ZHAO et al., 2016).

506 Um estudo recente de uma proteína híbrida, construída com  
507 polipeptídeos da proteína MSP1a e epítomos comuns de proteínas de  
508 membrana externa de *Anaplasma* (OMP7, OMP8 e OMP9) foi realizado para  
509 avaliação da eficácia da imunização de camundongos BALB/c. Esses animais  
510 foram desafiados, com cepas vivas de *Anaplasma* UFMG2, após imunizações  
511 com a formulação proteica. A vacina foi efetiva contra o patógeno, diminuindo a  
512 rickettsemia e evitando o aparecimento de sinais clínicos (como por exemplo  
513 lesões hepáticas sendo estas observadas em animais não imunizados),  
514 encorajando mais estudos com construções híbridas para serem utilizadas  
515 como vacinas (CANGUSSU et al. 2018).

516

### 517 **3.7 Proteínas recombinantes de *Babesia* como imunógenos**

518

519 Estudos com proteínas de *Babesia* sp. tem demonstrado bons  
520 resultados com resposta imune específica, resposta imune cruzada a outras  
521 espécies e proteção específica esse agente da doença (AbouLaila et al. 2012).

522 Antígenos de superfície de membrana de merozoítos (MAS-1) foram  
523 produzidos de forma recombinante para a imunização de bovinos e os  
524 resultados obtidos mostraram altas titulações de anticorpos IgG1 e IgG2a  
525 reagindo contra a *B. bovis*. Em análises *in vitro* não houve indução de resposta  
526 imune contra este agente, no entanto MAS-1 conseguiu neutralizar a  
527 infecciosidade dos merozoítos (Lopez et al. 2005).

528 Pesquisas com a proteína MSP-1 de *B. bovis* obtiveram como resultado  
529 uma forte indução de anticorpos neutralizantes e resposta de linfócitos TCD4+  
530 em análises *in vitro*. Os epítomos presentes nas proteínas BbAMA-1 e BbTRAP

531 desempenharam papel importante na elaboração de resposta imune frente aos  
532 três patógenos envolvidos na TPB, sendo estas proteínas, consideradas fortes  
533 candidatas a vacinas de subunidade (Yokoama et al. 2006).

534 Outras pesquisas, dessa vez, utilizando vírus com capacidade de  
535 expressar antígenos construídos a partir de epítomos, de proteínas antigênicas  
536 (MAS-2c, RAP-1 e HSP20), conservados em *B. bovis* foram utilizados na forma  
537 recombinante para imunizar camundongos BALB/c com protocolo *primer-*  
538 *booster*. As formulações vacinais conseguiram demonstrar resultados positivos  
539 relacionados a resposta imune humoral e celular (ORTIZ et al. 2014)

540 A utilização de estirpes atenuadas de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. centrale*,  
541 tendo como objetivo o isolamento e atenuação desses organismos para testes  
542 como contra *B. bigemina* demonstraram diminuição da infectividade deste  
543 patógeno, no entanto, a vacina teve pouco potencial imunogênico (SACCO;  
544 KESSLER; MADRUGA, 2001). Testes realizados com bovinos imunizados  
545 com membrana externa destes mesmos patógenos mostraram índices  
546 significantes de proteção contra desafios homólogos e heterólogos  
547 (KAWASAKI et al., 2007; TEBELE; MCGUIRE; PALMER, 1991).

548 Proteínas da família profilin (PROF) de *B. bigemina*, *B. bovis* e *B. microti*  
549 foram caracterizadas e utilizadas para imunizar camundongos. A resposta  
550 imune foi avaliada e constatou-se proteção somente contra infecção por *B.*  
551 *microti* baseada em altos níveis de citocinas e imunoglobulinas (IgG)  
552 (MUNKHJARGAL et al., 2016).

553 Sistemas heterólogos estão sendo muito utilizados nas pesquisas com  
554 proteínas, devido à alta capacidade regulatória de expressão, secreção, e  
555 ainda, auxiliando na purificação. Uma nova formulação vacinal utilizando  
556 fragmentos de MAS-2a1, MAS-2b, MAS-2c e a forma recombinante deste  
557 antígenos, foram produzidos em *Pichia Pastoris* e testada em camundongos  
558 C57BL. Neste estudo, foi avaliada a imunidade humoral e celular conferida por  
559 essa vacina, bem como a capacidade de inibir a invasão dos eritrócitos por  
560 merozoítos. Os camundongos imunizados com as formas recombinantes  
561 tiveram altos títulos de anticorpos em relação aos vacinados somente com um  
562 antígeno. Todas as formulações inibiram a invasão de merozoítos, no entanto  
563 as formulações recombinantes tiveram melhores resultados (GIMENEZ et al  
564 2016)

565

566

## REFERÊNCIAS

567

568 ABOULAILA, M. et al. Apicoplast-targeting antibacterials inhibit the growth of  
569 *Babesia* parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.6,  
570 2012.

571

572 ALLSOPP, M. T. E. P. et al. Phylogeny and evolution of the piroplasms.  
573 **Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 147, 6 fev. 1994.

574

575 ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil**. 1. ed. Brasília:  
576 Embrapa, 2013.

577

578 AUBRY, P.; GEALE, D. W. A Review of Bovine Anaplasmosis. **Transboundary  
579 and Emerging Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1–30, 1 fev. 2011.

580

581 BARCI, L. A. G. et al. Epidemiologia da babesiose bovina no estado de sao  
582 paulo: estudo em rebanhos de corte do vale do ribeira. **Revista Brasileira de  
583 Parasitologia Veterinaria**, v. 4, n. 2 supl.1, p. 205, 1995.

584

585 BOCK, R. E. et al. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine.  
586 **Australian Veterinary Journal**, v. 72, n. 8, p. 296–300, 1 ago. 1995.

587

588 BROWN, G. K. et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli*  
589 and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with  
590 remote Aboriginal communities in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.  
591 84, n. 9, p. 321–325, 1 set. 2006.

592

593 BROWN, J. L. et al. Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell  
594 polarity in yeast. **Genes & development**, v. 11, n. 22, p. 2972–82, 15 nov.  
595 1997.

596

597 BROWN, W. .; PALMER, G. . Designing Blood-stage Vaccines against *Babesia*  
598 *bovis* and *B. bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 275–281, 1 jul.  
599 1999.

600

601 BROWN, W. C. et al. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with  
602 *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex  
603 of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus  
604 that is conserved among strains. **Infection and immunity**, v. 69, n. 11, p.  
605 6853–62, 1 nov. 2001.

606

607 BROWN, W. C. et al. Major histocompatibility complex class II DR-restricted

- 608 memory CD4(+) T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes  
609 of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. **Infection and immunity**, v.  
610 70, n. 10, p. 5521–32, 1 out. 2002.  
611
- 612 CASTELÃO, A. B. C. et al. Caracterização da imunogenicidade das proteínas  
613 recombinantes Virb9, Virb10 e fator termo instável de Elongação de Peptídeos  
614 de *Anaplasma marginale* em camundongos. **Brazilian Journal of Veterinary  
615 Research and Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 377, 26 fev. 2013.  
616
- 617 CANGUSSU, A.S.R.et al. A hybrid protein containing MSP1a repeats and  
618 Omp7, Omp8, and Omp9 epitopes protect immunized BABL/c mice against  
619 anaplasmosis. **Veterinary Research**, v. 49, n. 6, 19 jan. 2018.  
620
- 621 COSTA, F. B. et al. Serological, parasitological and molecular assessment of  
622 *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from state of Maranhão. **Revista  
623 Caatinga**, v. 28, n. 2, 2015.  
624
- 625 DE LA FUENTE, J. et al. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale*  
626 derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-  
627 exposure with infected ticks. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 239–  
628 251, 22 out. 2002.  
629
- 630 DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; CONTRERAS, M. Prevention and control  
631 strategies for ticks and pathogen transmission. **Revue Scientifique et  
632 Technique-Office International des Epizooties**, v. 34, n. 1, p. 249–264,  
633 2015.  
634
- 635 DE VOS, A. J. Distribution, economic importance and control measures for  
636 *Babesia* and *Anaplasma*. In: T.T. DOLAN (Ed.). . **Recent Developments in the  
637 Control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis**. Nairobi: The  
638 International Laboratory for Reserach on Animal Diseases, 1992.  
639
- 640 DREHER, U. M. et al. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale*  
641 and *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical and diagnostic laboratory  
642 immunology**, v. 12, n. 10, p. 1177–83, 1 out. 2005.  
643
- 644 DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae  
645 and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of  
646 Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with  
647 Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of  
648 Ehrlichia equi and “HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia  
649 phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary  
650 Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145–2165, 1 nov. 2001.  
651
- 652 EGBE-NWIYI, T. N.; SALAKO, M. A.; OTUKONYONG, E. E. Observations on  
653 naturally occurring bovine anaplasmosis in arid zone of North-Eastern Nigeria:

- 654 prevalence, haematological and pathological changes. **Studies and**  
655 **Researches in Veterinary Medicine**, v. 5, p. 95–99, 1997.  
656
- 657 EMMANUEL, C.; GERRIT, U. Anaplasmosis. In: **Infectious and parasitic**  
658 **diseases of livestock**. [s.l.] Editions Tec & Doc, 2010. p. 1985.  
659
- 660 FARIAS, N. A. DA R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**.  
661 Livraria e Editora Agropecuária, , 1995. Disponível em:  
662 <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300047603>>.  
663 Acesso em: 11 fev. 2018.  
664
- 665 FEREIG, R. M. et al. Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*,  
666 *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern  
667 Egypt. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 125–131, 1 jan. 2017.  
668
- 669 FIGUEROA, J. V et al. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by  
670 polymerase chain reaction amplification. **Journal of clinical microbiology**, v.  
671 30, n. 10, p. 2576–82, 1 out. 1992.  
672
- 673 FLORIN-CHRISTENSEN, M. et al. Vaccines against bovine babesiosis: where  
674 we are now and possible roads ahead. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1563–  
675 1592, 28 out. 2014.  
676
- 677 FRANCIS, D. H.; KINDEN, D. A.; BUENING, G. M. Characterization of the  
678 inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferritin labeling.  
679 **American journal of veterinary research**, v. 40, n. 6, p. 777–82, jun. 1979.  
680
- 681 GIMENEZ, A. M. et al. A recombinant multi-antigen vaccine formulation  
682 containing *Babesia bovis* merozoite surface antigens MSA-2a1, MSA-2b and  
683 MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies and IFN- $\gamma$  producing cells.  
684 **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 577, 14 dez. 2016.  
685
- 686 GOHIL, S. et al. Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia*  
687 *bovis*: moovin' forward. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 591–599, 1  
688 dez. 2010.  
689
- 690 GOMES, J. S. **Produção e avaliação preliminar de uma proteína**  
691 **recombinante quimérica para uso no controle de Tristeza parasitária**  
692 **bovina (TPB)**. [s.l.: s.n.].  
693
- 694 GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na  
695 região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 187–194, 2000.  
696
- 697 GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle  
698 parasites in Brazil Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de

- 699 bovinos no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p.  
700 150–156, 2014.  
701
- 702 GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; VIÑABAL, A. E. Ticks (Ixodidae)  
703 parasitizing humans in four provinces of north-western Argentina. **Annals of**  
704 **Tropical Medicine & Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 539–542, 15 jan. 1991.  
705
- 706 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE.  
707 **Indicadores IBGE - Estatística da produção pecuária - Junho de 2017.**  
708 Disponível em:  
709 [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/abate-](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf)  
710 [leite-couro-ovos\\_201701caderno.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2018.  
711
- 712 JABBAR, A. et al. Tick-borne diseases of bovines in Pakistan: major scope for  
713 future research and improved control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 283, p. 2–  
714 13, 2015.  
715
- 716 JIRAPATTHARASATE, C. et al. Molecular detection and genetic diversity of  
717 bovine *Babesia spp.*, *Theileria orientalis*, and *Anaplasma marginale* in beef  
718 cattle in Thailand. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 751–762, 27 fev.  
719 2017.  
720
- 721 JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**,  
722 v. 129, n. 7, p. S3, 2005.  
723
- 724 KALKUM, M.; SEMIS, M. **Vaccines for Invasive Fungal Infections**. New York,  
725 NY: Springer New York, 2017.  
726
- 727 KAWASAKI, P. M. et al. Immune response of BALB/c mouse immunized with  
728 recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to  
729 immunostimulant complex (ISCOM). **Research in Veterinary Science**, v. 83, n.  
730 3, p. 347–354, 1 dez. 2007.  
731
- 732 KOCAN, K. M. et al. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma*  
733 *marginale* Infection in Cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p.  
734 698–712, 1 out. 2003.  
735
- 736 KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary**  
737 **Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 95–107, 10 fev. 2010.  
738
- 739 LOPEZ, J. E. et al. Identification of novel antigenic proteins in a complex  
740 *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and  
741 genomic mapping. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8109-8118, 13 Sep.  
742 2005.

743

744 LOPEZ, J. E. et al. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion  
745 system proteins in a protective outer membrane vaccine. **Infection and**  
746 **immunity**, v. 75, n. 5, p. 2333–42, 1 maio 2007.

747

748 MADRUGA, C. R. et al. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da  
749 tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul. **EMBRAPA**, n. 38, p. 1–7,  
750 1987.

751

752 MADRUGA C.R.; AYCARDY E.; PUTT N. Epidemiologia da Anaplasmosose e  
753 Babesiose em bovinos da região de Cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul.  
754 I. Prevalência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , v.  
755 35, p. 631–640, 1983.

756

757 MAHONEY, D. F. Studies on the protection of cattle against *Babesia bovis*  
758 infection. **Parasite lives: papers on parasites, their hosts and their**  
759 **associations to honour J.F.A. Sprent / edited by Mary Cremin, Colin**  
760 **Dobson and Douglas E. Moorehouse**, 1986.

761

762 MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine  
763 babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p. 292–298, 1 maio  
764 1972.

765

766 MARANA, E. R. M. et al. Comparação dos testes sorológicos de  
767 Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA por  
768 competição para a detecção de anticorpos contra o *Anaplasma marginale* em  
769 soros de bovinos de diferentes áreas enzoóticas. **Semina: Ciências Agrárias**,  
770 v. 27, n. 4, p. 629, 29 jul. 2006.

771

772 MOLLOY, J. B. et al. *Babesia bovis*: adhesion of parasitized red blood cells to  
773 bovine umbilical vein endothelial cells in vitro does not select for virulence.  
774 **Experimental Parasitology**, v. 103, n. 3–4, p. 182–184, 1 mar. 2003.

775

776 MUNKHJARGAL, T. et al. Identification and characterization of profilin antigen  
777 among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis.  
778 **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 29–36, 1 jul. 2016.

779

780 NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-  
781 borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1–3, p.  
782 153–165, 1 mar. 1995.

783

784 O'CONNOR, R. M.; LONG, J. A.; ALLRED, D. R. Cytoadherence of *Babesia*  
785 *bovis*-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides  
786 an in vitro model for sequestration. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p.  
787 3921–8, 1 ago. 1999.

788

789 OCHIRKHUU, N. et al. Molecular Epidemiological Survey and Genetic  
790 Characterization of Anaplasma Species in Mongolian Livestock. **Vector-Borne  
791 and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 8, p. 539–549, 1 ago. 2017.

792

793 ORTIZ et al Vaccine strategies against Babesia bovis based on prime-boost  
794 immunizations in mice with modified vaccinia Ankara vector and recombinant  
795 proteins. **Vaccine**, v. 32, p. 4625-4632, 13 Jun. 2014)

796

797 PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in  
798 the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*.  
799 **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 1 fev. 2000.

800

801 PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale*  
802 initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **Journal of immunology**  
803 **(Baltimore, Md. : 1950)**, v. 133, n. 2, p. 1010–5, 1 ago. 1984.

804

805 PATARROYO, J.; SANTOS, J. **Diagnóstico da situação sanitária bovina do**  
806 **Estado de Minas Gerais. VI-Aspectos epidemiológicos da babesiose**  
807 **bovina na “Zona da Mata” Congresso Brasileiro de Medicina**  
808 **Veterinária** Belém Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, , 1984. Disponível  
809 em: [https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-  
810 BR&as\\_sdt=0%2C5&q=Diagnóstico+da+situação+sanitária+bovina+do+Estado  
811 +de+Minas+Gerais.+VI+-  
812 +Aspectos+epidemiológicos+da+babesiose+bovina+na+“Zona+da+Mata&btnG  
813 =>](https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Diagnóstico+da+situação+sanitária+bovina+do+Estado+de+Minas+Gerais.+VI+-+Aspectos+epidemiológicos+da+babesiose+bovina+na+“Zona+da+Mata&btnG=>). Acesso em: 11 fev. 2018

814

815 RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. BmVDAC upregulation in the midgut of  
816 Rhipicephalus microplus, during infection with *Babesia bigemina*. **Veterinary**  
817 **Parasitology**, v. 212, n. 3–4, p. 368–374, 15 set. 2015.

818

819 SACCO, A. M. S.; KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R. Cepas atenuadas de  
820 *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos  
821 no controle da tristeza parasitária bovina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 849–  
822 855, 2 maio 2001.

823

824 SANTOS, G.B. et al. Tristeza Parasitaria em bovinos do semiárido  
825 Pernambuco. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n. 1, p. 1-7, jan.  
826 2017.

827

828 SOUZA, J. C. P. et al. Avaliação do uso de cepas atenuadas de *Babesia bovis*  
829 e bigemina associadas a amostra virulenta de *Anaplasma marginale* na  
830 premunição de bovinos da raça holandesa. **Revista de Ciências da Vida**, v.  
831 22, p. 09–15, 2000.

832

- 833 SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine  
834 babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1–2, p. 109–  
835 125, 4 ago. 2011.  
836
- 837 TEBELE, N.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity  
838 by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and**  
839 **immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199–204, 1 set. 1991.  
840
- 841 THEILER, A. ***Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.): the marginale points**  
842 **in the blood of cattle suffering from a specific disease.** [s.l.] Report of the  
843 Government Veterinary Bacteriologist, in Transvaal. Department of Agriculture,  
844 1910.  
845
- 846 TRINDADE, H. I. DA; ALMEIDA, K. DE S.; FREITAS, F. L. DA C. Tristeza  
847 parasitária bovina – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de**  
848 **Medicina Veterinária**, n. 16, 2011.  
849
- 850 WESONGA, F. D. et al. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* and *Babesia*  
851 *bigemina* infections and associated risk factors in Machakos County, Kenya.  
852 **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 265–272, 22 fev. 2017.  
853
- 854 WILLADSEN, P; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the  
855 control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology today**, v.15, p.7, 1999.  
856
- 857 ZHAO, L. et al. Immunogenicity of Outer Membrane Proteins *VirB9-1* and *VirB9-*  
858 *2*, a Novel Nanovaccine against *Anaplasma marginale*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4,  
859 p. e0154295, 26 abr. 2016.  
860
- 861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879

## ARTIGO

Normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

**VACINA DE DNA QUIMÉRICO COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *Anaplasma marginale* E *Babesia* spp. EM BOVINOS<sup>1</sup>**

Steffany M. Ribeiro<sup>2</sup>; Lenita R. dos Santos<sup>3</sup>; Grácia M. S. Rosinha<sup>3</sup>; Flávio R. de Araujo<sup>3</sup>; Emanuelle B. Gaspar<sup>4</sup>; Cleber O. Soares<sup>3</sup>.

**ABSTRACT.**- Ribeiro S M., Santos L R., Rosinha G M S., Araujo F R., Gaspar E B., Soares C O. [Chimeric DNA vaccine as a strategy for the control of *Anaplasma marginale* and *Babesia* sp. in cattle] Vacina de DNA quimérico como estratégia para o controle de *Anaplasma marginale* e *Babesia* spp. em bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Engenharia Genética, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: lenita.santos@embrapa.br

*Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* are intra-erythrocyte parasites that together constitute the complex called Parasitic Bovine Tristeza, affecting the herd of tropical and subtropical zones. Because it is difficult to diagnose, costly treatment and cause considerable damage to cattle breeders, it is necessary to seek prevention methods that are easy to apply in the field, provide safety to the animal and the veterinarian, which has low economic cost and guarantees effective immunity and lasting to the bovine. The objective of this study was to evaluate the immune response conferred by a chimeric protein and DNA formulation injected into BALB/c mice. The assays were performed ELISA with blood serum and splenocyte culture supernatant for the detection of total IgG and its subunits IgG1 and IgG2a, IFN- $\gamma$  and IL-10. Previous results indicated induction of humoral immune response in mice that received protein associated with an adjuvant as well as in those receiving DNA with primer/booster injection. In animals that received naked DNA there was no detection of immune response. In conclusion, the desired immune response of this vaccine formulation is of the TH1 type, producing cytokines and activating macrophages to destroy intracellular pathogens efficiently. MHC class II molecules activate B cells to produce predominantly IgG opsonizing antibodies and their IgG2a subclass. However, the results obtained in this work suggest a Th2 type response that has no action on intracellular microorganisms because they do not activate macrophages and still produce IL-10

INDEX TERMS: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, humoral immune response and cellular immune response.

920 <sup>1</sup> Recebido em \_\_\_\_\_

921 Aceito para publicação em \_\_\_\_\_

922 <sup>2</sup> Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária Universitário,  
923 Pioneiros, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil. Pesquisa de Mestrado com apoio Fundect. \*Autor  
924 para correspondência: steffanymorceli@hotmail.com.

925 <sup>3</sup> EMBRAPA Gado de Corte, Av. Rádio Maia, Vila Popular, Campo Grande, MS, 79106-550, Brasil.

926 <sup>4</sup> EMBRAPA Pecuária Sul, Rodovia BR-153, Km 632,9, Zona Rural, Bagé, RS 96401-970, Brasil.

927

928 **RESUMO.**- *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* são parasitas intraeritrocitários  
929 que em conjunto constituem a enfermidade denominada Tristeza Parasitaria Bovina, acometendo o  
930 rebanho de zonas tropicais e subtropicais. Por ser de difícil diagnóstico, tratamento oneroso e gerar  
931 prejuízos consideráveis aos criadores de bovinos, há a necessidade de buscar métodos de  
932 prevenção que sejam de fácil aplicação a campo, confira segurança ao animal e ao médico  
933 veterinário, que tenha baixo custo econômico e garanta imunidade eficaz e duradoura ao bovino.  
934 Objetivou-se nesse estudo avaliar a resposta imune conferida por formulação quimérica de  
935 proteína e DNA injetada em camundongos BALB/c. As análises foram realizadas pela técnica de  
936 ELISA com soro sanguíneo, para detecção de IgG total e suas subunidades IgG1 e IgG2a, e  
937 sobrenadante do cultivo de esplenócitos para detecção de IFN- $\gamma$  e IL-10. Os resultados obtidos  
938 indicam indução de resposta imune humoral nos camundongos que receberam proteína ANABABr  
939 associada ao adjuvante Montanide ISA 70 (Seppic®) como também naqueles que receberam DNA  
940 com injeção tipo *primer/booster*. Nos animais que receberam DNA *naked* não houve detecção de  
941 resposta imune. Em conclusão, a resposta imune que se deseja obter dessa formulação vacinal é do  
942 tipo TH1, produzindo citocinas e ativando macrófagos para destruir patógenos intracelulares de  
943 forma eficiente. As moléculas do MHC de classe II ativam as células B a produzirem anticorpos de  
944 ação opsonizante predominantemente IgG e sua subclasse IgG2a. No entanto, os resultados obtidos  
945 nesse trabalho sugerem uma resposta do tipo Th2 que não tem ação sobre microrganismos  
946 intracelulares pois não ativam macrófagos e ainda produzem IL-10.

947

948 TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia Bigemina*, resposta imune  
949 humoral e resposta imune celular.

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

## INTRODUÇÃO

960

961

962 A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma enfermidade que tem como principal vetor o carrapato  
963 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o qual transmite os agentes *Anaplasma marginale*, *Babesia*  
964 *bovis* e *B. bigemina* que infectam os animais e causam a doença (De Vos 1992). A babesiose bovina  
965 foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1901, em bovinos importados, em fase de aclimação,  
966 no estado do Rio de Janeiro (Fonseca & Braga 1923; Souza et al. 2000). Em relação à anaplasmoze, é  
967 uma enfermidade presente em países de clima tropical e subtropical de todo o mundo (Riding et al.  
968 2003) e, da mesma forma que *Babesia* spp, pode ser transmitida por carrapatos ixodídeos (Kocan et  
969 al. 2003; Rikihisa et al. 2003), através de dípteros hematófagos (Foil 1989), fômites (Kocan et al.  
970 2003) e via transplacentária (De Vos 1992).

971 O diagnóstico específico da TPB é realizado através de exame laboratorial, sendo que os mais  
972 utilizados são os de identificação indireta de anticorpos contra os agentes da TPB, com a técnica de  
973 imunofluorescência - IFI e o ensaio de Imunoabsorção enzimática - ELISA (Marana et al. 2006).  
974 Métodos de diagnóstico direto podem ser feitos por confecção de esfregaços sanguíneos (Figuerola  
975 et al. 1992) e reação em cadeia da polimerase - PCR. Estas técnicas podem auxiliar na escolha do  
976 tratamento dos animais acometidos, principalmente para diferenciação dos casos de anaplasmoze e  
977 babesiose, já que existem tratamentos específicos para cada enfermidade (Andreotti & Koller  
978 2013), a fim de reduzir o efeito da doença nos animais infectados e gerar um sistema econômico e  
979 eficiente para o controle destas doenças no rebanho (Madruga et al. 1986). No caso da infestação  
980 por carrapato, esta pode ser controlada por meio de ações estratégicas, como o uso de acaricidas  
981 (Kocan et al. 2010). Outros métodos profiláticos incluem a quimioprofilaxia com Dipropionato de  
982 Imidocarb, antibiótico-terapia com Aceturato de Diminazene (Silva et al. 2017) e utilização de  
983 vacinas (Kocan et al. 2003; Kocan et al. 2010).

984 Em se tratando de vacina, um modelo ideal contra TPB deve ser capaz de induzir imunidade  
985 protetora, evitar a infecção nos bovinos e impedir a transmissão destes patógenos pelos carrapatos.  
986 Para tanto, o animal deve receber proteínas com potencial de estimular uma resposta imunológica  
987 eficaz e duradoura, assim diversos grupos de pesquisa estão à procura destes imunógenos para sua  
988 utilização em formulações de forma individual ou recombinante em associação a outros  
989 imunógenos e que possibilitem alto potencial de proteção. A combinação destas formulações com  
990 diferentes adjuvantes ou formas de administração já estão em estudo (Gimenez et al. 2016).

991 Na Argentina, pesquisas demonstram resultados positivos com a vacinação utilizando parasitas  
992 vivos atenuados de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale*, induzindo, também, uma  
993 imunidade parcial contra *A. marginale* (Gonçalves 2000). Este é o método mais utilizado atualmente  
994 em diversos países, essas vacinas podem ser mantidas refrigeradas ou mesmo congeladas e são  
995 uma das medidas de controle da infecção por TPB. No entanto, as desvantagens estão relacionadas  
996 aos altos custos de produção, logística de distribuição e o risco de contaminação com organismos  
997 patogênicos durante sua produção, especialmente quando os bezerros esplenectomizados são  
998 usados (Gimenez et al. 2016; Ortiz et al. 2016).

999 Em países como Austrália, Argentina, México, Colômbia, Israel e Sul da África (Gimenez et al.  
1000 2016), a forma de induzir a produção de anticorpos contra *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* é  
1001 realizada por meio de imunização com uma vacina viva atenuada produzida a partir do sangue de  
1002 animais infectados com esses agentes. Essa vacina não está disponível comercialmente no Brasil,  
1003 além disso, apresenta alguns inconvenientes, como ser de difícil manejo a campo, por ser  
1004 armazenada em nitrogênio (Kessler et al. 2002; Kocan et al. 2010).

1005 Nesse contexto, a indisponibilidade atual de um controle profilático reforça a necessidade de  
1006 alternativas para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção. Assim, o desenvolvimento  
1007 de uma vacina recombinante pode ser uma opção. Estudos estão sendo desenvolvidos à procura de  
1008 imunógenos com alto potencial de proteção contra os agentes da TPB, sendo capazes de induzir  
1009 imunidade protetora, evitar a infecção e impedir a transmissão do agente causador da doença.

1010 Construções protéicas ricas em epítomos e o uso de genes recombinantes para a ativação de  
1011 anticorpos específicos contra os patógenos envolvidos na TPB são utilizados atualmente como  
1012 proposta para a construção de fortes candidatos a imunógenos (Ortiz et al. 2016).

1013 Neste estudo, objetivou-se a avaliação da resposta imune humoral e celular conferida por uma  
1014 formulação vacinal contruída a partir de uma quimera sinteticamente confeccionada. Esta quimera  
1015 foi elaborada partir de estudos prévios de porções ricas em epítomos que demonstram ter potencial  
1016 imunogênico e ser conservadas nos agentes envolvidos na TPB: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e  
1017 *Anaplasma marginale*. A construção de DNA quimérico foi inserida em vetor para expressão em  
1018 organismo procaríoto, de forma a induzir a produção da proteína quimérica recombinante, e a qual  
1019 pode ser preparada em associação a adjuvante e encapsulados a nanopartículas de quitosana para  
1020 inoculação em camundongos BALB/c. A inserção do plasmídeo recombinante quimérico em células  
1021 eucariotóticas, garante a produção da proteína recombinante diretamente *in vivo*.

1022

1023

## MATERIAL E MÉTODOS

1024 **Obtenção do gene quimérico.** A construção da quimera foi determinada a partir de estudo de  
1025 porções ricas em epítomos provindos de proteínas presentes nos isolados das espécies em estudo.  
1026 Em *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* a porção gênica selecionada na proteína P0 se mantém nas  
1027 duas espécies. Já em *Anaplasma marginale* as porções gênicas foram selecionadas a partir das  
1028 proteínas VIRB9 e VIRB10. Estas porções gênicas foram selecionadas de acordo com a conservação  
1029 e potencial imunogênico (Araújo et al. 2008; SG Junior et al. 2010; Castelão et al. 2013) por meio do  
1030 servidor *on line* PROPREP seguido de análise pelo *software Protean (DNA Star)*.

1031 A quimera confeccionada sinteticamente pela empresa *Genone Biotechnologies* foi inserida em  
1032 vetor de expressão eucarioto, pcDNA3.1A, para a obtenção de DNA quimérico. Para a produção da  
1033 proteína quimérica, a sequência foi inserida em vetor pET28A, que tem potencial de expressão em  
1034 células procariotas.

1035 **Cultivo de *Escherichia coli* para amplificação do DNA recombinante.** Foi realizada  
1036 transformação química utilizando *E. coli* da linhagem TOP10, quimicamente competente, com um  
1037 volume de plasmídeo pcDNA3.1Aanabab. As células foram semeadas em placa de petri contendo  
1038 meio Luria Bertani, com antibióticos de seleção. Uma colônia isolada foi inoculada em meio Luria

1039 Bertani, com antibióticos e utilizada para gerar um grande volume de inóculo, ficando sob  
1040 incubação a 37°C em agitador orbital. O inóculo de grande volume foi incubado a 37°C em agitador  
1041 orbital. Todo volume de cultura foi centrifugado. (Green et al. 2012).

1042 O material resultante da centrifugação foi purificado utilizando o *kit Pure Yield™ Plasmid*  
1043 *System* - Promega®, seguindo as recomendações do fabricante. Para a confirmação da presença do  
1044 DNA quimérico como produto da purificação foi realizada digestão enzimática. A quantificação  
1045 obtida pela purificação foi mensurada com auxílio de espectrofotometro NanoDrop®, como  
1046 recomendado pelo fabricante.

1047 **Cultivo de *Escherichia coli* para produção da proteína recombinante.** Foi realizada  
1048 transformação química de *E. coli* da linhagem *Rosetta* com o plasmídeo quimérico pET28a/*anabab*.  
1049 A transformação foi semeada em placa contendo meio Luria Bertani, com antibióticos seletivos e  
1050 incubados a 37°C. Para a produção do pré-inóculo, uma colônia isolada foi inoculada em meio Luria-  
1051 Bertani com antibiótico seletivo, e levado ao agitador orbital a 37°C. Foi utilizado isopropil  $\beta$ -D-1-  
1052 tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1mM para indução e a coleta realizada após 3 horas (Sambrook,  
1053 2012).

1054 **Análise da produção e purificação da proteína recombinante.** Análises da expressão foram  
1055 realizadas por eletroforese com SDS-PAGE 12% para confirmação da produção da proteína  
1056 quimérica. O sedimento obtido do inóculo foi tratado com substâncias denaturantes, de modo a  
1057 solubilizar a proteína, conforme recomendações do fabricante da coluna de cromatografia por  
1058 afinidade ao níquel - ProBond®/Invitrogen. Nessa etapa foi utilizada lisozima (10 mg/mL) e tampão  
1059 de ligação (8 M de ureia, 10 mM de imidazol e pH 8) filtrado em membrana antes do uso. Esta  
1060 preparação foi homogeneizada em vortex, incubada em gelo, levadas ao banho-maria e sonicadas. O  
1061 sedimento foi ressuspensionado em tampão de ligação uréia 8 M e imidazol 10 mM (Atzingen et al.,  
1062 2014). A amostra foi descongelada em gelo, homogeneizada em vortex e centrifugada novamente.  
1063 As amostras tratadas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel  
1064 ProBond®/Invitrogen (Atzingen et al., 2014). O material da purificação passou por processo de  
1065 diálise em membrana de nitrocelulose para retirada dos agentes denaturantes. Para análise do  
1066 material dialisado, foi realizado *western-blot* (Atzingen et al., 2014), com anticorpo anti-His e  
1067 anticorpo anti-IgG de camundongo (Sigma-Aldrich), utilizados na diluição recomendada pelo  
1068 fabricante. A quantificação deste material foi realizada utilizando método de *Lowry* (Lowry et al.  
1069 1951).

1070 **Animais e grupos experimentais.** Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 5  
1071 semanas de idade, foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais  
1072 (UFMG). Os animais foram acondicionados em caixas com sistema de ventilação, água e ração  
1073 comercial estéreis, *ad libitum* e maravalha estéril. Os grupos foram preparados da seguinte forma:  
1074 PBS (5 animais); Montanide™ ISA 70 - Seppic® (5 animais); pcDNA3.1A (5 animais);  
1075 pcDNA3.1A/*anabab* (5 animais); pcDNA3.1A/*anabab* + *booster* de ANABABr + Montanide™ ISA 70 -  
1076 Seppic® (5 animais); ANABABr + Montanide™ ISA 70 - Seppic® (10 animais).

1077 **Aspectos Éticos.** Este experimento tem a aprovação da CEUA (Comissão de ética no uso de  
1078 animais) da Embrapa Gado de Corte, protocolo 009/2013 e da CIBio/CTNBio (Comissão Interna de

1079 Biossegurança/Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) da Embrapa Gado de Corte, Processo  
1080 nº: 01200.006374/2001-34.

1081 **Protocolo de imunização.** A imunogenicidade da formulação foi avaliada usando protocolos  
1082 de injeção com pcDNA3.1A/*anabab*, proteína ANABAB emulsionada em adjuvante e  
1083 pcDNA3.1A/*anabab* seguido de proteína ANABAB na última dose (*primer-booster*). As imunizações  
1084 de pcDNA3.1A/*anabab* e pcDNA3.1A foram realizadas via intramuscular (região do quadríceps).  
1085 Cada animal foi injetado com 100µg de plasmídeo em um volume de 100µl distribuídos em dois  
1086 sítios. A proteína foi emulsionada com adjuvante Montanide™ ISA 70 - Seppic® usando proporções  
1087 de 30% de proteína e 70% de adjuvante. Os animais que receberam ANABABr foram injetados por  
1088 via subcutânea (na região dorsal) com cerca 35µg de proteína em volume de 200µL cada um. Cada  
1089 grupo de animais recebeu três injeções realizadas com quatorze dias de intervalo. Antes do início  
1090 do protocolo, e de 10 a 14 dias após cada imunização, foi coletado sangue via plexo orbital (pré-  
1091 imune e pós-imune respectivamente) para obtenção de soro.

1092 **Avaliação da resposta imune humoral.** A resposta imune humoral foi avaliada por ELISA  
1093 pela detecção de IgG total e subclasses IgG1 e IgG2a a partir dos soros sanguíneos. A proteína  
1094 recombinante foi preparada na concentração de 1.600 µg/mL para tratamento com SDS (dodecíl  
1095 sulfato de sódio) e utilização como antígeno. Foi realizada padronização para determinação da  
1096 concentração de uso do antígeno, diluição de teste dos soros e diluição do conjugado. Então, as  
1097 placas foram sensibilizadas com 100 µL da proteína diluída 1:1.000 em tampão  
1098 carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6 e incubada a 4°C. Todas as etapas de lavagem foram  
1099 realizadas com PBS1X Tween 20%. (Sigma-Aldrich). Para o bloqueio de sítios inespecíficos, foram  
1100 aplicados 200 µL por poço de PBS1X com Tween 20% (Sigma-Aldrich) e leite desnatado Molico™  
1101 (Nestlé) a 5%. O *pool* de soros negativo e positivo e os soros para o teste foram diluídos a 1:100 e  
1102 preparados em duplicata para plaqueamento em 100 µL conforme o desenho da placa e incubados  
1103 por 1 hora a 37°C. Foram então aplicados 100 µL do conjugado anti-mouse peroxidase na  
1104 proporção de 1:10.000. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Para a etapa de revelação foi  
1105 utilizado OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) diluído em 20 mL de água destilada e 95 µL  
1106 foram aplicados em cada poço ficando sob incubação em temperatura ambiente no escuro. A reação  
1107 foi parada após 20 minutos utilizando 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 3 N. A leitura foi realizada  
1108 a 490 nm (Crowther, 2002).

1109 A análise para detecção das subclasses IgG1 e IgG2a foi realizada tendo como base o protocolo  
1110 descrito anteriormente para IgG total. Exceto que, os anticorpos biotinilados anti-IgG1 e anti-IgG2a  
1111 de camundongos foram utilizados a 1:500, o bloqueio foi feito com 10% de Soro Fetal Bovino e o  
1112 conjugado Avidina-Peroxidase foi diluído na proporção 1:2.000 sendo aplicado 100 µL por poço.

1113 **Avaliação da resposta imune celular.** Para análise da detecção de citocinas os animais foram  
1114 eutanasiados para retirada do baço quatorze dias após a última inoculação, nesta etapa foi utilizado  
1115 o sobrenadante do cultivo de esplenócitos, para tanto, células esplênicas foram cultivadas *in vitro* e  
1116 estimuladas com a proteína recombinante. O baço de cada animal foi macerado em 2 mL de RPMI  
1117 (Roswell Park Memorial Institute (Sigma-Aldrich) base e centrifugados a 18.540 g por 10 minutos a  
1118 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de RPMI (Roswell

1119 Park Memorial Institute (Sigma-Aldrich) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. Para  
1120 contagem das células foi utilizado Azul de Tripán 0,4%. As células foram plaqueadas com  $2 \times 10^6$   
1121 células por poço, sendo que os estímulos foram preparados utilizando a proteína na concentração  
1122 de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  e a Concanavalina A na concentração de  $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ . As células foram cultivadas por 48  
1123 horas a  $37^\circ\text{C}$ , a 5% de  $\text{CO}_2$  em atmosfera úmida. Após a incubação as células foram transferidas para  
1124 tubos do tipo Eppendorf® e centrifugado a  $18.540 g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes foram  
1125 transferidos para tubos com capacidade para  $500 \mu\text{L}$  como triplicatas e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$   
1126 (Atzingen et al, 2014). A avaliação da produção de citocinas foi realizada por meio de Ensaio  
1127 Imunoadsorção Enzimática (ELISA) como recomendado pelo fabricante (BD Bioscience). A placa foi  
1128 sensibilizada com o anticorpo de captura de  $\text{IFN-}\gamma$  na proporção 1:250 e tampão  
1129 carbonato/bicarbonato  $0,05 \text{ M}$  pH 9,6. Cada poço da placa recebeu  $100 \mu\text{L}$  do anticorpo de captura  
1130 de  $\text{IFN-}\gamma$  diluído em tampão, incubado a  $4^\circ\text{C}$  por aproximadamente 16 horas. As placas foram  
1131 lavadas 5x com PBS 1X e Tween 20% (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,05% e incubado a  
1132 temperatura ambiente em câmara úmida, por 1 hora com  $200 \mu\text{L}$  por poço de PBS 1X contendo Soro  
1133 Fetal Bovino 10% para bloqueio. O padrão de  $\text{IFN-}\gamma$  foi diluído em de Soro Fetal Bovino a 10%,  
1134 ficando com concentração final de  $2.000 \text{ pg}/\text{mL}$ . A curva-padrão foi preparada em diluição seriada.  
1135 Após a lavagem das placas com PBS 1X e Tween 20% (Sigma-Aldrich), os soro negativo e positivo  
1136 foram diluídos, aplicados de forma seriada em placas distintas sendo incubados por 2 horas a  
1137 temperatura ambiente em câmara úmida. Após esse tempo foram realizadas 5 lavagens com PBS  
1138 1X Tween 20% (Sigma-Aldrich). O anticorpo de detecção foi preparado na proporção de 1:250 com  
1139 PBS 1X e de Soro Fetal Bovino 10% e esta preparação foi utilizada para diluir a Streptavidina  
1140 Peroxidase na proporção 1:250, sendo aplicado  $100 \mu\text{L}$  do conjugado diluído em cada poço. As  
1141 placas foram incubadas a temperatura ambiente em câmara úmida por 1 hora e após foram feitas  
1142 10 lavagens com PBS 1X e Tween 20% (Sigma-Aldrich). Para a etapa de revelação foi utilizado OPD  
1143 (o-phenylenediamine dihydrochloride) diluído em  $20 \text{ mL}$  de água destilada e aplicado  $95 \mu\text{L}$  em  
1144 cada poço ficando sob incubação em temperatura ambiente no escuro. A reação foi parada após 20  
1145 minutos utilizando  $50 \mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 3 N. A leitura foi realizada a  $490 \text{ nm}$ . Para o  
1146 ELISA de captura para IL-10, foi realizado protocolo semelhante, com exceção do anticorpo IL-10,  
1147 diluído em tampão fosfato  $0,2 \text{ M}$  pH 6,5, que foi utilizado na proporção de 1:250 para sensibilizar a  
1148 placa. O anticorpo de detecção foi diluído em Soro Fetal Bovino na proporção de 1:250.

1149 **Análise Estatística.** A análise estatística foi realizada usando software Graph-Pad prism versão  
1150 6.0 para Windows. Comparação múltipla entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA seguido  
1151 pelo pós teste de Tukey com múltiplas comparações.

1152

1153

## RESULTADOS

1154 **Produção do DNA quimérico pcDNA3.1anabab.** O gene quimérico, denominado *anabab*,  
1155 construído sinteticamente, capaz de codificar uma proteína com domínios hidrofílicos e  
1156 antigênicos, e inserido em plasmídeo de expressão em eucarioto pcDNA3.1A foi analisado por meio  
1157 de digestão com enzima de restrição KPN I (Sigma-Aldrich) e resultou na linearização do

1158 plasmídeo recombinante. O gene *anabab* foi preparado para conter 1287 pares de bases. Assim, sua  
1159 inserção no plasmídeo pcDNA3.1A resultou em uma molécula plasmídeo de 6.703 pares de bases.

1160 **Produção da proteína quimérica ANABABr.** A mesma estratégia de clonagem foi  
1161 utilizada para a construção do plasmídeo quimérico pET28a/*anabab* com a finalidade de produção  
1162 da proteína quimérica ANABAB. Por meio da expressão do gene sintético em células procarióticas  
1163 foi verificada a funcionalidade do plasmídeo recombinante pela produção de uma proteína com  
1164 massa molecular aproximada de 47 kDa (Fig. 2).

1165 O tamanho da proteína produzida foi compatível com o tamanho previsto por análise *in*  
1166 *sílico* (servidor on line *PROPPRED/Software Protean – DNA Star*). A purificação da proteína  
1167 utilizando cromatografia de afinidade pelo níquel foi confirmada pela interação de anticorpos anti-  
1168 His com a cauda de histidina presente na proteína recombinante (Fig. 3).

1169 **Avaliação da resposta imune humoral.** Os animais pertencentes aos grupos que receberam as  
1170 injeções pcDNA3.1A/*anabab* seguido de booster de ANABAB recombinante e ANABAB/Montanide  
1171 produziram anticorpos IgG específicos para ANABAB com valores de absorvância acima do *cut-off* e  
1172 esta produção foi significativamente diferente quando comparada aos demais grupos. O grupo  
1173 pcDNA3.1A/*anabab* não apresentou produção de anticorpo detectável, ficando a média das  
1174 absorvâncias dos soros dos animais presentes nesse grupo abaixo da linha de corte (Fig. 4).

1175 Os animais dos grupos que responderam positivamente a análise de IgG total foram  
1176 avaliados para as subclasses IgG1 e IgG2a. Como resultado desta avaliação foi observado que houve  
1177 produção de anticorpos IgG1 específico para ANABAB nos dois grupos testados, sendo que esta  
1178 produção foi maior no grupo ANABAB/Montanide que no grupo injetado com pcDNA3.1A/*anabab*  
1179 seguido de *booster* de ANABAB recombinante. Resultado semelhante foi obtido quanto à produção  
1180 de anticorpos IgG2a específico. Aparentemente, a produção de IgG1 foi superior a produção de  
1181 IgG2a nos dois grupos testados (Fig. 5).

1182 **Avaliação da resposta imune celular.** A produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, foi avaliadas por ELISA de  
1183 captura, a partir dos sobrenadantes do cultivo de esplenócitos estimulados com ANABAB  
1184 recombinante. Todos os grupos produziram essas citocinas quando reestimulados *in vitro* (dados  
1185 não mostrados), sendo que o grupo controle pcDNA3.1 apresentou uma produção muito elevada de  
1186 IFN- $\gamma$  e o grupo controle Montanide apresentou uma produção muito elevada de IL-10. É possível  
1187 que contaminantes da preparação protéica (proteínas de *E. coli* ou endotoxinas) tenham  
1188 contribuído para este resultado. Pensando desta forma, o mesmo evento poderia acontecer com os  
1189 demais grupos podendo até mesmo potencializar a resposta dos mesmos, no entanto isso não  
1190 acontece. Com os valores obtidos, não houve diferença na produção destas citocinas entre os  
1191 grupos testados.

1192

1193

## DISCUSSÃO

1194 A terapia empregada em animais acometidos com TPB não os protege de futuras infecções  
1195 pelos mesmos agentes. O uso de quimioterápicos, antibióticos (Silva et al. 2017) e vacinas vivas são  
1196 alternativas em caso de ocorrência de surtos, no entanto, podem onerar custos e resistência de  
1197 microrganismos. Em relação à vacina viva, esta pode ser uma alternativa a prevenção de casos

1198 clínicos, embora apresente desvantagens relacionadas à segurança, ao método de produção e  
1199 durante o manuseio (Kocan et al. 2003; Kocan et al. 2010; Florin-Christensen et al. 2014). Uma  
1200 alternativa de imunização seria pela construção de uma molécula de DNA quimérico e sua  
1201 clonagem em laboratório, porém a execução da técnica pode ser dispendiosa e ainda ter custo  
1202 elevado (Gohil et al. 2013). No entanto a aquisição desta construção por meio de empresas  
1203 comerciais pode deixar o processo mais rápido e ainda compensar o custeio onerado com a  
1204 aquisição do mesmo, uma vez que pode ser replicado com facilidade por meio de transformação em  
1205 células competentes (Gohil et al. 2013). Utilizando estas estratégias, pesquisas avançam em torno  
1206 de genotipagem, antígenos de membrana, antígenos quiméricos e adjuvantes, que já demonstraram  
1207 ser eficientes para a modulação de uma resposta imune efetiva (Ortiz et al. 2016). Neste contexto, a  
1208 proteína quimérica ANABAB foi elaborada para ter alto potencial imunogênico devido a presença  
1209 de epitopos selecionados a partir da análise de proteínas conservadas de *Anaplasma marginale* e  
1210 *Babesia sp.* (Castelão et al. 2013). Em trabalhos realizados por esse mesmo grupo de pesquisa a  
1211 proteína quimérica recombinante ANABAB interagiu com anticorpos de bovinos naturalmente  
1212 infectados por *Anaplasma* e *Babesia* quando testado pela técnica de ELISA demonstrando dessa  
1213 forma que a antigenicidade da proteína recombinante quimérica foi mantida (Gomes 2015).

1214 A construção de um sistema imune eficiente contra *A. marginale* depende da ação de  
1215 mecanismos humorais e celulares (Araújo et al. 2003). Na ocasião da invasão do organismo do  
1216 hospedeiro pelos agentes envolvidos na TPB ocorre o desenvolvimento e instalação do mesmo. As  
1217 proteínas presentes na superfície do patógeno podem desempenhar papel crucial na facilitação da  
1218 invasão, remodelação das células do hospedeiro, aquisição de nutrientes, eliminação de resíduos e  
1219 detecção contra mecanismo de defesa inatos. Essas proteínas de superfície do patógeno direcionam  
1220 a uma resposta imune do tipo humoral e podem, também, ativar uma resposta a partir de linfócitos  
1221 T efetores (Man et al. 2017) com ativação de células CD4+, produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , estimulando  
1222 a ação de macrófagos e a produção de óxido nítrico (Brown et al. 1998; Lopez et al. 2007). A  
1223 citocina INF-  $\gamma$  atua, também, sobre a produção de linfócitos T estimulando uma resposta do tipo  
1224 Th1, com a produção de IgG2 (Lopez et al. 2007; Ortiz et al. 2016), que tem ação relacionada a  
1225 opsonização, fagocitose e neutralização dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*. Nas análises para  
1226 avaliação da resposta imune induzida com imunização utilizando proteína associada a adjuvante  
1227 (ANABABr+Montanide ISA 70) e *primer/booster* (pcDNAanabab + *booster* ANABABr) a resposta  
1228 observada foi predominantemente do tipo Th2 com predomínio de isotipo IgG1.

1229 Vacinas protéicas em geral possuem baixo potencial imunogênico sendo necessária sua  
1230 associação a componentes que possam melhorar a eficiência da resposta imunológica. Neste  
1231 contexto, os adjuvantes são fortes aliados na modulação de uma resposta imune por agir como um  
1232 agente inflamatório recrutando células apresentadoras de antígenos – APCs (Klimka et al. 2015)  
1233 com liberação de citocinas e infiltração de leucócitos (Vitoriano-Souza et al. 2012) que podem  
1234 reconhecer patógenos e desencadear a ativação de células T pela apresentação de antígenos via  
1235 MHC (Banchereau & Steinman 1998). A capacidade da indução de fatores quimiotáticos, citocinas  
1236 pró-inflamatórias e modulação de resposta Th1 ou Th2 está diretamente relacionada à eficiência da  
1237 ação dos adjuvantes, de modo a construir uma resposta imune específica (Batista-Duarte et al.

1238 2013). Outros potenciais estimuladores de resposta imune estão relacionados a proteínas de  
1239 membrana, as diversas vias de administração (Haeberlein et al. 2017), imunizações do tipo *primer-*  
1240 *booster* e a utilização de nanopartículas como forma eficiente da entrega do antígeno (Akbari & Wu  
1241 2016). Em se tratando de vacina de DNA, as nanocapsulas permitiriam a obtenção de resultados  
1242 positivos e eficácia na obtenção de uma resposta imune, como observada na imunização de  
1243 antígenos proteicos (Zhao et al. 2011).

1244

1245

#### CONSIDERAÇÕES

1246

1247

1248

A utilização da proteína quimérica recombinante induz resposta imune humoral do tipo IgG,  
quer pelo uso do protocolo de imunização com proteína/Montanide ou injeção inicial de DNA  
seguido de *booster* com proteína.

1249

1250

1251

1252

Em repetidas ocasiões, a injeção de DNA *naked* não induz resposta imune humoral que seja  
detectável. Assim, pode ser necessária a utilização de mecanismos facilitadores de entrega e de  
proteção dessa molécula, como por exemplo a utilização de nanocarreadores, para garantir a  
produção da proteína e indução de resposta imune.

1253

1254

#### AGRADECIMENTOS

1255

1256

1257

1258

À FUNDECT pelo apoio financeiro necessário para aquisição dos animais e todo material  
envolvido nas análises, como também pela concessão da bolsa de mestrado. À EMBRAPA Gado de  
Corte pela estrutura concedida para o desenvolvimento deste trabalho e aos colaboradores  
envolvidos em todas as etapas desta pesquisa.

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

## REFERÊNCIAS

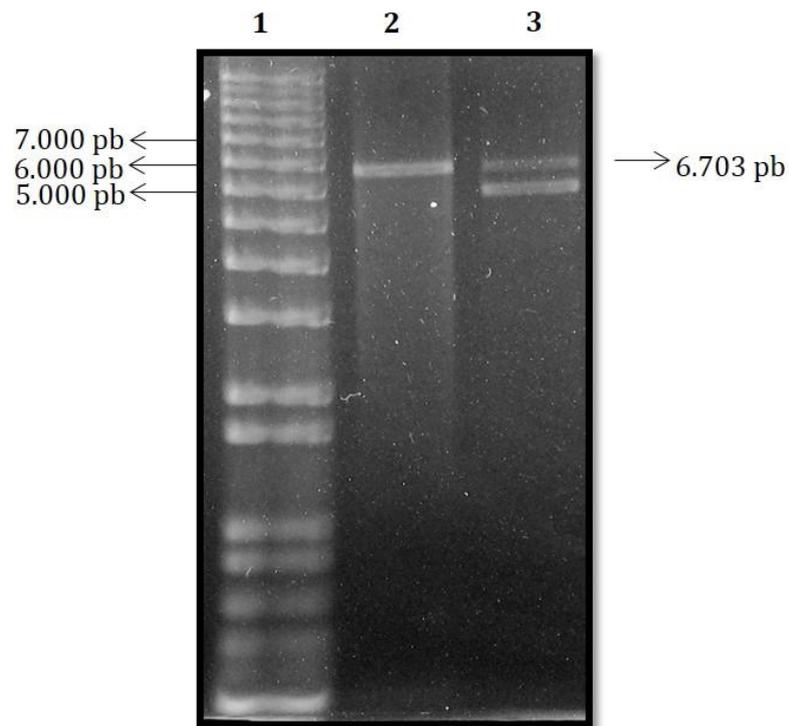
- 1278  
1279
- 1280 Akbari A. & Wu J. 2016. Cruciferin coating improves the stability of chitosan nanoparticles at low  
1281 pH. *J Mater Chem B* 4:4988–5001. doi: 10.1039/C6TB00415F
- 1282 Andreotti R. & Koller W.W. 2013. Carrapatos no Brasil, 1st edn. Embrapa, Brasília
- 1283 Araújo F.R., Costa C.M., Ramos C.A., Farias T.A., Souza I.I.F., Melo E.S., Elisei C., Rosinha G.M.S., Soares  
1284 C.O., Fragoso S.P. & Fonseca A.H. 2008. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected  
1285 with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9,  
1286 VirB10, and elongation factor-Tu. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro* 103:186–190.
- 1287 Araújo F.R., Madruga C.R., Soares C.O. & Kessler R.H. 2003. Progressos na imunização contra  
1288 *Anaplasma marginale*.
- 1289 Banchereau J. & Steinman R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–  
1290 252. doi: 10.1038/32588
- 1291 Batista-Duharte A., Portuondo D., Carlos I.Z. & Pérez O. 2013. An approach to local immunotoxicity  
1292 induced by adjuvanted vaccines. *Int Immunopharmacol* 17:526–536. doi:  
1293 10.1016/J.INTIMP.2013.07.025
- 1294 Brown W.C., Zhu D., Shkap V., McGuire T.C., Blouin E.F., Kocan K.M. & Palmer G.H. 1998. The  
1295 repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4(+) T-lymphocyte clones from  
1296 protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and  
1297 MSP-3. *Infect Immun* 66:5414–22.
- 1298 Castelão A.B.C., Araújo F.R., Santos L.R., Ramos C.A.N., Elisei C., Rosinha G.M.S. & Soares C.O. 2013.  
1299 Caracterização da imunogenicidade das proteínas recombinantes Virb9, Virb10 e fator termo  
1300 instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma marginale* em camundongos. *Brazilian J Vet*  
1301 *Res Anim Sci* 49:377. doi: 10.11606/issn.2318-3659.v49i5p377-385
- 1302 De Vos A.J. 1992. Distribution, economic importance and control measures for *Babesia* and  
1303 *Anaplasma*. In: T.T. Dolan (ed) *Recent Developments in the Control of Anaplasmosis,*  
1304 *Babesiosis and Cowdriosis.* The International Laboratory for Reserach on Animal Diseases,  
1305 Nairobi,
- 1306 Figueroa J.V., Chieves L.P., Johnson G.S. & Buening G.M. 1992. Detection of *Babesia bigemina*-  
1307 infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 30:2576–82.
- 1308 Florin-Christensen M., Suarez C.E., Rodriguez A.E., Flores D.A. & Schnittger L. 2014. Vaccines against  
1309 bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology* 141:1563–1592.  
1310 doi: 10.1017/S0031182014000961
- 1311 Foil L.D. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today* 5:88–96. doi: 10.1016/0169-  
1312 4758(89)90009-4
- 1313 Fonseca A. & Braga A. 1923. Noções sobre a tristeza, parasitaria dos bovinos.
- 1314 G. Silva M., Knowles D.P., Antunes S., Domingos A., Esteves M.A. & Suarez C.E. 2017. Inhibition of the  
1315 in vitro growth of *Babesia bigemina*, *Babesia caballi* and *Theileria equi* parasites by trifluralin  
1316 analogues. *Ticks Tick Borne Dis* 8:593–597. doi: 10.1016/J.TTBDIS.2017.04.002
- 1317 Gimenez G., Belaunzarán M.L., Magalhães K.G., Poncini C.V., Lammel E.M., González Cappa S.M.,

- 1318 Bozza P.T. & Isola E.L.D. 2016. Involvement of TLR6 in the induction of COX-2, PGE2 and IL-10  
1319 in macrophages by lipids from virulent S2P and attenuated R1A *Babesia bovis* strains. Vet  
1320 Parasitol 223:127–132. doi: 10.1016/J.VETPAR.2016.04.033
- 1321 Gohil S., Herrmann S., Günther S. & Cooke B.M. 2013. Bovine babesiosis in the 21st century:  
1322 Advances in biology and functional genomics. Int J Parasitol 43:125–132. doi:  
1323 10.1016/J.IJPARA.2012.09.008
- 1324 Gomes J.S. 2015. Produção e avaliação preliminar de uma proteína recombinante quimérica para  
1325 uso no controle de Tristeza parasitária bovina (TPB).
- 1326 Gonçalves P.M. 2000. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do  
1327 Brasil. Ciência Rural 30:187–194.
- 1328 Green M.R., Michael R. & Sambrook J. 2012. Molecular cloning : a laboratory manual, 4th edn. Cold  
1329 Spring Harbor Laboratory Press
- 1330 Haeberlein S., Chevalley-Maurel S., Ozir-Fazalalikhani A., Koppejan H., Winkel B.M.F., Ramesar J.,  
1331 Khan S.M., Sauerwein R.W., Roestenberg M., Janse C.J., Smits H.H. & Franke-Fayard B. 2017.  
1332 Protective immunity differs between routes of administration of attenuated malaria parasites  
1333 independent of parasite liver load. Sci Rep. doi: 10.1038/s41598-017-10480-1
- 1334 Ortiz J.M., Molinari M.P., Gravisaco M.J., Paoletta M.S., Montenegro V.N. & Wilkowsky S.E. 2016.  
1335 Evaluation of different heterologous prime–boost immunization strategies against *Babesia*  
1336 *bovis* using viral vectored and protein-adjuvant vaccines based on a chimeric multi-antigen.  
1337 Vaccine 34:3913–3919. doi: 10.1016/J.VACCINE.2016.05.053
- 1338 Kessler R.H., Oliveira C., Madruga C., Araújo F.R. & Grande C. 2002. Tristeza Parasitária dos Bovinos:  
1339 Quando Vacinar é Preciso.
- 1340 Klimka A., Michels L., Glowalla E., Tosetti B., Krönke M. & Krut O. 2015. Montanide ISA 71 VG is  
1341 Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice.  
1342 Scand J Immunol 81:291–297. doi: 10.1111/sji.12279
- 1343 Kocan K.M., De la Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F. & Ewing S.A. 2010. The natural history of  
1344 *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol 167:95–107. doi: 10.1016/J.VETPAR.2009.09.012
- 1345 Kocan K.M., De la Fuente J., Guglielmone A.A. & Meléndez R.D. 2003. Antigens and Alternatives for  
1346 Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. Clin Microbiol Rev 16:698–712. doi:  
1347 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003
- 1348 Lopez J.E., Palmer G.H., Brayton K.A., Dark M.J., Leach S.E. & Brown W.C. 2007 Immunogenicity of  
1349 *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane  
1350 vaccine. Infect Immun 75:2333–42. doi: 10.1128/IAI.00061-07
- 1351 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin  
1352 phenol reagent.
- 1353 Madruga C., Kessler R., Sacco A. & Jesus E. 1986. Producao de antígeno e análise preliminar do teste  
1354 de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*.
- 1355 Man S., Fu Y., Guan Y., Feng M., Qiao K., Li X., Gao H. & Cheng X. 2017. Evaluation of a Major Surface  
1356 Antigen of *Babesia microti* Merozoites as a Vaccine Candidate against *Babesia* Infection. Front  
1357 Microbiol 8:2545. doi: 10.3389/fmicb.2017.02545

- 1358 Marana E.R.M., Alfieri A.A., Andrade G.M., Freire R.L., Garcia J.L. & Vidotto O. 2006. Comparação dos  
1359 testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e  
1360 ELISA por competição para a detecção de anticorpos contra o *Anaplasma marginale* em soros  
1361 de bovinos de diferentes áreas enzoóticas. Semin Ciências Agrárias 27:629. doi:  
1362 10.5433/1679-0359.2006v27n4p629
- 1363 Riding G., Hope M., Waltisbuhl D. & Willadsen P. 2003. Identification of novel protective antigens  
1364 from *Anaplasma marginale*. Vaccine 21:1874–1883. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00004-5
- 1365 Rikihisa Y., Zhang C. & Christensen B.M. 2003. Molecular Characterization of Aegyptianella  
1366 pullorum (Rickettsiales, Anaplasmataceae). J Clin Microbiol 41:5294–5297. doi:  
1367 10.1128/JCM.41.11.5294-5297.2003
- 1368 Junior S.G.D., Araújo F.R., Almeida Junior N.F., Adi S.S., Cheung L.M., Fragoso S.P., Ramos C.A.,  
1369 Oliveira R.H.M., Santos C.S., Bacanelli G., Soares C.O., Rosinha G.M.S. & Fonseca A.H. 2010.  
1370 Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. Mem Inst  
1371 Oswaldo Cruz 105:843–849. doi: 10.1590/S0074-02762010000700001
- 1372 Souza J.C.P., Massard C.L., Soares C.O., Patarroyo J.H., Fonseca A.H. & Souza E.C.D. 2000. Avaliação do  
1373 uso de cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *bigemina* associadas a amostra virulenta de  
1374 *Anaplasma marginale* na premunicação de bovinos da raça holandesa. Rev Ciências da Vida  
1375 22:09–15.
- 1376 Vitoriano-Souza J., Moreira N.D., Teixeira-Carvalho A., Carneiro C.M., Siqueira F.A.M., Vieira P.M.A.,  
1377 Giunchetti R.C., Moura S.A.L., Fujiwara R.T., Melo M.N. & Reis A.B. 2012. Cell Recruitment and  
1378 Cytokines in Skin Mice Sensitized with the Vaccine Adjuvants: Saponin, Incomplete Freund's  
1379 Adjuvant, and Monophosphoryl Lipid A. PLoS One 7:e40745. doi:  
1380 10.1371/journal.pone.0040745
- 1381 Zhao K., Shi X., Zhao Y., Wei H., Sun Q., Huang T., Zhang X. & Wang Y. 2011. Preparation and  
1382 immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan  
1383 nanoparticles. Vaccine 29:8549–8556.
- 1384
- 1385
- 1386
- 1387
- 1388
- 1389
- 1390
- 1391
- 1392
- 1393
- 1394

## FIGURAS

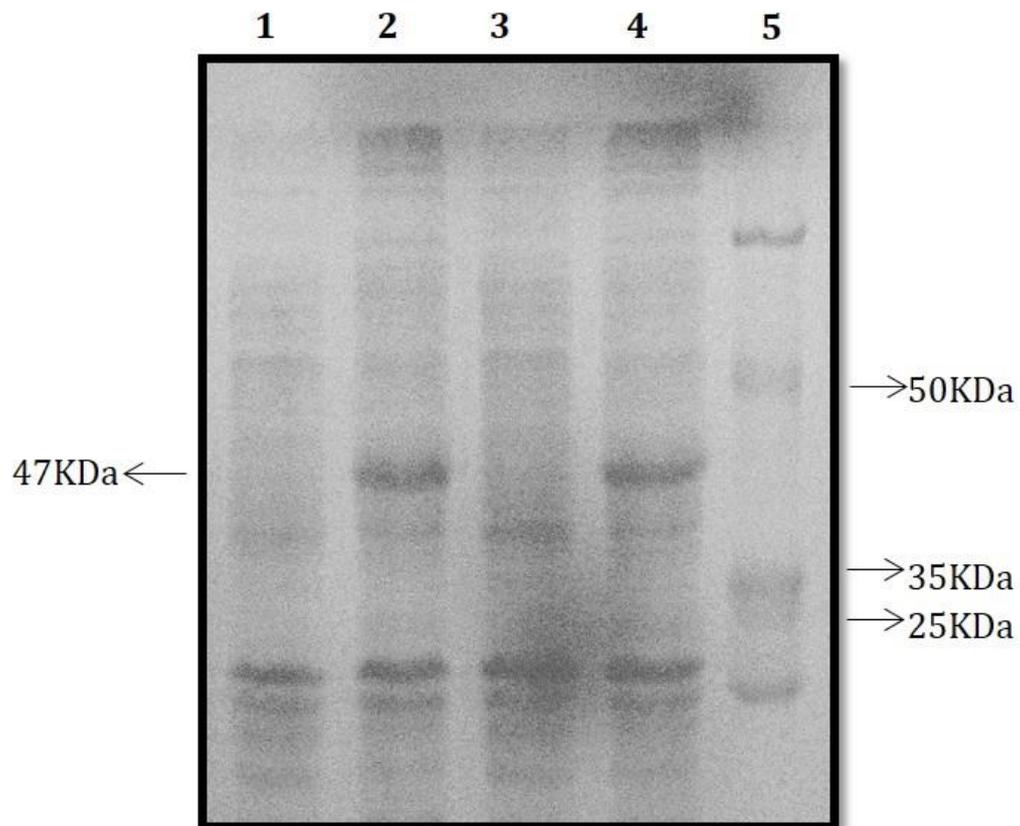
1395  
1396  
1397  
1398  
1399  
1400  
1401



1402  
1403  
1404  
1405  
1406  
1407  
1408  
1409  
1410  
1411  
1412  
1413  
1414  
1415  
1416  
1417

Fig.1. Análise da inserção do DNA quimérico *anabab* em pcDNA3.1A. por digestão enzimática com enzima de restrição em gel de agarose a 0,8%. **(1)** Marcador Molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen®), **(2)** pcDNA3.1A/*anabab* linearizado após digestão com KPN I (6.703 pb) e **(3)** pcDNA3.1A/*anabab* circular.

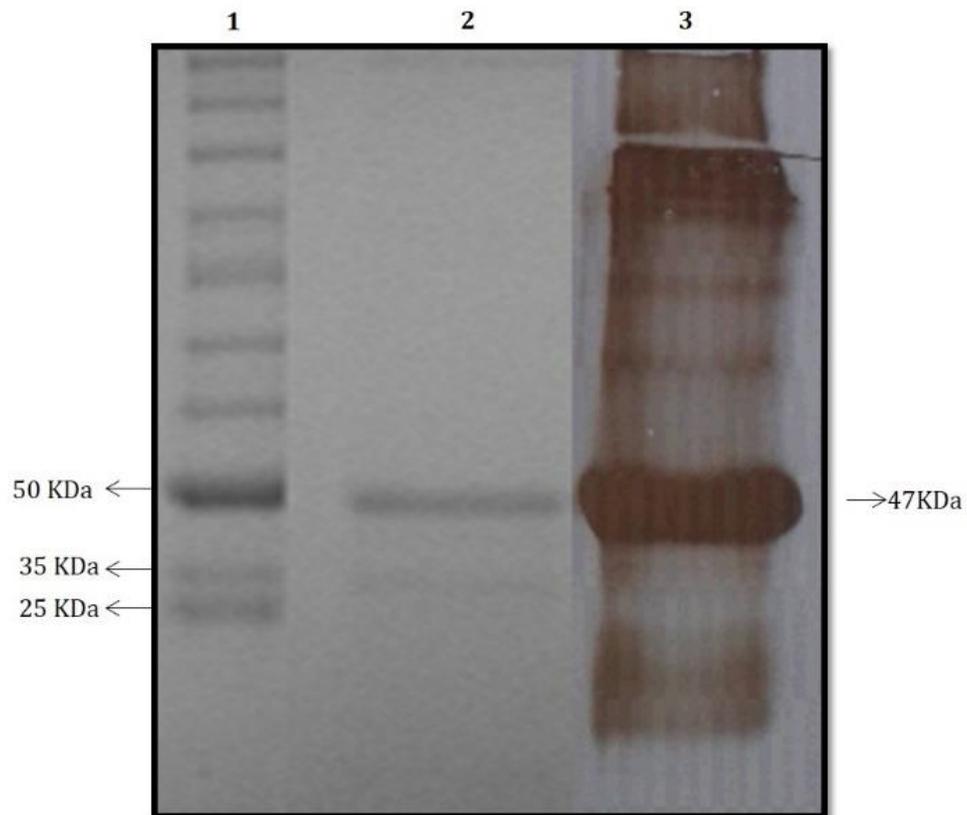
1418  
1419  
1420  
1421  
1422



1423  
1424  
1425  
1426  
1427  
1428  
1429  
1430  
1431  
1432  
1433  
1434  
1435  
1436  
1437

Fig.2. Avaliação da indução da proteína quimérica ANABAB em *E.coli* da linhagem *Rosetta* após indução com IPTG. **(1 e 3)** Lisado total de *E. coli* pcDNA3.1A/*anabab* antes da indução; **(2 e 4)** Lisado total de *E. coli* pcDNA3.1A/*anabab* após 3 horas de indução com IPTG. **(5)** Marcador de Peso Molecular [Broad Range Protein Molecular Weight Marker (Promega®)]. Análise realizada por SDS-PAGE 12%.

1438  
1439  
1440  
1441  
1442



1443  
1444 Fig. 3. Avaliação da purificação da proteína quimérica ANABAB após processo em coluna de níquel  
1445 ProBond®. **(1)** Análise em SDS-PAGE 12%, Marcador Molecular Promega®. **(2)** Análise em SDS-  
1446 PAGE 12%, Proteína quimérica ANABAB purificada. **(3)** *Western blot* da proteína quimérica  
1447 ANABAB purificada utilizando anti-corpo anti-His.

1448  
1449  
1450  
1451  
1452  
1453  
1454  
1455  
1456  
1457  
1458  
1459

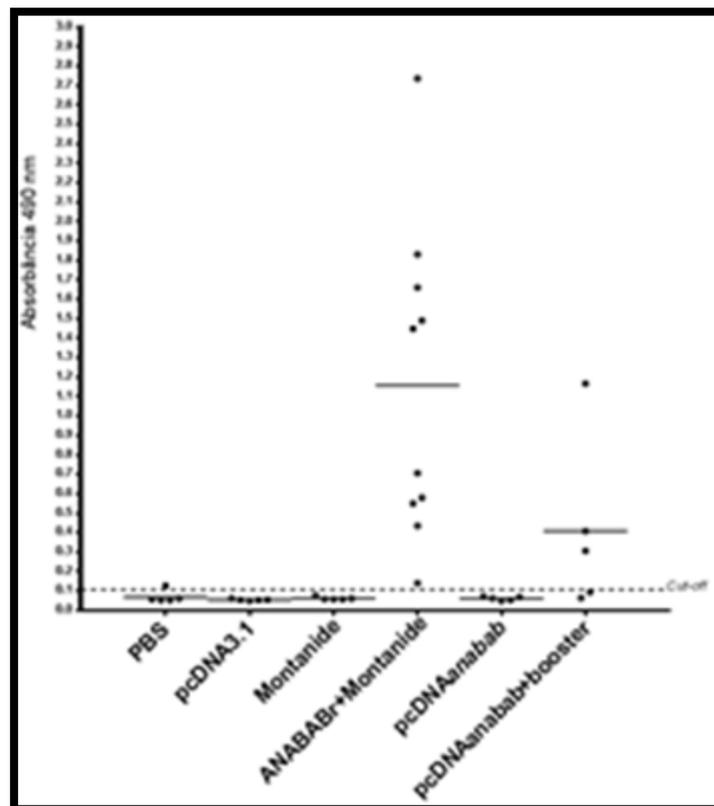
1460

1461

1462

1463

1464



1465

1466

1467 Fig. 4. Produção de IgG total específica contra ANABAB em camundongos BALB/c. As injeções  
 1468 (intramuscular - 3 doses) foram feitas utilizando PBS (10 animais), pcDNA3.1A (5 animais),  
 1469 Adjuvante Montanide (10 animais), ANABABr + adjuvante Montanide (5 animais),  
 1470 pcDNA3.1A/*anabab* (5 animais) e pcDNA3.1A/*anabab* + *booster* ANABABr (5 animais) e analisadas  
 1471 pelo método de ELISA indireto. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA com pós-  
 1472 teste de Tukey utilizando múltiplas comparações.

1473

1474

1475

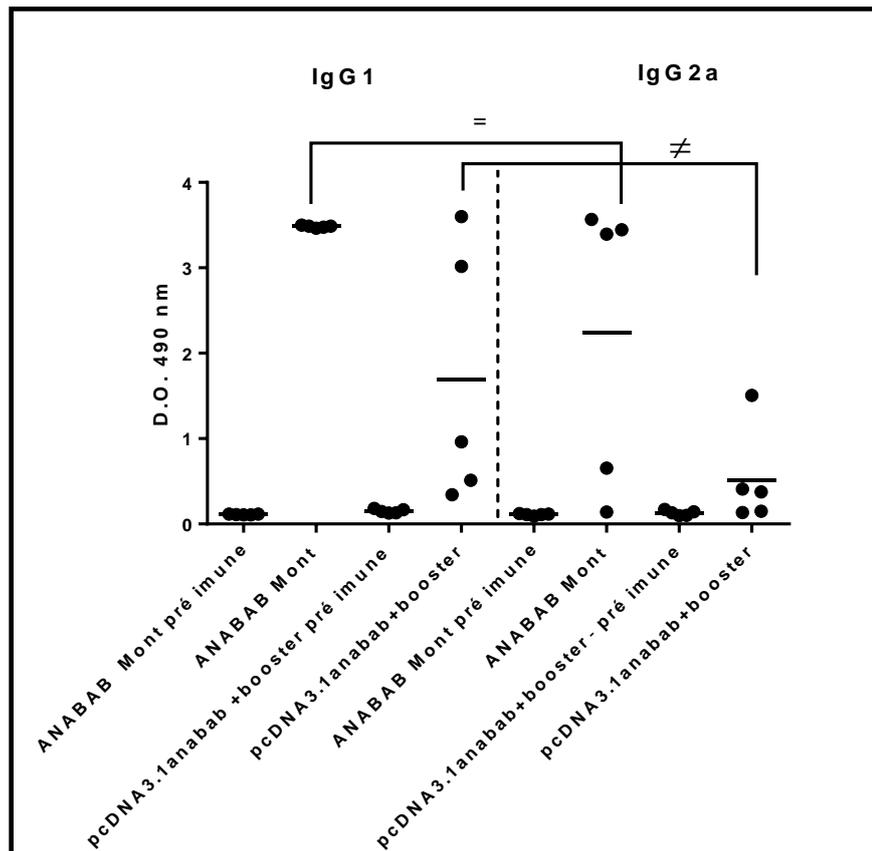
1476

1477

1478

1479

1480



1481

1482 g. 5. Produção de IgG1 e IgG2a específica contra ANABAB em camundongos BALB/c. Os animais  
 1483 foram injetados (intramuscularmente – 3 doses) com a proteína quimérica ANABAB/Montanide (5  
 1484 animais) e pcDNA3.1A/*anabab* /*booster* proteína ANABAB (5 animais). ELISA indireto foi realizado  
 1485 em placas adsorvidas com ANABAB e anticorpos anti IgG1 e anti IgG2a de camundongo foram  
 1486 utilizados em etapa posterior. Soro pré-imune dos grupos testados foram utilizados como controle.  
 1487 Somente os grupos que tiveram produção de IgG total foram avaliados para as subclasses. A análise  
 1488 estatística foi realizada com teste de ANOVA e pós-teste de Tukey com múltiplas comparações.

1489