

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS
PROTEÍNAS RECOMBINANTES VIRB9, VIRB10 E FATOR
TERMO INSTÁVEL DE ELONGAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE
Anaplasma marginale EM CAMUNDONGOS**

*Characterization of the immunogenicity of recombinant proteins VirB9, VirB10 and
Elongation Factor Tu of Anaplasma marginale in mice*

Ana Beatriz Canevari Castelhão

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS
PROTEÍNAS RECOMBINANTES VIRB9, VIRB10 E FATOR
TERMO INSTÁVEL DE ELONGAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE
Anaplasma marginale EM CAMUNDONGOS**

*Characterization of the immunogenicity of recombinant proteins VirB9, VirB10 and
Elongation Factor Tu of Anaplasma marginale in mice*

Ana Beatriz Canevari Castelhão

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Coorientadora: Dra. Lenita Ramires dos Santos

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012

Esta página será fornecida pela secretaria do curso.

A Felicidade exige Valentia

Augusto Cury (2003)

*Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes mas,
não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo, e posso
evitar que ela vá à falência.*

*Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os
desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da
própria história.*

*É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis
no recôndito da sua alma.*

*É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da Vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um "não".
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.*

*Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...*

Aos meus pais Marta e Clóvis por
sempre estarem ao meu lado, pelo
carinho, dedicação, paciência,
incentivo, compreensão... por sempre
investirem na minha formação e
principalmente por me ensinarem o
verdadeiro sentido da vida: o amor,
A vocês agradeço por tudo que sou!

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, meu orientador, pelos ensinamentos, auxílio, tolerância, convívio e amizade.

Em especial, a Dra. Lenita Ramires dos Santos, coorientadora, não apenas por sua orientação segura, mas principalmente pela paciência, dedicação, incentivo, exemplo profissional e ensinamentos a mim dedicados durante toda esta jornada.

A toda equipe do laboratório de Imunologia da Embrapa Gado de Corte pelo carinho com que me receberam, amizade que construímos e pelo conhecimento a mim compartilhado.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico, administrativo e pessoal.

A Embrapa Gado de Corte e seus funcionários pelo agradável convívio e possibilidade de realização deste trabalho, em especial, ao técnico Renato Oliveira Marçal.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo financiamento deste trabalho (Processo número 23/200.062/2008) e pela bolsa de mestrado (Edital 015/2009).

A todos vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	10
REFERÊNCIAS	13
A Vacinação no Controle da Anaplasmosse Bovina.....	15
RESUMO	16
INTRODUÇÃO.....	17
MÉTODOS DE CONTROLE	19
VACINAS CONTRA ANAPLASMOSE	19
Vacinas de Primeira Geração	20
Vacinas de Micro-Organismos Mortos	20
Vacinas de Micro-Organismos Vivos	21
Avanços e Perspectivas no Desenvolvimento de Vacinas Contra <i>Anaplasma marginale</i>	23
Resposta Imune Contra <i>Anaplasma marginale</i>	23
Mecanismos de Evasão da Riquétsia ao Sistema Imune do Hospedeiro	25
Vacinas Derivadas de Proteínas de Membrana.....	27
<i>Proteínas Principais de Superfície</i>	28
<i>Novas proteínas</i>	28
Imunização Utilizando <i>Anaplasma marginale</i> Proveniente de Cultivo Celular	32
Vacinas de DNA	33
Interrupção dirigida de genes em <i>Anaplasma marginale</i>	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35
Caracterização da Imunogenicidade das Proteínas Recombinantes Virb9, Virb10 e Fator	
Termo Instável de Elongação de Peptídeos de <i>Anaplasma marginale</i> em Camundongos.....	45
Resumo	46
Summary.....	46
Introdução.....	47
Materiais e Métodos	48
Produção e Purificação de rVirB9, rVirB10, rEF-Tu de <i>Anaplasma marginale</i>	48

Imunização dos Camundongos	49
Avaliação da Resposta Imune Humoral	49
Avaliação da Resposta Imune Celular	50
Análise Estatística	50
Resultados.....	50
Discussão	52
Conclusões.....	53
Referências	54
Figuras	56

RESUMO

CASTELÃO A. B. C. *Caracterização da imunogenicidade das proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos de Anaplasma marginale em camundongos*. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

Considerando as limitações dos atuais métodos de controle contra a anaplasmoze bovina, o desenvolvimento de uma vacina efetiva se faz necessário. A partir do advento da análise genômica e proteômica novas proteínas de membrana de *Anaplasma marginale* foram identificadas como possíveis candidatas a componentes de uma vacina. Entre elas estão VirB9, VirB10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos (EF-Tu). Embora estas proteínas ainda não estejam bem caracterizadas na membrana de *A. marginale*, a produção destas na forma recombinante (rVirB 9, rVirB10 e rEF-Tu) foi realizada, mas as mesmas ainda não foram exploradas em formulações vacinais. Neste trabalho avaliou-se o uso de rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu como imunógenos em camundongos emulsionadas em adjuvante Montanide. Nas condições testadas verificou-se a indução de forte resposta imune humoral com a produção de IgG1 e IgG2a. Esplenócitos de 50% dos animais, que foram injetados com rVirB9, produziram Interferon-gama acima do limite de detecção, sinalizando assim indícios de resposta imune celular específica para esta proteína. Desta forma, verificou-se que é possível utilizar tais proteínas para indução de resposta imune específica, particularmente do tipo humoral. Assim, novas avaliações necessitam ser realizadas com a finalidade de ajustar o perfil de resposta imune obtido e então avançar para a realização de testes no modelo bovino.

Palavras-chaves: *Anaplasma marginale*, proteínas recombinantes, resposta imune, vacina.

ABSTRACT

CASTELÃO A. B. C. *Characterization of the immunogenicity of recombinant proteins VirB9, VirB10 and Elongation Factor Tu of Anaplasma marginale in mice.* 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

Considering the limitations of currently used control measures for anaplasmosis, the development of a more effective vaccine is necessary. Previous studies using proteomic and genomic approaches have identified new membrane proteins in *Anaplasma marginale* that may be candidates for vaccines, such as VirB9, VirB10 and elongation factor-Tu (EF-Tu). Although the role of these proteins has not been well characterized in the membrane of *A. marginale*, the production of the recombinant proteins rVirB9, rVirB10, rEF-Tu has been achieved. However, these recombinant proteins have not yet been investigated in vaccine formulations. The present study describes the use of rVirB9, rVirB10 and rEF-Tu emulsified in adjuvant Montanide in mice. Under these conditions, a strong humoral immune response was induced, with both IgG1 and IgG2a production. Splenocytes in 50% of the animals that received rVirB9 produced gamma interferon above the detection limit, indicating a specific cellular immune response to this protein. Thus, these proteins can be used to induce a specific immune response, particularly a humoral immune response. Additional studies need to be carried out to adjust the profile of the immune response in order to perform tests on cattle.

Keywords: *Anaplasma marginale*, recombinant proteins, immune response, vaccine.

INTRODUÇÃO

A anaplasmoze bovina é uma doença de ruminantes causada pela bactéria gram negativa intraeritrocítica, *Anaplasma marginale*, um micro-organismo pertencente à Ordem Rickettsiales (DUMLER et al., 2001). Essa espécie ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo (RIDING et al., 2003), sendo transmitida principalmente por carrapatos ixodídeos (KOCAN et al., 2003; RIKIHISA, 2003). A doença é caracterizada por início agudo e progressão rápida e por altas riquesemias ($>10^9$ eritrócitos infectados por mL de sangue (ALLEMAN et al. 1997)) que resultam em anemia e icterícia (FRENCH et al., 1998). Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia e morte, principalmente em animais acima de dois anos (AJAYI; WILSON; CAMPBELL, 1978; KOCAN et al., 2003). Os animais que sobrevivem a essa fase permanecem persistentemente infectados, servindo então de reservatórios naturais da doença (ERIKS; STILLER; PALMER, 1993).

Essa enfermidade é responsável por importantes prejuízos econômicos em vários países do mundo, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade em rebanhos bovinos susceptíveis. Essas perdas são avaliadas por diversos parâmetros, como redução de peso e da produção de leite, abortos, custos com tratamentos e mortalidade. No entanto, poucos estudos controlados foram conduzidos para determinar os prejuízos com anaplasmoze, destacando-se a estimativa de U\$ 875 milhões/ano na América Latina (BROWN, 1997). No Brasil, as perdas econômicas com carrapatos na pecuária, incluindo o complexo Tristeza Parasitária Bovina (o qual inclui, além de *A. marginale*, os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) são consideráveis, atingindo, segundo estimativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, atualizadas por Grisi et al. (2002), 500 milhões de dólares anuais, na qual a infecção bovina por *A. marginale* teria uma das principais contribuições para prejuízos desta grandeza. Em geral, esses estudos não contemplam um dos mais importantes impactos: a limitação do uso de raças européias (*Bos taurus*), sabidamente mais susceptíveis à anaplasmoze, em programas de melhoramento genético nos países de clima tropical (KOCAN et al., 2003).

O controle da anaplasmoze é realizado pela redução das populações de vetores, pela aplicação de antibióticos e por vacinação. O controle de carrapatos, por meio da utilização de

acaricidas, não é prático em muitas áreas e protege apenas parcialmente contra *A. marginale*, já que essa riquetsia pode ser transmitida por outros mecanismos, tais como dípteros hematófagos e fômites contaminados. A quimioprofilaxia, utilizando principalmente tetraciclina, é dispendiosa e seu uso intensivo pode levar à seleção de cepas de *A. marginale* resistentes (KOCAN et al., 2003).

A vacinação tem sido considerada uma forma econômica e eficiente de controlar a anaplasmoose bovina (PALMER et al., 1989; KOCAN et al., 2003). No entanto, os métodos de imunização tradicionais, que utilizam *A. marginale* ou *A. marginale centrale* provenientes de eritrócitos infectados, também apresentam limitações em seu uso, como efeitos adversos em algumas categorias de animais (vacas prenhes, animais adultos), possibilidade de veiculação de agentes patogênicos (no caso da premunização), sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e consequente isoeritrolise neonatal em bezerros (BRIZUELA et al., 1998; KESSLER; SCHENK, 1998), razões pelas quais, estudos para o desenvolvimento de novos imunógenos são necessários.

O genoma do isolado norte-americano Saint Maries de *A. marginale* foi recentemente clonado em cromossomo artificial bacteriano, sequenciado e anotado apresentando 1.197.687 pares de bases (pb) (BRAYTON et al., 2005). Um dos aspectos mais relevantes da análise genômica de *A. marginale* foi a descoberta de novos genes que codificam novas proteínas de membrana da riquetsia. Assim as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras contra anaplasmoose estão focalizadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*. Essas proteínas são expostas na superfície da riquetsia, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro. Além de que desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito (ARULKANTHAN et al., 1999), tais como aderência e invasão dos eritrócitos do hospedeiro e transporte de nutrientes (DE LA FUENTE et al., 2001; MCGAREY; ALLRED, 1994).

Este trabalho compreende dois artigos, o primeiro é um artigo de revisão, *A Vacinação no Controle da Anaplasmoose Bovina*, que descreve a utilização da vacinação no controle da anaplasmoose bovina. Essa revisão principia-se abordando o emprego das vacinas de primeira geração, vacinas de micro-organismos mortos ou inativados e vacinas de micro-organismos vivos ou atenuados, disponíveis no mercado há algumas décadas e completa-se discutindo os avanços e as perspectivas no desenvolvimento de novas vacinas contra *A. marginale*, enfatizando as vacinas derivadas de proteínas de membrana (proteínas principais de superfície

e as novas proteínas identificadas), imunização utilizando *A. marginale* proveniente de cultivo celular, vacinas de DNA e a transformação.

O segundo artigo, *Caracterização da Imunogenicidade das Proteínas Recombinantes VirB9, VirB10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos de Anaplasma marginale em Camundongos*, é oriundo de um projeto de pesquisa científica executado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte que teve como objetivo verificar a capacidade imunogênica de rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu de *A. marginale* emulsionadas em adjuvante Montanide, em camundongos BALB/c (modelo experimental de fácil manipulação, reprodutível e econômico), para avaliar a utilização dessas proteínas recombinantes como possíveis candidatas a componentes de uma vacina contra anaplasmoses em bovinos.

REFERÊNCIAS

AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental bovine anaplasmosis: Clinico-pathological and nutritional studies. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 25, n. 1, p. 76-81, 1978.

ALLEMAN, A. R.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PERRYMAN, L. E.; BARBET, A. F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 65, n. 1, p. 156-163, 1997.

ARULKANTHAN, A. et al. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, MD, v. 67, n. 7, p. 3.481-3.287, 1999.

BRAYTON, K. A. et al. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, DC, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BRIZUELA, C. M. et al. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 27-41, 1998.

BROWN, C. G. Dynamic and impact of tick-borne diseases of cattle. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 29, p. 1S-3S, 1997. Supplement 4.

DE LA FUENTE, J. et al. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal of Parasitology*, Oxford, v. 31, n. 2, p. 145-153, 2001.

DUMLER, J. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 51, n. 6, p. 2.145-2.165, 2001.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 31, n. 8, p. 2.091-2.096, 1993.

FRENCH, D. M. et al. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and Immunity*, Bethesda, MD, v. 66, n. 3, p. 1.200-1.207, 1998.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito,

etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. (Ed.). *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998. p. 47-67.

KOCAN, K. M. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Review*, Washington, DC, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

MCGAREY, D. J.; ALLRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infection and Immunity*, Bethesda, MD, v. 62, n. 10, p. 4.587-4.593, 1994.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 57, p. 3666-3669, 1989.

RIDING, G. et al. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine*, Guildford, v. 21, n. 17-18, p. 1.874-1.883, 2003.

RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 990, p. 548-555, 2003.

A Vacinação no Controle da Anaplasmosse Bovina

Ana Beatriz Canevari Castelhão*, Flávio Ribeiro de Araújo, Lenita Ramires dos Santos, Carlos
Alberto do Nascimento Ramos

*Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte. BR 262, km 4, CEP 79.002-970,
Campo Grande, MS; Telefone: +55 (67) 3368-2085; E-mail: anabia_85@yahoo.com.br.

Periódico: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

RESUMO

A anaplasmoze bovina é uma importante enfermidade, principalmente de áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo, causada pela riquetsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*. A forma mais econômica e eficiente para controle dessa enfermidade tem sido o uso da vacinação. Vacinas vivas e com micro-organismos mortos ou inativados vêm sendo utilizados, no controle desta enfermidade, e cada qual apresentam vantagens e desvantagens particulares. Os métodos de imunização tradicionais apresentam limitações quanto ao seu uso, razão pela qual, estudos para a identificação de novos imunógenos são necessários. Avanços genômicos, proteômicos, imunológicos, bioquímicos e moleculares têm permitido progressos nas pesquisas envolvendo *A. marginale*, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de controle e prevenção da doença. Pesquisas recentes apontam novas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* como possíveis candidatas a componente de uma nova vacina. A imunização utilizando *A. marginale* proveniente de cultivo celular destaca-se com suas vantagens, entretanto, sem resultados concretos até o momento. Avanços na tecnologia do DNA recombinante apontam vacinas de DNA como uma alternativa promissora de imunização em um futuro próximo. O conhecimento genômico associado à transformação/transfecção será fundamental para fechar as lacunas do conhecimento atual e assim contribuir para a formulação de novas vacinas e outras intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, vacina, imunógeno.

INTRODUÇÃO

A anaplasmoze bovina é uma doença hemolítica causada pela riquetsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* (Kocan et al. 2003). Esse micro-organismo pertence ao Super-reino Bactéria, Filo Proteobactéria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae (Theiler 1910; Dumler et al. 2001), a qual compreende bactérias gram-negativas, pequenas, muitas vezes pleomórficas, visualizadas em microscopia óptica como pequenos pontos escuros de localização periférica. São organismos intracelulares obrigatórios que em geral infectam células hematopoiéticas (Popov et al. 1998; Dumler et al. 2001).

A transmissão de *A. marginale* ocorre principalmente por carrapatos ixodídeos (Kocan et al. 2003; Rikihisa 2003). Mais de 20 espécies de carrapatos foram citadas como vetores biológicos (Dikmans 1950), sendo que no Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o único vetor biológico identificado (Kessler & Schenk 1998). A infecção também pode ocorrer por dípteros hematófagos (Foil 1989), fômites contaminados por sangue (Kocan et al. 2003) ou ainda, pela via transplacentária (Zaugg 1985).

O período de incubação dessa enfermidade depende do número de organismos da dose infectante, e pode variar de 7 a 60 dias, com média de 28 dias (Gale et al. 1996, Kocan et al. 2003). Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. A fase aguda é caracterizada por altas riquetsemias, podendo alcançar mais de 10^9 eritrócitos infectados por mililitro de sangue (French et al. 1998). Os eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados por macrófagos, principalmente no baço, resultando em anemia de branda a severa, e icterícia sem ocorrência de hemoglobinemia ou hemoglobinúria (Ajayi et al. 1978).

Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto e letargia. A morte ocorre principalmente em animais acima de dois anos de idade (Ajayi et al. 1978; Kocan et al. 2003). Os animais que sobrevivem à fase aguda da anaplasmoze desenvolvem infecções persistentes, caracterizada por baixas riquetsemias cíclicas, não detectáveis microscopicamente (10^4 a 10^6 eritrócitos infectados/mililitro de sangue), servindo então como reservatórios naturais de *A. marginale* (Kieser et al. 1990; Eriks et al. 1993).

A ocorrência de *A. marginale* se dá principalmente em países tropicais e subtropicais (Riding et al. 2003) e é um dos principais problemas para a produção de bovinos em vários

países. Há relatos da infecção em vários países do continente europeu (Baumgartner et al. 1992; Caeiro 1999; De la Fuente et al. 2004), margens do Mediterrâneo (Kocan et al. 2000), Oriente Médio (Rajput et al. 2005), Ásia (Liu et al. 2005) e continente africano (Theiler 1910). Esta enfermidade ocorre ainda nos Estados Unidos (Kocan et al. 2000), América Central e América do Sul, com exceção às áreas de deserto e de elevadas altitudes, como os Andes (Guglielmone 1995). No Brasil, ocorrem áreas de instabilidade e estabilidade enzoótica para *A. marginale* (Kessler & Schenk 1998). Há relatos de casos de anaplasmosse bovina nas cinco regiões do país, como na Amazônia (Brito et al. 2010), no Sertão da Paraíba (Costa et al. 2011), Bahia (Barros et al. 2005), Pantanal sul-matogrossense (Tomich et al. 2004), São Paulo (Gonçalves 2000), Paraná (Marana et al. 2009) e Rio Grande do Sul (De Almeida et al. 2006).

Nos últimos anos, cada vez mais casos de anaplasmosse têm sido relatados em países de regiões temperadas, como o norte da Europa (Hofmann-Lehmann et al. 2004), Canadá (Von Donkersgoed et al. 2004) e Japão (Ooshiro et al. 2009), fato este atribuído a transmissão mecânica a partir da introdução de animais portadores em áreas até então, livres da doença. No entanto, estes casos servem de alerta para os riscos do aquecimento global e suas influências na distribuição dos vetores e consequentemente na distribuição das doenças.

Neste contexto, a anaplasmosse bovina é responsável por significativos prejuízos econômicos nas pecuárias de corte e de leite, principalmente devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade nos rebanhos susceptíveis. Tais perdas são mensuráveis em diversos parâmetros: baixo ganho de peso, redução na produção de leite, abortos, altos custos de tratamento e mortalidade. No entanto, poucos estudos controlados foram conduzidos para determinar os reais prejuízos econômicos causados por doenças ou danos causados por carrapatos, destacando-se a estimativa de U\$ 875 milhões/ano na América Latina (Brown 1997). No Brasil, as perdas econômicas com carrapatos na pecuária, incluindo a transmissão do complexo Tristeza Parasitária Bovina (a qual inclui, além de *A. marginale*, os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) são consideráveis, atingindo, segundo estimativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, atualizadas por Grisi et al. (2002), 500 milhões de dólares anuais, na qual a infecção bovina por *A. marginale* teria expressiva contribuição para prejuízos desta grandeza (De Almeida et al. 2006). Assim, a busca de programas de controle mais eficazes são justificáveis.

Existem, atualmente, alternativas empregadas no controle da anaplamose bovina: a

utilização de acaricidas, a administração de antibióticos e a premunição. Sabe-se que o uso de vacinas é a forma mais eficiente e econômica para o controle de doenças em todo o mundo. No entanto, para a anaplasmoze, os métodos de imunização tradicionais, que utilizam *A. marginale* ou *A. centrale* oriundas de eritrócitos infectados, apresentam limitações de uso, além de não serem capazes de proteger os animais contra a infecção persistente, o grande desafio frente à anaplasmoze bovina.

Nos últimos anos, os estudos acerca de imunização contra *A. marginale* concentram-se na obtenção de frações antigênicas. Trabalhos recentes, utilizando avaliação genômica e proteômica, têm sugerido um conjunto de novas proteínas identificadas na superfície da membrana de *A. marginale* como potenciais candidatas à componentes de uma vacina. Deste modo a busca de novos imunógenos se faz necessária. Novas pesquisas podem originar oportunidades adicionais ao desenvolvimento de novas estratégias de controle e prevenção da anaplasmoze bovina.

MÉTODOS DE CONTROLE

O controle da anaplasmoze pode ser realizado pela redução das populações de vetores, utilizando acaricidas; pela aplicação de antibióticos e por vacinação. O controle de carrapatos não é prático em muitas áreas e protege apenas parcialmente contra *A. marginale*, já que essa riquetsia pode ser transmitida por outros mecanismos. A quimioprofilaxia, utilizando principalmente tetraciclina, é dispendiosa e seu uso intensivo pode levar à seleção de cepas resistentes (Kocan et al. 2003). Por sua vez, a vacinação tem se destacado frente ao controle da anaplasmoze. A busca por uma vacina, que além de proteger contra a doença também impeça a infecção do animal, é o grande objetivo das pesquisas atuais.

VACINAS CONTRA ANAPLASMOZE

A vacinação tem sido considerada a mais econômica e eficaz forma de controle de *A. marginale* em bovinos (Palmer et al. 1989; Kocan et al. 2003). As vacinas contra anaplasmoze bovina atualmente no mercado são preparadas a partir de micro-organismos vivos ou inativados, todas derivadas de *Anaplasma* spp oriundas de eritrócitos bovinos infectados. Entretanto este tipo de preparação pode trazer sérios problemas quanto a sua utilização, não

somente em relação a aspectos econômicos, como também, pelo risco de transmissão de outros agentes infecciosos (Kocan et al. 2003).

Todas essas vacinas são oriundas das primeiras tentativas de imunização contra a anaplasmoze bovina (premunização), que consiste na inoculação do sangue de bovinos portadores (doadores) em bovinos em que se deseja imunizar (receptores). Assim, essas vacinas induzem uma resposta protetora capaz de minimizar os efeitos da riquetsia no organismo ou proteger contra a doença, porém não são capazes de proteger os animais de se tornarem persistentemente infectados, o que contribui para a disseminação da doença uma vez que atuam como reservatórios naturais (Kocan et al. 2003; Kocan et al. 2010).

Siqueira (1998) destaca que a busca por uma vacina eficaz tem possibilitado avanços no conhecimento dessa enfermidade, dentre estes, a importância da imunidade celular, a presença de antígenos comuns entre isolados distintos de *A. marginale* e *A. marginale* subespécie *centrale* e a demonstração do potencial imunogênico das proteínas de superfície dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*. Pesquisas têm sido realizadas a respeito da natureza da resposta imune de bovinos infectados com *A. marginale*, bem como na identificação de antígenos de *A. marginale* que desempenham um papel chave na resposta imune (Kocan et al. 2010). Assim a vacina ideal para anaplasmoze bovina será aquela capaz de induzir imunidade que além de controlar a doença, impeça a infecção dos bovinos.

Vacinas de Primeira Geração

Vacinas de Micro-Organismos Mortos

Vacinas de micro-organismos mortos ou inativados foram desenvolvidas pela primeira vez nos Estados Unidos na década de 1960, utilizando *A. marginale* de eritrócitos hemolisados como imunógeno, que foram liofilizados e combinados com um adjuvante oleoso no momento da imunização. Os animais receberam duas aplicações, com intervalo de quatro semanas, e reforço anual (Brock et al. 1965). Entretanto essa primeira vacina estava fortemente contaminada com estroma dos eritrócitos, o que ocasionou transtornos.

Trabalhos posteriores demonstraram que vacinas mortas ou inativadas são efetivas na proteção contra a enfermidade, enquanto que, outros trabalhos, demonstraram falhas de

proteção (Brock et al. 1965; Figueroa Millán et al. 1999). Estes resultados ajudaram a evidenciar que cepas dos isolados de *A. marginale* não são capazes de conferirem proteção cruzada, sendo assim, mais efetiva a utilização de isolados locais na confecção de vacinas mortas (Kuttler et al. 1984).

Mesmo com os avanços nas pesquisas envolvendo esse grupo de vacina e até mesmo ressaltando suas vantagens em relação às vacinas vivas, tais como: reduzido risco de contaminação com outros agentes infecciosos, baixo custo de estocagem e mínimas reações pós-vacinais; esse tipo de vacinas não são utilizadas com frequência. Como desvantagens podem-se citar o elevado custo de purificação dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* dos eritrócitos bovinos, a necessidade de reforços anuais, além de que a imunidade conferida pelas vacinas inativadas é menor quando comparada a das vacinas vivas (Kocan et al. 2003; Kocan et al. 2010).

Vacinas de Micro-Organismos Vivos

O uso de vacinas vivas no controle da anaplasmosose foi iniciado pelo cientista veterinário suíço Arnold Theiler (1867-1936) no início do século passado e até hoje vem sendo utilizado como método de vacinação de escolha em muitos países. Para a confecção destas vacinas parte-se da infecção do animal através da inoculação de eritrócitos infectados oriundos de animais que desenvolveram baixa riquetsemia à cepas de isolados de *A. centrale* ou *A. marginale*; ou então, da promoção de infecção experimental com *A. marginale*, tratamento dos animais com antibióticos no momento em que ocorre elevação da temperatura corporal ou detecção de riquetsemia, e então, obtenção dos eritrócitos infectados, métodos estes conhecidos como “infecção X tratamento ou premunição” (Kocan et al. 2003, Kocan et al. 2010). Para a produção comercial, bezerros esplenectomizados, mantidos em quarentena, são inoculados experimentalmente com quantidades da cepa pré-definida e servem como doadores de eritrócitos infectados.

Entretanto existem desvantagens na utilização de vacinas vivas, destacando-se principalmente a transmissão de outros hemoparasitos carregados silenciosamente pelo doador, constituindo-se desta forma um risco adicional. Além disso, os animais que recebem esse tipo de vacina desenvolvem infecção persistente e a revacinação não é aconselhada, uma vez que pode ocasionar sensibilização das vacas contra grupos sanguíneos e consequente isoeritrólise

neonatal em bezerros (Abdala et al. 1990; Tebele & Palmer 1991; Kessler & Schenk, 1998).

Vacinas vivas com cepas atenuadas de *A. marginale*. Cepas atenuadas da riquetsia têm sido avaliadas, principalmente para uso comercial. Os métodos de atenuação envolvem passagens sucessivas do micro-organismo em ovelhas ou veados (Kuttler & Zaugg 1988), bovinos esplenectomizados (Kessler & Schenk 1998) ou então irradiação do patógeno com Cobalto 60 (Ristic et al. 1968; Sharma & Bansal 1986). Entretanto existem controvérsias quanto à eficácia e a segurança dessas vacinas; Ribeiro et al. (1980), no Brasil, e Henry et al. (1983), nos Estados Unidos, relataram reações adversas pós vacinais nos bovinos.

Vacinas vivas *Anaplasma marginale centrale*. Embora existam vacinas com cepas atenuadas de *A. marginale*, *A. centrale* é a cepa mais largamente empregada em vacinas vivas no controle da anaplasmoze bovina. Este fato pode ser explicado por *A. centrale* ser menos patogênica para os bovinos do que *A. marginale*, além de promover um grau satisfatório de imunidade cruzada contra infecção por *A. marginale*. Apesar disso, eventualmente pode ocorrer falha de proteção, com consequente desenvolvimento de infecção clínica (Sacco et al. 2001).

As duas espécies de *Anaplasma* compartilham epítomos imunodominantes que provavelmente estão envolvidos na proteção cruzada induzida por *A. centrale*, entre eles epítomos para células T CD4⁺ (Shkap et al. 1991, Guedes Junior et al. 2010). Estudos recentes demonstraram que a variação antigênica de Proteína Principal de Superfície 2 (MSP2) ocorre durante infecções persistentes de *A. centrale* de modo similar ao descrito para *A. marginale*. Além de que, epítomos para linfócitos T CD4⁺ se mantêm conservados nas duas espécies, reforçando importante função na imunidade cruzada, conferida então com o uso de vacinas vivas *A. centrale* (Shkap et al. 2002).

Assim, como qualquer vacina viva, a utilização desse tipo de vacina pode apresentar alguma(s) das desvantagens já citadas, entretanto mesmo considerando estas possibilidades, vacinas vivas utilizando a cepa *Anaplasma marginale* subespécie *centrale* têm sido utilizadas há aproximadamente um século, e aparentemente aprovada no controle da anaplasmoze em vários países do mundo.

Avanços e Perspectivas no Desenvolvimento de Vacinas Contra *Anaplasma marginale*

Avanços genômicos, proteômicos, imunológicos, bioquímicos e moleculares têm permitido progressos nas pesquisas envolvendo *A. marginale*, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de controle e prevenção da doença. O sucesso de novas vacinas para anaplasmoze bovina, utilizando tecnologias moleculares, dependerá da habilidade das mesmas de redirecionar o sistema imunológico do hospedeiro a fim de bloquear ou neutralizar a infectividade de *A. marginale*. Assim, conhecer os mecanismos de resposta imune do hospedeiro frente à riquetsia, bem como os mecanismos de evasão da mesma frente ao sistema imune do hospedeiro, é fundamental para entender como novos imunógenos podem atuar como componentes de novas e eficazes vacinas.

Resposta Imune Contra *Anaplasma marginale*

Os mecanismos de resposta imune contra *A. marginale* ainda não foram totalmente elucidados, mas há evidências de interação entre mecanismos humorais e celulares. Assim, a resposta imune contra esta riquetsia, requer uma eficiente indução de resposta do tipo Th1 (T helper 1), mediada principalmente por linfócitos T CD4+, que produzem elevados níveis de interferon gama (IFN- γ), ativando macrófagos e estimulando linfócitos B a produzirem anticorpos da classe IgG2a (Brown et al. 1998), conforme esquematizado na figura 1. De fato, a opsonização, fagocitose e morte dos micro-organismos, mediada pelos anticorpos IgG2a e macrófagos ativados, parecem ser as peças fundamentais para o controle de *A. marginale* em bovinos.

Apesar da importante participação dos anticorpos na resposta imune induzida contra *A. marginale*, é pouco provável que, isoladamente, os mesmos sejam capazes de proteger os bovinos contra a anaplasmoze (Brown et al. 2001). Há relatos que a inoculação de soro de animais imunes em bovinos susceptíveis não protege contra desafio com *A. marginale* (Gale et al. 1992), reforçando assim a necessidade de uma resposta conjunta mediada por células e anticorpos para o efetivo controle da infecção.

A importância da resposta celular na anaplasmoze bovina foi avaliada por Brown et al. (1998). Foi demonstrado que, na presença de IFN- γ , macrófagos são eficientemente ativados gerando um aumento da produção de óxido nítrico (NO), expressão de receptores de fração

cristalizável (Fc) e também, o favorecimento da fusão de fagossomos e lisossomos. Este conjunto de ações atua direta ou indiretamente sobre a riquetsia, quer seja pela ação tóxica de NO, quer seja pelo aumento da captura de micro-organismos neutralizados por anticorpos. Além disso, em bovinos, a produção de IgG2a é estimulada por esta mesma citocina (Estes et al. 1994). Este isotipo apresenta alta capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização, estando envolvido, provavelmente, no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (Tuo et al. 2000).

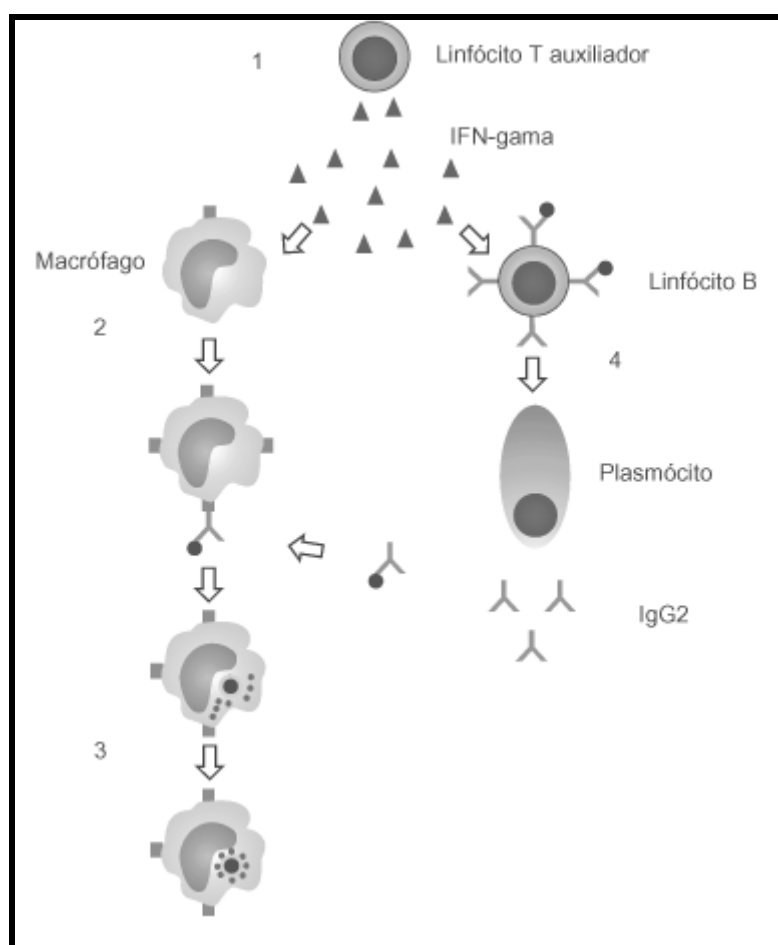


Figura1. Modelo de resposta imune celular e humoral contra *Anaplasma marginale*. Linfócitos T auxiliares (CD4+) estimulados por antígenos de *A. marginale* produzem IFN- γ (1) que atua sobre macrófagos (2), ativando-os e sobre plasmócitos, induzindo-os a secretarem anticorpos da subclasse IgG2 (4). Antígenos opsonizados por IgG2 são favorecidamente fagocitados por macrófagos ativados (3). Fonte: Araújo et al. 2003.

O papel das células T $\gamma\delta$ no controle da infecção por *A. marginale* também merece atenção especial. No experimento conduzido por Valdez et al. (2002), verificou-se expansão progressiva dessas células no sangue periférico e baço dos animais infectados. Sabe-se que essas células representam até 75% dos linfócitos T em bezerros (Wyatt et al. 1994), os quais,

apesar de serem susceptíveis à infecção por *A. marginale*, são mais resistentes ao desenvolvimento de manifestações clínicas do que os animais adultos (Jones et al. 1968).

Outros fatores que ajudam a explicar essa resistência dos bezerros são: anticorpos colostrais, rápida resposta celular e maior atividade eritropoiética (Ristic 1960; Madruga et al. 1986). Costa et al. (2008), em seu trabalho acerca do metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros das raças nelore e limousin nos primeiros quatro meses de vida, puderam concluir que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros de corte se modifica com a idade, ocorrendo aumento da capacidade oxidativa ao longo dos quatro primeiros meses de vida e ainda que a infecção natural e assintomática com *A. marginale* contribui para essa variação. Assis et al. (2009) concluíram que bezerros infectados com *A. marginale*, via transplacentária, apresentaram já no primeiro dia de vida um acréscimo no metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Diante do exposto é notória a importância da imunidade humoral na infecção por *Anaplasma*, embora seja necessária uma interação entre a imunidade humoral e celular para que a resposta imune seja eficaz. Conclui-se então que os anticorpos, embora essenciais à resposta imune, não são capazes por si só de combaterem a infecção, sendo assim necessária a ativação de elementos celulares do sistema imune para que os bovinos possam se recuperar (Madruga et al. 2001).

Mecanismos de Evasão da Riquetsia ao Sistema Imune do Hospedeiro

Conjuntamente com os trabalhos que possibilitaram o aprimoramento do conhecimento dos mecanismos de resposta imune frente à infecção por *A. marginale*, mecanismos de evasão da riquetsia frente ao sistema imunológico do hospedeiro foram descritos. Estes mecanismos são desenvolvidos pelo parasito em oposição às barreiras da resposta imune inata e adaptativa do sistema imune dos bovinos infectados (Brown 2012).

Iniciando a abordagem pelos mecanismos de evasão ao sistema imune inato, o primeiro fator a ser considerado é o fato de *A. marginale* não possuir genes que codificam proteínas como o Lipopolissacarídeo e as peptidoglicanas, dois importantes padrões moleculares associados à patógenos (Pathogen-Associated Microbial Patterns, PAMP's) (Brayton et al. 2005). Assim, a ausência destas moléculas permite a este patógeno escapar do

reconhecimento pelo sistema imune inato do hospedeiro por meio da interação com receptores Toll-like. Também, o fato de *A. marginale* infectar e replicar no interior de eritrócitos, células com ausência de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e mecanismos inatos de defesa, representa uma importante via de escape (Brown 2012). Embora a função do Sistema de Secreção do Tipo IV (Type Four Secretion System, TFSS) não seja totalmente elucidada em *A. marginale*, a retenção dos genes que codificam este sistema do genoma deste parasito indicou que os mesmos possam ser requisitos para invasão e sobrevivência dessa riquetsia fora dos eritrócitos e ou células de carrapatos, ou ainda constituir fatores de virulência frente ao hospedeiro (Brayton et al. 2005, Gillespie et al. 2010).

Frente ao sistema imune adaptativo a riquetsia *A. marginale* tem indicado o desenvolvimento de mais de um mecanismo para tentar driblar as barreiras do hospedeiro e garantir sua sobrevivência. Esses mecanismos não são totalmente elucidados, mas alguns pesquisadores corroboram algumas teorias. Sabe-se que a infecção persistente é estabilizada e mantida grande parte pela variação antigênica da proteína imunodominante MSP2, correlacionada a MSP3, em *A. marginale* (Palmer et al. 2009). A MSP2 é uma proteína imunodominante de superfície, codificada por uma família de genes polimórficos (Palmer et al. 1994). A análise de diversos transcritos que codificam esta proteína mostraram uma região central hipervariável única, flanqueada por regiões amino (N) e carboxi (C) terminais altamente conservadas (French et al. 1999). A variação antigênica de MSP2 e MSP3 ocorre pela recombinação de pseudogenes inteiros de *mvp2* em um sítio de expressão único para gerar novas variantes antigênicas. Essa recombinação constitui um segundo nível de variação, no qual pequenos segmentos de pseudogenes se recombinaem no sítio de expressão por conversão gênica (Brayton et al. 2005).

Durante cada ciclo de riquetsemia, os quais ocorrem a cada seis a oito semanas, ocorre emergência de *A. marginale* expressando variantes distintas de MSP2, contendo epítomos imunogênicos que induzem anticorpos específicos durante a infecção persistente da riquetsia. Acredita-se que essa variação antigênica seja um mecanismo de evasão da resposta imune (French et al. 1999). A variação antigênica de MSP2 também ocorre em *A. marginale* na glândula salivar de carrapatos *Dermacentor* (De la Fuente et al. 2001), demonstrando que ocorre pressão de seleção para variação sobre MSP2 no hospedeiro invertebrado, independentemente do sistema imunológico do bovino.

Embora no sistema imune de bovinos infectados por *A. marginale* não ocorra

imunossupressão generalizada, com alteração no número de neutrófilos e linfócitos circulantes, sabe-se, conforme relatado por Han et al. (2008), que em bovinos infectados pela riquetsia ocorre leve supressão da resposta de células T antígeno específicas. Bovinos imunizados com a proteína MSP2 ou com porções imunogênicas de MSP1 evidenciaram rápida desregulação e supressão de células T CD4⁺ específicas após desafio, antecedendo o pico de bacteremia (Abbott et al. 2005). Brown (2012) sugere ainda que a supressão e ou anergia de células T CD4⁺ específicas após o estabelecimento da infecção, acaba por contribuir para que o hospedeiro não estabeleça forte e duradoura resposta de memória, apesar dos elevados títulos de anticorpos, e favoreça assim para a apoptose de células T antígeno-específicas.

Vacinas Derivadas de Proteínas de Membrana

As proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* concentram a atenção das pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas vacinas contra anaplasnose. Isso ocorre principalmente porque essas proteínas estão expostas na superfície da riquetsia, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, algumas das quais desempenham importantes funções para a sobrevivência do micro-organismo (Arulkanthan et al. 1999), tais como aderência e invasão dos eritrócitos do hospedeiro e transporte de nutrientes (McGarey & Allred 1994; De la Fuente et al. 2001).

A princípio, a importância das proteínas de superfície de *A. marginale* foi constatada a partir de experimentos de neutralização da infectividade da riquetsia por soro gerado contra corpúsculos iniciais (Palmer & McGuire 1984). Preparações de corpúsculos iniciais de *A. marginale* induziram resposta imune protetora em bovinos contra desafio homólogo, caracterizada por baixas riquetsemias e branda anemia, quando comparados com animais controle não imunizados (Montenegro-James et al. 1991; Tebele et al. 1991); resposta semelhante também pode ser observada contra desafio heterólogo (Montenegro-James et al. 1991; Palmer et al. 1994). Deste modo, verificou-se que proteínas presentes na superfície de *Anaplasma* estão fortemente envolvidas na indução de resposta imune protetora contra esta enfermidade.

Proteínas Principais de Superfície

Inicialmente, foram identificadas na membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* seis proteínas principais de superfície: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (Palmer & McGuire 1984; Oberle et al. 1988; Tebele et al. 1991; Oberle et al. 1993). Cada uma dessas proteínas apresentam características bioquímicas e funcionais importantes, variações polimórficas e capacidade imunogênica distintas.

Embora a imunização de bovinos com membrana externa de *A. marginale* seja capaz de proteger contra a doença clínica (Tebele et al. 1991), associada a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e elevados níveis de IgG2a (Brown et al. 1998), nenhuma das MSPs, isoladas ou em associações, foram capazes de induzir proteção semelhante a induzida pela membrana total da riquetsia. Vários experimentos foram conduzidos e as MSPs foram capazes apenas de protegerem parcialmente contra desafios homólogos e ou heterólogos, não sendo capazes de impedirem a infecção do animal pela riquetsia (Palmer et al. 1986; Oberle et al. 1993; Araújo et al. 2003; Araújo, 2005). Assim, os resultados da imunização com MSPs, até o momento, foram pouco promissores.

Novas proteínas

Recentemente, o genoma completo do isolado norte-americano de *A. marginale*, *Saint Maries*, foi sequenciado (Brayton et al. 2005), identificando 62 sequências como proteínas de membrana. Estas proteínas foram classificadas então, em três grupos: duas superfamílias de proteínas de membrana, superfamílias *msh1* e *msh2*, estruturadas em torno dos genes *msh1* e *msh2* respectivamente e proteínas não associadas a nenhuma superfamília, como VirB3, VirB9 e OMA87 (Brayton et al. 2005; Lopez et al. 2005).

A superfamília *msh1* contém nove membros estruturados em torno dos genes que codificam o heterodímero MSP1 (*msh1 α* e *msh1 β*); e a superfamília *msh2* foi estruturada em torno dos genes *msh2*, *msh3* e *msh4* (Brayton et al. 2005), que fazem parte do grupo de antígenos de superfície *pfam* 01617 (Bateman et al. 2004) no qual encontra-se as Proteínas de Membrana Externa (OMPs) 1-15. Doze desses genes estão arranjados em quatro operons, e três ocorrem isoladamente (Brayton et al. 2002). Até o momento, não há dados de imunoproteção vacinal conferidas pelas OMPs.

Exatamente, a partir do advento da análise genômica e, quase que simultaneamente, proteômica de *A. marginale*, um novo leque de proteínas de membrana e/ou associadas à membrana da riquetsia foi identificado. Mediante a separação eletroforética bidimensional da membrana da riquetsia e análise por espectrometria de massa das proteínas que reagiram com soros de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*, foi possível identificar 76 novas proteínas de membrana (Lopez et al. 2005). Interessantemente, algumas dessas proteínas têm se mostrado naturalmente imunogênicas, como demonstrado pelo reconhecimento dessas proteínas por efetores da imunidade humoral e celular de animais protegidos pela imunização com preparação de membrana externa de *A. marginale* (Lopez et al. 2007; Suttén et al. 2011), ou infectados, quer seja natural ou experimentalmente (Araújo et al. 2008).

Entre essas proteínas recentemente identificadas na membrana de *A. marginale* podem-se destacar as proteínas pertencentes ao Sistema de Secreção Tipo IV (TFSS). O TFSS é um sistema que possui pelo menos três funções: montagem e retração do pilus durante a conjugação, permitir que a bactéria importe DNA exógeno e incorpore ao seu próprio genoma, e por fim transferir seu próprio substrato a uma célula alvo através de contato direto (Cascales & Christie 2003). Assim, proteínas do TFSS são importantes para uma série de eventos relacionados à manutenção da sobrevivência e virulência bacteriana.

Em geral, o sistema TFSS é codificado por 11 proteínas VirB (VirB1 a VirB11) (Backert & Meyer 2006). O TFSS provavelmente está arranjado em *A. marginale* com um operon contendo *sodB*, *virB3*, *virB4*, e *virB6* e outro com *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* e *virD4*, assim como em *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* (Ohashi et al. 2002), e em *E. ruminantium* (Collins et al. 2005). Além disso, o gene *virB6* é seguido por três parálogos, e há também uma cópia adicional de *virB8* e *virB4* não associadas a outros genes do sistema de secreção tipo IV (Brayton et al. 2005). Como as proteínas codificadas por esses genes estão possivelmente ligados a transporte de fatores de virulência, e algumas delas têm localização membranar (Lopez et al. 2005), estas proteínas também são potenciais imunógenos.

Lopez et al. (2007) observaram que proteínas do TFSS presentes na membrana externa de *A. marginale* são reconhecidas por mecanismos imunes do hospedeiro e que as proteínas VirB9, VirB10 e Conjugational Transfer Protein induzem proliferação de células T CD4+. Além de que, estas células T CD4+ específicas responderam a três diferentes cepas de *A. marginale*, confirmando assim que as células T CD4+ específicas atuam diretamente contra epítomos da

proteína nativa. Suttén et al. (2010) trabalharam com outras proteínas do TFSS e concluíram que VirB2, VirB7, VirB11 e VirD4 também são antigênicas, como demonstrado pela reatividade destas proteínas em suas formas recombinantes com soro de animais imunizados com membrana externa de *A. marginale*, e que VirB2 é codificada por vários genes que compartilham uma região central conservada e mapeamento de epítomos de células T.

Lockwood et al. (2011) identificaram e testaram algumas proteínas do TFSS em laboratório. Esse grupo trabalhou com o micro-organismo *Legionella pneumophila*, como modelo validado de efetores de secreção para *A. marginale*, e partindo de seis proteínas testes concluiu que quatro dessas: AM185, AM470, AM705, AM1141 foram translocadas de forma TFSS-dependente (análises tendo como base níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato-cíclico), utilizando assim *L. pneumophila* como sistema repórter. Assim, esse grupo validou este modelo, bem como sugeriu que o mesmo seja utilizado como ferramenta de triagem para proteínas efetoras/secretoras de *A. marginale*.

Outra proteína identificada associada à membrana de *A. marginale* é o Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos (EF-Tu) (Lopez et al. 2005) encontrado em bactérias e na mitocôndria de eucariotos (Krab & Parmeggiani 1998). Uma característica fundamental desta proteína é sua participação ativa na fase de elongação da síntese proteica. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que esta proteína pode estar localizada na superfície bacteriana, atuando como um fator de adesão (Marques et al. 1998; Granato et al. 2004), o que pode ser de grande importância para a indução de resposta imune contra esta proteína.

A presença de EF-Tu na superfície de *Anaplasma* também pode estar correlacionada à indução de imunidade contra anaplasmoses em bovinos. Em animais naturalmente infectados por *A. marginale* ou imunizados com membrana externa purificada, a produção de anticorpos IgG2a específicos contra EF-Tu é induzida, sugerindo que EF-Tu funcione como um potencial estimulador do sistema imune (Araújo et al. 2008). Essa produção de anticorpos da subclasse IgG2a assemelha-se com o perfil característico de uma resposta imune protetora contra anaplasmoses (Marques et al. 1998; Granato et al. 2004). O uso de EF-Tu recombinante (rEF-Tu) como imunógeno não foi ainda explorado.

Mais recentemente foi descrita a produção das proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e EF-Tu e constatado que as mesmas são antigênicas, como observado pela reação positiva do soro dos animais infectados naturalmente, e que em suas conformações nativas desencadeiam resposta imune humoral específica, além de que IgG2a de bovinos infectados naturalmente

também reagem com estas proteínas (Araújo et al. 2008). No mesmo ano, Vidotto et al. (2008) clonaram e sequenciaram o gene e caracterizaram antigenicamente a proteína recombinante VirB9 oriunda de *A. marginale* isolado *Paraná, Brasil*. Esse estudo mostrou ainda que rVirB9 é altamente conservada, possui epítomos conservados e mantém antigenicidade, sugerindo também, que esta proteína seja utilizada no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra *A. marginale*.

Recentemente, a sequência completa do genoma de *A. marginale* subespécie *centrale* foi obtida e comparada à sequência do genoma de *A. marginale* (Herndon et al. 2009). A partir dessa comparação foi cogitada a hipótese de que apenas seis proteínas de membrana: MSP4, OMP1, OMP7, OpAG2, AM779/ACIS557 e AM854/ACIS486 seriam comuns à *A. marginale* e *A. centrale* e se manteriam como possíveis imunógenos. No Brasil, Guedes Junior et al. (2010) estudaram o grau de conservação de algumas proteínas de membrana do isolado brasileiro *Pernambuco-Zona da Mata* de *A. marginale* quando comparado aos isolados *Saint Maries, Florida* e *A. centrale*. Nesse estudo constataram, que dentre as proteínas estudadas, OMP1, OMP5, EF-Tu, VirB3, SODb e VirB9-1 apresentam maior grau de homologia aos isolados mencionados anteriormente, além de apresentarem elevado grau de conservação, sugerindo assim que as mesmas podem ser importantes imunógenos capazes de promoverem proteção cruzada entre isolados.

Por outro lado, Agnes et al. (2011), em uma avaliação mais ampla da correlação entre a proteção conferida por *A. centrale* e a busca de possíveis imunógenos em outras cepas, apontaram por meio de *Imunoblotting* 15 proteínas, entre elas: OMP7, OMP8, OMP11, AM854, MSP2, MSP3 e EF-Tu, que foram reconhecidas por anticorpos presente no soro de bovinos imunizados com a vacina israelense cepa *A. marginale centrale*, sugerindo-as. E ainda Dark et al. (2011), utilizando ferramentas da bioinformática, apontaram outras 19 proteínas como possíveis candidatas a componentes de uma vacina recombinante contra a anaplasmoze bovina, entre elas VirB9 e VirB10.

Como se pode observar, cada trabalho acaba por apontar diferentes proteínas como potenciais imunógenos, sem, contudo, manter algumas delas de uma abordagem para outra. Assim, Palmer et al. (2011), utilizaram três metodologias associadas: análise *in silico* em conjunto a resposta imune contra desafio homólogo e heterólogo e vacinação (abordando resposta imune humoral e celular), sem contudo, deixar de lado a ampla diversidade de MHC das células do hospedeiro para identificar potenciais imunógenos dentre as proteínas de

membrana (antígenos subdominantes). Considerando as 949 proteínas identificadas no proteoma de *A. marginale* e partindo de 62 proteínas supostamente de membranas, previamente identificadas pela bioinformática, após três amplas etapas, incluindo inclusive princípios de outros trabalhos, chegou-se a três proteínas candidatas: AM779, AM854, OMP7/8/9 (codificadas por três genes em tandem).

Imunização Utilizando *Anaplasma marginale* Proveniente de Cultivo Celular

Uma das alternativas para a imunização contra *A. marginale* é o cultivo *in vitro* dessa riquétisia, o qual constitui uma alternativa econômica, segura e eficaz de produção de antígenos (Waghela et al. 2000). As primeiras tentativas envolveram o cultivo de *A. marginale* em células de medula óssea de coelho (Marble & Hanks 1972) e de linfonodos de bovinos (Hidalgo 1975), entretanto sem evidências efetivas da multiplicação da riquétisia.

A partir de então outros grupos de pesquisa passaram a trabalhar com cultivo celular desta riquétisia (Waghela et al. 1977; Kessler & Ristic 1979; Mazzola et al. 1979), e anos depois, um avanço considerável foi obtido por Samish et al. (1988) e Hidalgo, Jones et al. (1989) com o cultivo de *A. marginale* em células de carrapatos *Dermacentor variabilis*. Entretanto, não houve sucesso nas tentativas de infecção de bovinos com organismos cultivados dessa forma (Hidalgo, Palmer et al. 1989).

Posteriormente, *A. marginale* foi cultivado em linhagem celular IDE8, derivada de embriões de carrapatos *Ixodes scapularis* (Munderloh et al. 1996). Em outro estudo, foi constatado que o ciclo de *A. marginale* nas células dessa cultura apresentava semelhanças ao que ocorre em infecções naturais (Blouin & Kocan 1998). Os organismos obtidos desses cultivos foram infectantes para bovinos e carrapatos (Munderloh et al. 1996; Blouin & Kocan 1998). Além disso, em estudos posteriores, foi demonstrado que as seis MSPs caracterizadas em *A. marginale* provenientes de eritrócitos de bovinos, estavam conservadas nos organismos cultivados em IDE8 (isolado de Virginia) (Barbet et al. 1999). A partir desses resultados, *A. marginale* proveniente de cultivo em células IDE8 foi testado como imunógeno, apresentando pequenas diferenças quando comparado com animais controle não testados, como: redução do volume globular e não exacerbação dos sinais clínicos de anaplasmosose (Kocan et al. 2001).

Além das vantagens, conhecidas até então, que a imunização com organismos

provenientes de cultura celular de carrapatos teria, como: ausência de contaminação por estroma de eritrócitos infectados, ausência de risco de transmissão de outros hemoparasitos, facilidade de padronização e não necessidade de produção de antígenos recombinantes desta riquetsia (Kocan et al. 2001), diversos isolados de *A. marginale* poderiam ser propagados em cultura, ampliando o espectro de proteção contra a anaplasnose. No entanto, tais cultivos teriam que ser feitos em separado, uma vez que o cultivo de um genótipo de *A. marginale* exclui o crescimento de outro (De la Fuente 2002).

Mais recentemente, Munderloh et al. (2004) demonstraram infecção e propagação de *A. marginale* em linhagens de células endoteliais bovinas abrindo um novo leque de oportunidades de estudos.

Vacinas de DNA

Vacinas de DNA representam um novo e promissor método nas pesquisas em desenvolvimento de vacinas para diversas enfermidades, uma vez que além de produzirem imunidade duradoura, possibilidade de produção simultânea de uma vacina para vários patógenos, ainda possuem a capacidade de estimularem resposta imune de amplo espectro, ou seja, resposta imune humoral e resposta imune celular (Van Drunen Little-van den Hurk et al. 2001). Além disso, outras vantagens se destacam: simplicidade para produção, baixo custo, estabilidade, segurança, reprodutibilidade lote-a-lote e facilidade de transporte na forma liofilizada (Sharma & Khuller 2001). Vários estudos já estão sendo realizados nesta área, e recentemente também abordados para a anaplasnose. Entretanto, as poucas publicações existentes focalizam exclusivamente em proteínas e/ou epítomos associados às MSPs de *A. marginale* (Arulkanthan et al. 1999; de Andrade et al., 2004; Mwangi et al., 2007; Kano et al., 2008). Assim, ainda faz-se necessário a elaboração de formulações de DNA recombinante e análise de protocolos de expressão/imunização para que, em futuro próximo, resultados promissores sejam obtidos.

Interrupção dirigida de genes em *Anaplasma marginale*

Assim como para *A. phagocytophilum* recentemente para *A. marginale* a manipulação genética se fez presente com novos desafios. Felsheim et al. (2010) transformaram com

sucesso *A. marginale* isolado *Saint Maries* com o gene de uma proteína verde fluorescente (conhecida como GFP, abreviatura do inglês *green fluorescent protein*) abrindo assim novas possibilidades no ramo da engenharia genética para o controle desta riquetsia. Este primeiro transformante foi denominado AmStMTSS, produto de uma recombinação homóloga associado a um evento de *crossover* em um único nucleotídeo na posição 1026363 no genoma de *A. marginale* *St. Maries* (Brayton et al. 2005).

Como principal utilização da transformação/transfecção de *A. marginale* pode-se citar o desenvolvimento de novas ferramentas para bloquear a transmissão da riquetsia pelo carrapato. A transmissibilidade do carrapato e a capacidade de estabelecer infecção persistente nos bovinos foram recentemente demonstradas, assim que houve a padronização da utilização destes transformantes como modelo (Noh et al. 2010). Uma possibilidade de utilização desta tecnologia seria o *knock-out* de genes do TFSS (prováveis fatores de virulência) para possível atenuação de *A. marginale*, estratégia esta que seria facilitada pela estrutura em operon desses genes, ou seja, a interrupção de um gene próximo ao promotor implicaria em perda de função dos genes *downstream*.

O domínio da transformação em *A. marginale* poderá possibilitar a identificação da função de inúmeros genes, e em particular, a identificação da função dos genes relacionados a colonização e transmissão desta riquetsia no hospedeiro que, conseqüentemente, culminará com a habilidade da criação de genes alvos *knock-out* e bibliotecas genômicas mutantes. A capacidade de direcionar genes específicos ou regiões genômicas por recombinação homóloga, seja com o objetivo de introduzir genes estranhos ou gerar *knock-out*, representa uma importante ferramenta estratégica de manipulação genética deste patógeno que certamente contribuirá para a obtenção de avanços no controle desta enfermidade (Suarez & Noh, 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A anaplasmoze bovina é uma enfermidade que causa expressivos prejuízos econômicos anualmente em vários países. O controle efetivo desta doença é o grande objetivo das pesquisas frente à riquetsia *Anaplasma marginale*, um patógeno desafiador. A vacinação tem sido considerada a forma mais eficiente e eficaz de controle de *A. marginale* em todo o mundo. Atualmente, no mercado, vacinas de micro-organismos vivos e de micro-organismos

mortos ou inativados de *A. marginale* são comercializadas, porém ambas não são capazes de impedir a infecção nos bovinos. O desenvolvimento de uma nova vacina se faz necessário. Proteínas de membrana de *A. marginale* têm se destacado como potenciais candidatas a uma vacina eficaz. A tecnologia do DNA recombinante promete resultados promissores. Avanços em pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias são necessários para estender o conhecimento do complexo anaplasma-carrapato-bovino, para que assim, em breve, uma nova e efetiva alternativa de controle esteja disponível a pecuária mundial.

REFERÊNCIAS

- Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC 2005. Rapid and long-term disappearance of CD4⁺ T-lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein2 in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. *J Immunol* 174: 6702-6715.
- Abdala AA, Pipano E, Aguirre DH, Gaido AB, Zurbriggen MA, Mangold AJ, Guglielmone AA 1990. Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 43: 155-158.
- Agnes JT, Brayton KA, LaFollett M, Norimine J, Brown WC, Palmer GH 2011. Identification of *Anaplasma marginale* outer membrane protein antigens conserved between *A. marginale sensu stricto* strains and the live *A. marginale* subsp. *centrale* vaccine. *Infect Immun* 79: 1311-1318.
- Ajayi SA, Wilson AJ, Campbell RSF 1978. Experimental bovine anaplasmosis: Clinico-pathological and nutritional studies. *Res Vet Sci* 25: 76-81.
- Araújo FR 2005. *Avaliação das proteínas recombinantes MSP1a e MSP2 de Anaplasma marginale, associadas a oligonucleotídeo CpG 2006 como adjuvante, como imunógenos contra a anaplasmoze bovina*, Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 156 pp.
- Araújo FR, Costa CM, Ramos CAN, Farias TA, Souza IIF, Melo ESP, Elisei C, Rosinha GMS, Soares CO, Fragoso SP, Fonseca AH 2008. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 186-190.
- Araújo FR, Madruga CR, Soares CO, Kessler RH 2003. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 23: 139-148.
- Arulkanthan A, Brown WC, McGuire TC, Knowles DP 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 67: 3481-3287.

- Assis TS, Silva NCM, Ferreira MRA, Moreira CN 2009. Influência da transmissão transplacentária do *Anaplasma marginale* no hemograma e no metabolismo oxidativo dos neutrófilos (NTB) em bovinos. *Cien Anim Bras* 1: 631-636.
- Backert S, Meyer TF 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 9: 207-217.
- Barbet AF, Blentlinger R, Yi J, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect Immun* 67: 102-107.
- Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, Menk CF, De Almeida MAO, Melo EPS, Kessler RH 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 513-517.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32: 138-141.
- Baumgartner W, Schlerka G, Fumicz M, Stoger T, Awad-Masameh M, Schuller W, Weber P 1992. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale* infection of Austrian cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 39: 97-104.
- Blouin EF, Kocan KM 1998. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: ixodidae) cells. *J Med Entomol* 35: 788-797.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP Jr 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 844-849.
- Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF 2002. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Mol Microbiol* 43: 1151-1159.
- Brito LG, Oliveira MCS, Rocha RB, Netto FGS, Marim AD, Souza GCR, Vendrame FB, Moura MMF 2010. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south-western Amazonia. *Pesq Vet Bras* 30: 249-254.
- Brock WEIO, Kliwer CC, Pearson A 1965. A vaccine for anaplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 147: 948-951.
- Brown CG 1997. Dynamic and impact of tick-borne diseases of cattle. *Trop Anim Health Prod* 29: 1S-3S.
- Brown WC 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. In press. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014795711100110X>.

- Brown WC, McGuire TC, Zhu D, Lewin HA, Sosnow J, Palmer GH 2001. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. *J Immunol* 166: 1114-1124.
- Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH 1998. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun* 66: 5406-5413.
- Caeiro V 1999. General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia* 41: 11-15.
- Cascales E, Christie PJ 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 28: 137-148.
- Collins NE, Liebenberg J, De Villiers EP, Brayton KA, Louw E, Pretorius A, Faber FE, Van Heerden H, Josemans A, Van Kleef M, Steyn HC, Van Strijp MF, Zweygarth E, Jongejan F, Maillard JC, Berthier D, Botha M, Joubert F, Corton CH, Thomson NR, Allsopp MT, Allsopp BA 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 838-843.
- Costa MC, Flaiban KKM, Coneglian MM, Dognani R, Vettorato ED, Balarin MRS, Lisboa JAN 2008. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros das raças Nelore e Limousin nos primeiros quatro meses de vida. *Pesq Vet Bras* 28: 431-436.
- Costa VMM, Rodrigues AL, Medeiros JMA, Labruna MB, Simões SVD, Riet-Correa F 2011. Tristeza Parasitária Bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq Vet Bras* 31: 239-243.
- Dark MJ, Al-Khedery B, Barbet AF 2011. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 29: 4923-4932.
- De Almeida MB, Tortelli FP, Riet-Correa B, Ferreira JLM, Soares MP, Farias NA, Riet-Correa F, Schild AL 2006. Tristeza Parasitária Bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesq Vet Bras* 26: 237-242.
- De Andrade GM, Machado RZ, Vidotto MC, Vidotto O 2004. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Ann N Y Acad Sci* 1026: 257-266.
- De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 31: 145-153.
- De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Saliki JT, Kocan KM 2002. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 658-668.
- De la Fuente J, Passos LM, Van Den Bussche RA, Ribeiro MF, Facury-Filho EJ, Kocan KM 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 121: 307-316.

- Dikmans G 1950. The transmission of anaplasmosis. *Am J Vet Res* 11: 5-16.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2145-2165.
- Eriks IS, Stiller D, Palmer GH 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol* 31: 2091-2096.
- Estes DM, Closser NM, Allen GK 1994. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cell Immunol* 154: 287-295.
- Felsheim RF, Chávez AS, Palmer GH, Crosby L, Barbet AF, Kurtti TJ, Munderloh UG 2010. Transformation of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167: 167-174.
- Figueroa Millán JV, Rojas Ramírez EE, Ramos Aragón JA, Granjero Colín G, García Ortiz MA, Cantó Alarcón GJ, Santiago Valencia C, Parodi F 1999. Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. *Vet Mex* 30: 221-225.
- Foil LD, 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today* 5: 88-96.
- French DM, Brown WC, Palmer GH 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 67: 5834-5840.
- French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun* 66: 1200-1207.
- Gale KR, Dimmock CM, Gartside M, Leatch G 1996. *Anaplasma marginale*: Detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int J Parasitol* 26: 1103-1109.
- Gale KR, Leatch G, Gartside M, Dimmock CM 1992. *Anaplasma marginale*: Failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitol Res* 78: 410-415.
- Gillespie JJ, Brayton KA, Willians KP, Quevedo Diaz MA, Brown WC, Azad AF, Sobral BW 2010. Phylogenomics reveals a diverse *Rickettsiales* type IV secretion system. *Infect Immun* 78:1809-1823.
- Guedes Junior D, Araújo FR, Almeida Junior NF, Adi SS, Cheung LM, Fragoso SP, Ramos CA, Oliveira RH, Santos CS, Bacanelli G, Soares CO, Rosinha GM, Fonseca AH 2010. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 843-849.
- Gonçalves PM 2000. Epidemiologia e Controle da Tristeza Parasitária Bovina na região sudeste do Brasil. *Ciêñ Rural* 30: 187:194.

- Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE 2004. Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 72: 2160-2169.
- Grisi L, Massard CL, Moyaborja GE, Pereira JB 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 21: 8-10.
- Guglielmone AA 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-119.
- Han S, Norimine J, Palmer GH, Mwangi W, Lahmers KK, Brown WC 2008. Rapid deletion of antigen-specific CD4⁺ T cells following infection represents a strategy of immune evasion and persistence for *Anaplasma marginale*. *J Immunol* 181: 7759-7769.
- Henry ET, Norman BB, Fly DE, Wichmann RW, York SM 1983. Effects and use of modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J Am Vet Med Assoc* 183: 66-69.
- Herndon DR, Palmer GH, Shkap V, Knowles DP Jr, Brayton KA 2010. Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *J Bacteriol* 192: 379-380.
- Hidalgo RJ 1975. Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. *Am J Vet Res* 36: 635-640.
- Hidalgo RJ, Jones EW, Brown JE, Ainsworth AJ 1989. *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *Am J Vet Res* 50: 2028-2032.
- Hidalgo RJ, Palmer GH, Jones EW, Brown JE, Ainsworth AJ 1989. Infectivity and antigenicity of *Anaplasma marginale* from tick cell culture. *Am J Vet Res* 50: 2033-2036.
- Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gönczi E, Deplazes P, Braun U, Engels M, Schüpbach J, Jörgen K, Thoma R, Griot C, Stärk KDC, Willi B, Schimidt J, Kocan KM, Lutz H 2004. Current infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol* 42: 3775-3780.
- Jones WE, Kliwer IO, Norman BB, Brock WE 1968. *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. *Am J Vet Res* 29: 535-544.
- Kano FS, Tamekuni K, Coelho AL, Garcia JL, Vidotto O, Itano EN, Vidotto MC 2008. Induced immune response of DNA vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 25: 522-527.
- Kessler RH, Ristic M 1979. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale*: Invasion of and development in noninfected erythrocytes. *Am J Vet Res* 40: 1774-1776.
- Kessler RH, Schenk MAM 1998. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In RH Kessler, MAM Schenk (Eds.), *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*, Embrapa-Gado de Corte, Campo Grande, MS, p. 47-67.

- Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun* 58: 1117-1119.
- Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF 2000. Anaplasmosis control past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* 916: 501-509.
- Kocan KM, De la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167: 95-107.
- Kocan KM, De la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 16: 698-712.
- Kocan KM, Halbur T, Blouin EF, Onet V, De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Saliki JT 2001. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet Parasitol* 102: 151-161.
- Krab IM, Parmeggiani A 1998. EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim Biophys Acta* 26: 1443-1449.
- Kuttler KL, Zaugg JL 1988. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop Anim Health Prod* 20: 85-91.
- Kuttler KL, Zaugg JL, Johnson LW 1984. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am J Vet Res* 45: 2223-2226.
- Liu Z, Luo J, Bai Q, Ma M, Guan G, Yin H 2005. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in china for phylogenetics analysis. *Vet Microbiol* 107: 145-148.
- Lockwood S, Voth DE, Brayton KA, Beare PA, Brown WC, Heinzen RA, Broschat SL 2011. Identification of *Anaplasma marginale* type IV secretion system effector proteins. *PLoS One* 6: e27724.
- Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun* 75: 2333-2342.
- Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, Brown WC 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun* 73: 8109-8118.
- Madruga CR, Araújo FR, Soares CO 2001. Protocolos de técnicas. In CR Madruga, FR Araújo, CO Soares (Orgs.), *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*, Embrapa-Gado de Corte, Campo Grande, MS, p. 245-246.
- Madruga CR, Kessler RH, Sacco AMS 1986. *Produção de antígenos e análise preliminar do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico de anticorpos contra Anaplasma marginale*. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, MS, 1986. 4 pp.

- Marana ERM, Dias JA, Freire RL, Vicentini JC, Vidotto MC, Vidotto O 2009. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 20-26.
- Marble DW, Hanks MA 1972. A tissue culture method for *Anaplasma marginale*. *Cornell Vet* 62: 196-205.
- Marques MA, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MC 1998. Mapping and identification of major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 66: 2625-2631.
- Mazzola V, Amerault TE, Roby TO 1979. Electron microscope studies of *Anaplasma marginale* in an *Aedes albopictus* culture system. *Am J Vet Res* 40: 1812-1815.
- McGarey DJ, Allred DR 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect Immun* 62: 4587-4593.
- Montenegro-James S, James MA, Toro Benítez M, León E, Baek BK, Guillén AT 1991. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol Res* 77: 93-101.
- Munderloh UG, Blouin EF, Kocan KM, Ge NL, Edwards WL, Kurtti TJ 1996. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae) borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J Med Entomol* 33: 656-664.
- Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 101: 53-64.
- Mwangi W, Brown WC, Splitter GA, Davies CJ, Howard CJ, Hope JC, Aida Y, Zhuang Y, Hunter BJ, Palmer GH 2007. DNA vaccine construct incorporating intercellular trafficking and intracellular targeting motifs effectively primes and induces memory B- and T-cell responses in outbred animals. *Clin Vaccine Immunol* 14: 304-311.
- Noh SM, Ueti MW, Palmer GH, Munderloh UG, Felsheim RF, Brayton KA, 2010. Stability and tick transmission phenotype of gfp-transformed *Anaplasma marginale* through a complete in vivo infection cycle. *Appl Environ Microbiol* 77: 330-334.
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF 1993. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 61: 5245-5251.
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF, McGuire TC 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 56: 1567-1573.
- Ohashi N, Zhi N, Lin Q, Rikihisa Y 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect Immun* 70: 2128-2138.

- Ooshiro M, Zakimi S, Matsukawa Y, Yafuso M, Katagiri Y, Inokuma H 2009. *Anaplasma marginale* infection in a Japanese black cow 13 years after eradication of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Okinawa, Japan. *Vet parasitol* 160: 351-355.
- Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA 2009. “Nothing is permanent but change”-antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 11: 1697-1705.
- Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC 1989. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect Immun* 57: 3666-3669.
- Palmer GH, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC 1986. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science* 231: 1299-1302.
- Palmer GH, Brown WC, Noh SM, Brayton KA 2011. Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64: 115-119.
- Palmer GH, Eid G, Barbet AF, McGuire TC, McElwain TF 1994. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect Immun* 62: 3808- 3816.
- Palmer GH, McGuire TC 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol* 133: 1010-1015.
- Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol* 47: 235-251.
- Rajput ZI, Hu SH, Arijo AG, Habib M, Khalid M 2005. Comparative study of *Anaplasma parasites* in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 1057-1062.
- Ribeiro BMF, Reis R, Patarroyo JHS 1980. Avaliação da vacina atenuada de *Anaplasma marginale* em bezerros mantidos em piquetes. *Arq Esc Vet UFMG* 32: 251-258.
- Riding G, Hope M, Waltisbuhl D, Willadsen P 2003. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 21: 1874-1883.
- Rikihisa Y 2003. Mechanisms to create a safe haven by members of the family *Anaplasmataceae*. *Ann N Y Acad Sci* 990: 548-555.
- Ristic M 1960. Structural characterization of *Anaplasma marginale* in acute and carrier infections. *J Am Vet Med Assoc* 136: 417-425.
- Ristic M, Sibinovic S, Welter CJ 1968. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 72: 56-69.
- Sacco AMS, Kessler RH, Madruga CR 2001. Cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* como imunógenos no controle da Tristeza Parasitária Bovina. *Cien Rural* 31: 849-855.

- Samish M, Pipano E, Hana B 1988. Cultivation of *Anaplasma marginale* from cattle in a Dermacentor cell line. *Am J Vet Res* 49: 254-256.
- Sharma AK, Khuller GK 2001. DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol Cell Biol* 79: 537-546.
- Sharma SP, Bansal GC 1986. Immune responses in cattle vaccinated with gamma-irradiated *Anaplasma marginale*. *Indian J Anim Sci* 56: 490-493.
- Shkap V, Molad T, Fish L, Palmer GH 2002. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. *Parasitol Res* 88: 546-552.
- Shkap V, Pipano E, McGuire TC, Palmer GH 1991. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet Immunol Immunopathol* 29: 31-40.
- Siqueira CLM 1998. *Complexo da MSP-2 de Anaplasma marginale: peptídeos sintéticos e predição computacional: uma nova proposta*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 130 pp.
- Suarez CE, Noh S 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol* 180: 109-125.
- Sutten EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, Brayton KA, Gillespie JJ, Brown WC 2010. *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 are immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine. *Infect Immun* 78: 1314-1325.
- Tebele N, McGuire TC, Palmer GH 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun* 59: 3199-3204.
- Tebele N, Palmer GH, 1991. Crossprotective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Trop Anim Health Prod* 23: 197-202.
- Theiler A 1910. *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In A. Theiler (Ed.), *Report of the Government Veterinary Bacteriologist*, Department of Agriculture, Transvaal (Colony), p. 1908-1909.
- Tomich RGP, Pellegrin AO, Serra CV, Ribeiro MFB, Passos LMF, Barbosa-Stancioli EF 2004. Estudo de doenças bovinas em assentamentos rurais do Município de Corumbá, MS – resultados iniciais. In: *IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. Corumbá/MS
- Tuo W, Palmer GH, McGuire TC, Zhu D, Brown WC 2000. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 68: 270-280.
- Valdez RA, McGuire TC, Brown WC, Davis WC, Jordan JM, Knowles DP 2002. Selective in vivo depletion of CD4⁺ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 417-424.

- Van Drunen Little-van den Hurk, Loehr SBI, Babiuk LA 2001. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine* 19: 2474-2479.
- Vidotto MC, Venâncio EJ, Vidotto O 2008. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolate from Paraná State, Brazil. *Genet Mol Res* 7: 460-466
- Von Donkersgoed JV, Gertonson A, Bridges M, Rath D, Dargatz D, Wagner B, Boughton A, Knoop D, Walton TE 2004. Prevalence of antibodies to bluetongue virus and *Anaplasma marginale* in Montana yearling cattle entering Alberta feedlots: Fall 2001. *Can Vet J* 45: 486-492.
- Waghela SD, Cruz D, Droleskey RE, Deloach JR, Wagner GG 1997. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. *Vet Parasitol* 73: 43-52.
- Waghela SD, Melendy D, Cruz D, Wagner GG 2000. Antigenic analysis of *Anaplasma marginale* grown in bovine erythrocytes co-cultured with bovine endothelial cells. *Vet Parasitol* 94: 133-139.
- Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 40: 187-199.
- Zaugg JL 1985. *Bovine anaplasmosis*: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res* 46: 570-572.

**Caracterização da Imunogenicidade das Proteínas Recombinantes Virb9,
Virb10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma
marginale* em Camundongos**

***Characterization of the immunogenicity of recombinant proteins VirB9, VirB10
and Elongation Factor Tu of Anaplasma marginale in mice***

Ana Beatriz Canevari Castelão^{*1}, Flávio Ribeiro de Araújo², Lenita Ramires dos Santos²,
Carlos Alberto do Nascimento Ramos³, Carina Elisei³, Grácia Maria Soares Rosinha², Cleber
Oliveira Soares²

¹ Aluna da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campo Grande, MS, Brasil.

² Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

³ Bolsista DTI-CNPq.

Suporte financeiro: FUNDECT, Embrapa Gado de Corte.

Agradecimentos:

A Aline Ariano da Silva e Nádia Caroline Sobrinho Gaúna pelo auxílio experimental, Renato
Henrique Marçal pelo suporte laboratorial e Instituto Oswaldo Cruz (Salvador, BA) e Instituto
de Pesquisa Energéticas e Nucleares pela irradiação das proteínas.

Periódico: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

^{*} Autor para correspondência: Ana Beatriz Canevari Castelão; endereço: Embrapa – Centro Nacional de
Pesquisa em Gado de Corte, BR 262, km 4, CEP 79.002-970, Campo Grande, MS, Telefone: +55 (67) 3368-
2085 Fax: +55 (67) 3368-2150; e-mail: anabia_85@yahoo.com.br.

Resumo

Considerando as limitações dos atuais métodos de controle contra a anaplasmoze bovina, o desenvolvimento de uma vacina efetiva se faz necessário. A partir do advento da análise genômica e proteômica novas proteínas de membrana de *Anaplasma marginale* foram identificadas como possíveis candidatas a componentes de uma vacina. Entre elas estão VirB9, VirB10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos (EF-Tu). Embora estas proteínas ainda não estejam bem caracterizadas na membrana de *A. marginale*, a produção destas na forma recombinante (rVirB 9, rVirB10 e rEF-Tu) foi realizada, mas as mesmas ainda não foram exploradas em formulações vacinais. Neste trabalho avaliou-se o uso de rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu como imunógenos em camundongos emulsionadas em adjuvante Montanide. Nas condições testadas verificou-se a indução de forte resposta imune humoral com a produção de IgG1 e IgG2a. Esplenócitos de 50% dos animais, que foram injetados com rVirB9, produziram Interferon-gama acima do limite de detecção, sinalizando assim indícios de resposta imune celular específica para esta proteína. Desta forma, verificou-se que é possível utilizar tais proteínas para indução de resposta imune específica, particularmente do tipo humoral. Assim, novas avaliações necessitam ser realizadas com a finalidade de ajustar o perfil de resposta imune obtido e então avançar para a realização de testes no modelo bovino.

Unitermos: *Anaplasma marginale*, Proteínas Recombinantes, Resposta Imune, Vacina.

Summary

Considering the limitations of currently used control measures for anaplasmosis, the development of a more effective vaccine is necessary. Previous studies using proteomic and genomic approaches have identified new membrane proteins in *Anaplasma marginale* that may be candidates for vaccines, such as VirB9, VirB10 and elongation factor-Tu (EF-Tu). Although the role of these proteins has not been well characterized in the membrane of *A. marginale*, the production of the recombinant proteins rVirB9, rVirB10, rEF-Tu has been achieved. However, these recombinant proteins have not yet been investigated in vaccine formulations. The present study describes the use of rVirB9, rVirB10 and rEF-Tu emulsified in adjuvant Montanide in mice. Under these conditions, a strong humoral immune response was induced, with both IgG1 and IgG2a production. Splenocytes in 50% of the animals that received rVirB9 produced gamma interferon above the detection limit,

indicting a specific cellular immune response to this protein. Thus, these proteins can be used to induce a specific immune response, particularly a humoral immune response. Additional studies need to be carried out to adjust the profile of the immune response in order to perform tests on cattle.

Uniterms: *Anaplasma marginale*, Recombinant Proteins, Immune Response, Vaccine.

Introdução

A anaplasmosse bovina é uma doença hemolítica causada pela riquetsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*.¹ Esse micro-organismo ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, ocasionando importantes perdas econômicas na pecuária de corte e de leite, sendo transmitida principalmente por carrapatos ixodídeos.² Os sinais clínicos dessa enfermidade incluem febre, perda de peso, anemia, aborto e letargia. A morte ocorre principalmente em animais acima de dois anos.^{1,3} Os animais que sobrevivem à fase aguda da anaplasmosse tornam-se persistentemente infectados, apresentando baixas riquetsemias cíclicas, não detectáveis microscopicamente (10^4 a 10^6 eritrócitos infectados/mililitro de sangue), servindo então como reservatórios naturais de *A. marginale*.⁴

O controle da anaplasmosse pode ser realizado por diferentes técnicas, entre elas, redução da população dos vetores e quimioprofilaxia. Entretanto a forma mais econômica e eficiente para controle desta enfermidade tem sido a vacinação.¹ No entanto, as vacinais comerciais atualmente disponíveis, oriundas de eritrócitos infectados, apresentam diversas limitações, como efeitos adversos em algumas categorias de animais, sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e consequente isoeritrolise neonatal em bezerros e no caso das premunições, possibilidade de veiculação de agentes patogênicos.⁵ A busca por uma vacina que proteja os bovinos contra a doença, sem os inconvenientes das vacinas atuais, é o grande objetivo das pesquisas com subunidades de *A. marginale*.

As proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* são foco das pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas vacinas contra anaplasmosse. Isso ocorre principalmente porque essas proteínas estão expostas na superfície da riquetsia, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, algumas delas desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito, tais como aderência e invasão dos eritrócitos do hospedeiro e transporte de nutrientes.⁶ As primeiras proteínas de membrana de

A. marginale purificadas e avaliadas como imunógenos, as proteínas principais de superfície (MSPs), não foram capazes de promover proteção similar àquela obtida com o uso de corpúsculos de inclusão tampouco com o uso de preparações de membrana externa de *A. marginale*.⁷

Com o advento da análise genômica e, quase que simultaneamente, proteômica de *A. marginale*, um novo leque de proteínas de membrana e/ou associadas à membrana da riquetsia foi identificado.^{8,9,10} Estudos iniciais foram realizados apontando algumas proteínas como alvo em potencial.^{11,12} Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade imunogênica de rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu de *A. marginale* emulsionadas em adjuvante Montanide, em camundongos BALB/c (animal experimental de fácil manipulação, reprodutível e econômico), para avaliar a utilização dessas proteínas recombinantes como possíveis candidatas a componentes de uma vacina contra anaplasmoze em bovinos.

Materiais e Métodos

Produção e Purificação de rVirB9, rVirB10, rEF-Tu de *Anaplasma marginale*

A produção das proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e EF-Tu foi realizada conforme descrito em Araújo et al.¹¹. Brevemente, *Escherichia coli* Rosetta foi transformada com os plasmídeos *pET47b-virb9*, *pET47b-virb10* e *pET47b-ef-tu* respectivamente e induzidas com Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). As proteínas rVirB9 e rEF-Tu foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna agarose níquel (HisTrap, GE HealthCare); a proteína rVirB10 foi purificada por eletroeluição em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Verificou-se a pureza das proteínas obtidas por eletroforese em SDS-PAGE, corado com azul brilhante de *Coomassie*. As proteínas recombinantes foram quantificadas por meio do método Lowry (1951)¹³. A avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes foi realizada por meio de *Western Blot*, utilizando anticorpos específicos das espécies bovina e murino (dados não mostrados).

Imunização dos Camundongos

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram mantidos no biotério da Embrapa Gado de Corte, sob condições adequadas de temperatura e umidade e receberam alimentação e água *ad libitum*. O uso de animais experimentais neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica Dom Bosco (Protocolo n. 035/2009A). Os animais foram separados aleatoriamente em cinco grupos de 8 animais, denominados: Salina, Montanide, rVirB9/Montanide, rVirB10/Montanide e rEF-Tu/Montanide. Os grupos Salina e Montanide representam os grupos controle do experimento, os quais foram injetados com solução salina 0,9% e *Montanide ISA 70M VG* (Seppic), respectivamente. Os demais grupos foram injetados com 30 µg de cada proteína recombinante emulsionada ao adjuvante, volume de 200 µL/dose, em três aplicações subcutâneas, com intervalos de 21 dias. Após 10 dias da última injeção coletou-se sangue dos animais, obtendo-se então soro, o qual foi utilizado posteriormente para a realização de ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) e *Western blot*.

Avaliação da Resposta Imune Humoral

A resposta imune humoral foi avaliada pela titulação dos níveis de IgG, IgG1 e IgG2a por meio de ELISA indireto (padronizados previamente para determinação das concentrações ótimas de antígenos, diluições de soro e conjugado por titulação cruzada) utilizando as proteínas rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu, previamente solubilizadas em 2% de SDS.¹⁴ Para tanto, placas de 96 poços (Costar 3590) foram adsorvidas com 30 ng/poço de rVirB9, rVirB10 ou rEF-Tu diluídas em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (100 µL/poço) e incubadas por uma noite a 4°C. As concentrações de uso foram determinadas previamente. As placas foram bloqueadas com PBS com 0,05% de tween 20 (PBST) com 10% de leite desnatado, por 1 hora a 37°C. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas a 1:200 ou em diluição seriada (determinação de títulos) e incubadas por 1 hora a 37°C. Para a avaliação da produção de IgG total, o conjugado anti-IgG de camundongo com peroxidase (Sigma) foi diluído 1:10.000 e para a avaliação das subclasses foram utilizados os anticorpos biotinilados anti-IgG1 e anti-IgG2a (BD Pharmingen) diluídos a 1:500 seguido de incubação com estreptoavidina conjugada a peroxidase (R&D Systems). As reações enzimáticas foram reveladas com TMB peroxidase (Sigma), durante 12 minutos e interrompidas com 50 µL/poço de H₂SO₄ (2,5 N).

As densidades ópticas foram determinadas por espectrometria em leitor de ELISA com filtro de 450 nm. A linha de corte foi determinada baseado em Frey et al.¹⁵. A titulação é representativa da recíproca da maior diluição com resultado positivo (igual ou superior à linha de corte).

Avaliação da Resposta Imune Celular

Após 15 dias da última injeção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os baços foram removidos assepticamente. Suspensões celulares de esplenócitos foram preparadas para cada animal em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM 1-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), e 50 mM 2-ME (Sigma Immunochemicals). Os eritrócitos foram removidos por lise com água destilada e os esplenócitos obtidos foram então adicionados em placas de 24 poços a 2×10^6 /poço e cultivados com 10 µg/mL rVirB9, rVirB10, rEF-Tu (Lopez et al. 2007) ou meio de cultura por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida. Concanavalina A foi usada na concentração de 2,5 µg/mL como controle positivo de estimulação de linfócitos. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados a 400 xg por 10 minutos a 4°C para a remoção de células, e armazenados a -70°C. As condições de obtenção e cultivo das células foram previamente estabelecidas. A detecção/quantificação de IFN-γ foi realizada utilizando um sistema de ELISA de captura comercialmente disponível (R&D Systems), seguindo-se as instruções do fabricante.

Análise Estatística

Para comparação da produção de anticorpos entre os grupos (valores de densidade óptica) e produção de IFN-γ foi aplicado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de comparação múltipla de Dunn's. Para comparação das médias geométricas de subclasses de IgG foi utilizado teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados

Os valores de densidade óptica dos ELISAs indiretos, contra cada uma das proteínas

recombinantes, obtidos dos grupos controles negativos (Salina e Montanide) foram utilizados para cálculo da linha de corte. Todos os camundongos injetados com cada uma das proteínas recombinantes emulsionadas em *Montanide* produziram anticorpos específicos do tipo IgG (Figura 1). Para cada um dos grupos foi estabelecido média $\pm$ desvio padrão () com os valores de densidade óptica obtidos, sendo $1,679 \pm 0,443$ para rVirB9 (Figura 1A), $1,670 \pm 0,238$ para rVirB10 (Figura 1B) e $0,989 \pm 0,538$ para EF-Tu (Figura 1C). A comparação entre as médias dos valores de densidade óptica dos grupos testes em relação aos grupos controles mostrou que houve diferença estatística significativa referente a produção de anticorpos ($p < 0,05$). Essa produção de anticorpos foi caracterizada por títulos elevados (média geométrica dos valores da recíproca da diluição de três experimentos): rVirB9 802.671, rVirB10 561.653 e rEF-Tu 23.319, determinados por meio de diluição seriada. As proteínas rVirB9 e rVirB10 desencadearam uma produção mais intensa de anticorpos quando comparada com a proteína rEF-Tu ($p < 0,05$).

Em análise subsequente, a produção das subclasses de IgG foi avaliada. Soros obtidos antes do início das injeções foram utilizados como controles negativos. Amostras obtidas dez dias após a última injeção de rVirB9, rVirB10 ou rEF-Tu apresentaram valores de densidade óptica acima da linha de corte estabelecida para cada um dos ensaios. Deste modo, a produção de IgG1 e IgG2a foi induzida em todos os grupos testados (Figura 2). Pela análise estatística revelou-se que esta produção foi significativa em relação aos controles ($p < 0,05$). A proporção da produção de IgG2a/IgG1 foi analisada com base nos valores de média geométrica dos títulos finais que foram determinados para cada uma das proteínas. Assim, os níveis de IgG1 foram superiores aos níveis encontrados para IgG2a ($p < 0,05$), sendo esta proporção nos valores de: rVirB9 0,57, rVirB10 0,6396 e rEF-Tu 0,239, ou seja, todos os valores estando abaixo de 1.

A produção de IFN- γ por células estimuladas *in vitro* com as proteínas recombinantes de *A. marginale* foi mensurada em sobrenadantes de culturas de esplenócitos. Houve produção de IFN- γ por células dos animais do grupo injetado com rVirB9 após estimulação com rVirB9 (Figura 3). Neste grupo, 50% da população testada apresentaram níveis de IFN- γ acima do limite de detecção do ensaio (> 30 pg/mL). Essa produção ($170,7 \pm 251,4$ pg/mL) foi estatisticamente significativa quando comparada com os controles ($p < 0,05$). Nas condições avaliadas, células dos animais dos grupos testes rVirB10 e rEF-Tu não produziram IFN- γ quando estimuladas com as respectivas proteínas recombinantes, em níveis detectáveis pelo

ELISA de captura, ainda que tenha ocorrido produção no controle positivo do ensaio (dados não mostrados).

Discussão

A produção das proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e EF-Tu têm sido realizada por diversos grupos de pesquisa.^{11,12,16} VirB9 e VirB10 são proteínas do sistema de secreção do tipo IV (TFSS). Este sistema promove a secreção ou transferência de macromoléculas, proteínas ou complexos de proteína-DNA de uma célula para outra; importante para a sobrevivência e virulência de bactérias gram negativas.¹⁷ EF-Tu, embora esteja envolvida na fase de elongação da síntese proteica intracitoplasmática¹⁸, também está associada à membrana celular, sugerindo que esta proteína pode desempenhar papel importante como fator de adesão às células hospedeiras.¹⁹ Além destas características, de fato, há indicação de que VirB9, VirB10 e EF-Tu são componentes da fração protetora de membrana externa de *A. marginale*⁹ e ativam o sistema imune.^{11,12} Apesar destas informações, a imunogenicidade das formas recombinantes destas proteínas ainda não havia sido explorada.

O mecanismo de resposta imune contra a infecção por *A. marginale* em bovinos ainda não foi totalmente elucidado, mas há evidências de que esta resposta seja mediada principalmente por linfócitos T CD4+, que produzem IFN- γ , ativando macrófagos e estimulando linfócitos B a produzirem anticorpos da subclasse IgG2a.^{7,20} A presença isolada de anticorpos não é capaz de combater a riquetsia, fazendo-se necessária a ação conjunta da resposta imune humoral e celular.²¹ De fato, a opsonização, fagocitose e morte dos micro-organismos, mediada pelos anticorpos IgG2a e macrófagos ativados, parecem ser a peça fundamental para o controle desta riquetsia em bovinos.⁷ As primeiras avaliações antigênicas relacionadas a VirB9, VirB10 e EF-Tu de *A. marginale* apresentaram-se compatíveis ao modelo acima descrito. Anticorpos IgG2a específicos reconheceram tais proteínas, em suas formas recombinantes, como demonstrado pelo uso de soro de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados, assim como de animais imunizados com corpúsculo de membrana externa de *A. marginale*.^{11,12} Lopez et al.¹² também demonstraram a capacidade de indução de resposta celular, pela proliferação de linfócitos T e produção de IFN- γ na presença destas proteínas.

Neste estudo, o uso de rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu em camundongos, emulsionadas em

Montanide, induziu elevados títulos de anticorpos, além de que a subclasse IgG2a específica esteve presente em todos os animais injetados com tais proteínas. Diferentemente do esperado, nas condições utilizadas neste trabalho para avaliação do uso dessas proteínas em suas formas recombinantes, observa-se que a produção de IgG1 apresentou níveis maiores do que IgG2a. Resultados semelhantes foram observados por Kawasaki et al.²² ao avaliarem MSPs (Proteínas Principais de Superfície) associadas a ISCOM/ISCOMATRIX também em modelo murino. O adjuvante *Montanide ISA 70 M VG* (SEPPIC) é um adjuvante desenvolvido para preparo de emulsões do tipo água/óleo, particularmente para uso em bovinos e pequenos ruminantes (informações do fabricante). A capacidade de induzir forte resposta imune humoral e celular para antígenos associados, propiciando lenta liberação no sítio de injeção, foi a característica de eleição para a inclusão deste adjuvante neste estudo.^{23,24} Um método simples foi utilizado para preparação da emulsão garantindo a obtenção de diâmetros adequados para as partículas do adjuvante e mantendo a estabilidade da formulação vacinal.²⁵

É bem caracterizado que, no modelo murino, citocinas produzidas por células T ativadas induzem a troca de diferentes subclasses de anticorpos IgG.²⁶ Neste estudo, 50% da população de camundongos injetados com a proteína rVirB9 foi capaz de desenvolver uma resposta imune celular com produção de IFN- γ , acompanhando assim a produção de IgG2a. Para as proteínas rVirB10 e rEF-Tu não houve equivalência entre a produção de IgG2a e a detecção de IFN- γ . Essa discrepância pode ser explicada por uma baixa frequência de células T específicas, como discutido por Lopez et al.¹² em seu estudo com proteínas recombinantes do TFSS avaliadas *in vitro* contra células de bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale*.

Conclusões

A partir dos dados deste experimento é possível concluir que nas condições testadas rVirB9, rVirB10 e rEF-Tu são capazes de induzir forte resposta imune humoral, produzindo elevados títulos de IgG1 e IgG2a, embora os níveis de IgG1 estejam acima dos níveis encontrados para IgG2a, além de que rVirB9 também é capaz de induzir produção de IFN- γ após estimulação *in vitro*. Ainda se faz necessário o ajuste de algumas condições para que a resposta imune obtida possua características semelhantes às encontradas na proteção contra esta enfermidade, bem como a reprodução de novos experimentos no modelo bovino.

Referências

1. KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Review**, Washington, DC, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.
2. RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 990, p. 548-555, 2003.
3. AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental bovine anaplasmosis: Clinico-pathological and nutritional studies. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 76-81, 1978.
4. KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 58, n. 4, p. 1.117-1.119, 1990.
5. KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. (Ed.). **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998. p. 47-67.
6. DE LA FUENTE, J. GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 145-153, 2001.
7. BROWN, W. C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T. C.; TUO, W.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 66, n. 11, p. 5.406-5.413, 1998.
8. BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.
9. LOPEZ, J. E.; SIEMS, W. F.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; MCGUIRE, T. C.; NORIMINE, J.; BROWN, W. C. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 73, n. 12, p. 8.109-8.118, 2005.
10. DARK, M. J.; AL-KHEDERY, B.; BARBET, A. F. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, Guildford, v. 29, n. 31, p. 4.923-4.932, 2011.

11. ARAÚJO, F. R.; COSTA, C. M.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; SOUZA, I. I. F.; MELO, E.; ELISEI, C.; ROSINHA, G. M. S.; SOARES, C. O.; FRAGOSO, S. P.; FONSECA, A. H. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 186-190, 2008.
12. LOPEZ, J. E.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; DARK, M. J.; LEACH, S. E.; BROWN, W. C. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 75, n. 2, p. 2.333-2.342, 2007.
13. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
14. LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 19-26, 2002.
15. FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.
16. VIDOTTO, M. C.; VENÂNCIO, E. J.; VIDOTTO, O. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolate from Paraná State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 460-466, 2008.
17. CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: Conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 8, p. 354-360, 2000.
18. JONÁK J. Bacterial elongation factors EF-Tu, their mutants, chimeric forms, and domains: Isolation and purification. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 849, n. 1-2, p. 141-153, 2007.
19. GRANATO, D.; BERGONZELLI, G. E.; PRIDMORE, R. D.; MARVIN, L.; ROUVET, M.; CORTHE´SY-THEULAZ, I. E. Cell Surface-associated elongation factor Tu Mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 72, n. 4, p. 2.160-2.169, 2004.
20. ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. **Cellular Immunology**, New York, v. 154, n. 1, p. 287-295, 1994.
21. BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4⁺ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1); a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b; preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity**, Bethesda, MD, v. 69, n. 11, p. 6.853-6.862, 2001.

22. KAWASAKI, P. M.; KANO, F. S.; TAMEKUNI, K.; GARCIA, J. L.; MARANA, E. R. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 347-354, 2007.
23. MUTISO, J. M.; MACHARIA, J. C.; KARIUKI, T. M.; GICHERU, M. M. Montanide ISA 720 is more effective than BCG as adjuvant for *Leishmania* killed vaccine in BALB/c mice. **International Journal of Integrative Biology**, India, v. 7, n. 2, p. 107-116, 2009.
24. LANGELLOTTI, C. A.; PAPPALARDO, J. S.; QUATTROCCHI, V.; MONGINI, C.; ZAMORANO, P. Induction of specific cytotoxic activity for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization with different adjuvants. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 134-142, 2011.
25. MILES, A. P.; MCCLELLAN, H. A.; RAUSCH, K. M.; ZHU, D.; WHITMORE, M. D.; SINGH, S.; MARTIN, L. B.; WU, Y.; GIERSSING, B. K.; STOWERS, A. W.; LONG, C. A.; SAUL, A. Montanide® ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. **Vaccine**, Guildford, v. 23, n. 19, p. 2.530-2.539, 2005.
26. SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, New York, v. 236, v. 4.804, p. 944-947, 1987.
27. KANO, F. S.; TAMEKUNI, K.; COELHO, A. L.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O.; ITANO, E. N.; VIDOTTO, M. C. Induced immune response of DNA vaccine encoding na association MSP1a, MSP1b and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, Guildford, v. 26, n. 27-28, p. 3.522-3.527, 2008.
28. MWANGI, W.; BROWN, W. C.; SPLITTER, G. A.; DAVIES, C. J.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; AIDA, Y.; ZHUANG, Y.; HUNTER, B. J.; PALMER, G. H. DNA vaccine construct incorporating intercellular trafficking and intracellular targeting motifs effectively primes and induces memory B- and T-cell responses in outbred animals. **Clinical Vaccine of Immunology**, Washington, DC, v. 14, n. 3, p. 304-311, 2007.
29. MOURADOV, D.; KING, G.; ROSS, I. L.; FORWOOD, J. K.; HUME, D. A.; SINZ, A.; MARTIN, J. L.; KOBE, B.; HUBER, T. Protein structure determination using a combination of cross-linking, mass spectrometry, and molecular modeling. **Methods of Molecular Biology**, Clifton, v. 426, p. 459-474, 2008.

Figuras

Caracterização da Imunogenicidade das Proteínas Recombinantes Virb9, Virb10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma marginale* em Camundongos

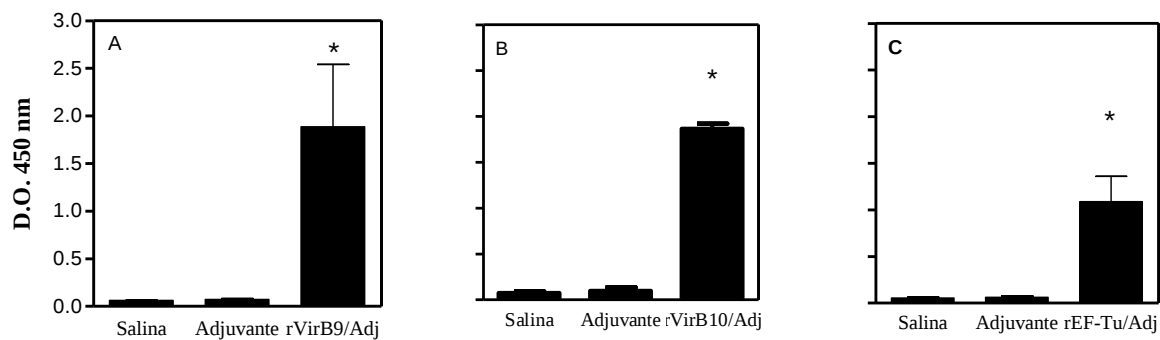


Figura 1: Produção de anticorpos IgG total. Camundongos BALB/c foram injetados com Salina, Adjuvante Montanide ou proteínas recombinantes de *Anaplasma marginale* emulsão em Montanide. Resultados de ELISA indireto contra (A) rVirB9, (B) rVirB10, (C) rEF-Tu, as barras representam as médias aritméticas com desvio padrão de cada um dos grupos. *Significância estatística entre grupos testes e seus respectivos controles ($p < 0,05$). Dados representativos de três experimentos.

**Caracterização da Imunogenicidade das Proteínas Recombinantes Virb9,
Virb10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma
marginale* em Camundongos**

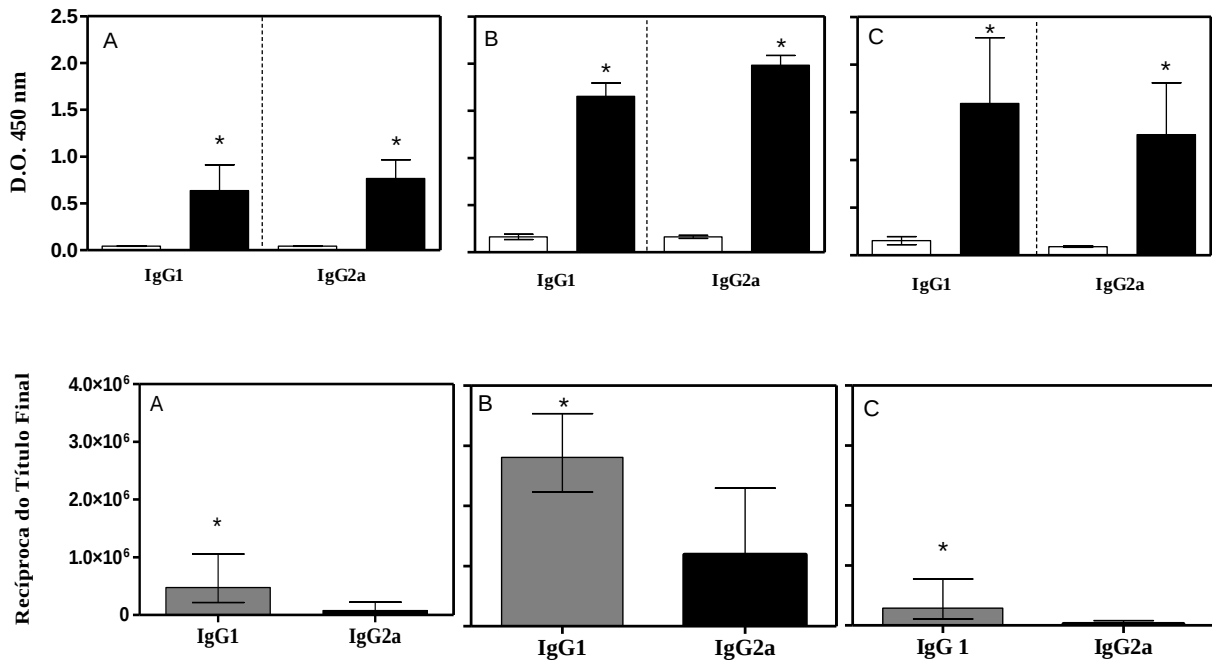


Figura 2: Produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a. Camundongos BALB/c foram injetados com proteínas recombinantes de *Anaplasma marginale* emulsionadas em Montanide. Nos gráficos superiores resultados de ELISA Indireto contra (A) rVirB9, (B) rVirB10, (C) rEF-Tu. As barras (abertas, pré-imune; fechadas, pós-imune) representam as médias aritméticas, com desvio padrão de cada um dos grupos. *Significância estatística entre amostras pós e pré imunes ($p < 0,05$). Nos gráficos inferiores recíproca dos títulos finais obtidos para cada subclasse a partir de ELISA Indireto contra (A) rVirB9, (B) rVirB10, (C) rEF-Tu. *Significância estatística entre IgG1 e IgG2a ($p < 0,05$). Dados representativos de três experimentos.

Caracterização da Imunogenicidade das Proteínas Recombinantes Virb9, Virb10 e Fator Termo Instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma marginale* em Camundongos

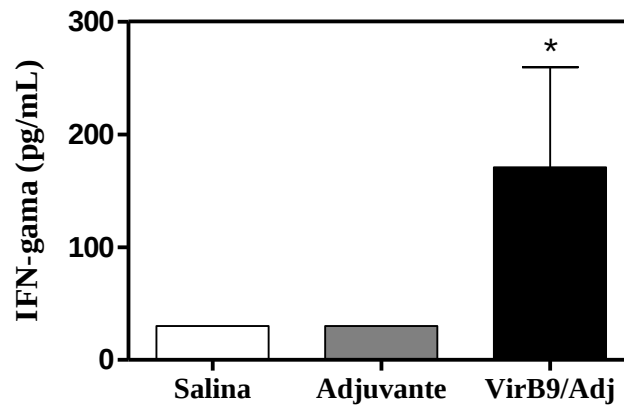


Figura 3: Produção de Interferon-gama após injeção de rVirB9/Adjuvante. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram obtidos após a última injeção de Salina, Salina/Montanide e rVirB9. As células foram cultivadas em meio de cultura ou rVirB9 (10 µg/mL) por 48h a 37° C. Os sobrenadantes foram analisados para IFN-gama por ELISA de captura. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão para cada grupo. *Significância estatística entre o grupo teste e seus controles ($p < 0,05$).