



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATIA TAMEKUNI

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
IMUNOGENICIDADE DO COMPLEXO PROTÉICO MSP1
RECOMBINANTE (RMSP1A E RMSP1B) DE ISOLADO
PARANAENSE DO ANAPLASMA MARGINALE**

Londrina
2006

KATIA TAMEKUNI

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
IMUNOGENICIDADE DO COMPLEXO PROTÉICO MSP1
RECOMBINANTE (RMSP1A E RMSP1B) DE ISOLADO
PARANAENSE DO ANAPLASMA MARGINALE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto
Co-orientadora: Profa. Dra. Marilda Vidotto

Londrina
2006

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T157p Tamekuni, Katia.
Produção, caracterização e avaliação da imunogenicidade do complexo protéico MSP1 recombinante (rMSP1a e rMSP1b) de isolado paranaense do *Anaplasma marginale* / Katia Tamekuni. – Londrina, 2006.
77f.: il.

Orientador: Odilon Vidotto.
Co-orientador: Marilda Vidotto.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Inclui Bibliografia.

1. Proteínas de membrana – Teses. 2. Clonagem molecular – Teses. 3. Bovino – Parasito – Teses. 4. Microbiologia veterinária – Teses. 5. Imunologia veterinária – Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 619:577.27
619:579

KATIA TAMEKUNI

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
IMUNOGENICIDADE DO COMPLEXO PROTÉICO MSP1
RECOMBINANTE (RMSP1A E RMSP1B) DE ISOLADO
PARANAENSE DO ANAPLASMA MARGINALE**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Odilon Vidotto

Prof. Dr. João Luis Garcia

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina, 16 de fevereiro de 2006.

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias e Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento desta dissertação foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa relacionados abaixo:

- 1. CAPES – Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior.**
- 2. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 3. PRO-PPG – Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Yasuo e Lili Tamekuni pelo amor, apoio e incentivo durante todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Cláudio, Cíntia e Eliana pelo carinho, amizade e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em todos os momentos de minha vida, que me fortaleceu e trouxe esperança para a realização dos meus sonhos.

Ao Prof. Odilon pela orientação, amizade e apoio em todos esses anos de graduação e mestrado.

A Profa. Marilda por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Molecular/CCB e pelo apoio e colaboração na realização deste experimento

Ao Prof. Amauri por disponibilizar o Laboratório de Virologia e a utilização de equipamentos. Agradeço também pelas correções e sugestões durante qualificação.

Ao Prof. João Luis Garcia pela contribuição, sugestões e principalmente a amizade e paciência durante a realização deste trabalho.

A Profa. Rosângela Machado da UNESP/Jaboticabal pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. João Waine pelo fornecimento dos animais e pela autorização do uso do galpão e aos funcionários Antônio e Pedro pela ajuda e pelo apoio.

A Profa. Janis Gonzáles pela autorização na utilização do equipamento do Laboratório de Radiologia e aos funcionários seu Toninho, Klésio, Orlando pelo apoio e paciência.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela contribuição durante todo período deste experimento.

Aos funcionários Ademir, Dalva pela amizade, apoio e pela imensa ajuda durante todos os anos de graduação e de mestrado.

Ao funcionário José Aldevino Carvalho pela indispensável ajuda e por permitir a utilização do Laboratório de Microbiologia na realização deste experimento.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Kerlei e Kledir, pela amizade e incentivo.

Aos colegas funcionários e professores do Departamento de Microbiologia/CCB e ao Setor de Radiologia do Hospital das Clínicas pela autorização da utilização de equipamentos para a realização deste experimento.

Aos amigos de Pós-Graduação Vanessa, Eleine, Betinha, Jú Dias, Marlise, Alexandre, Letícia, Juliana Galhardo, Melissa, Mykel (Dunga), Grazielle, Daniel (Frango), Marcus Vinícius (Dengoso), Rafael Salmazo, Adriana Rosa, Mara e Fábio Galli pelo companheirismo, amizade e momentos de alegrias.

As amigas Jussevânia, Marisa, Renata do Laboratório de Microbiologia/CCB pela imensa ajuda, apoio nos momentos difíceis, pelo bom humor e pela grande amizade que se tornou eterna.

As amigas Michelle, Flora e Paula que são mais do que minhas amigas, tornaram-se minhas irmãs que sempre estiveram do meu lado me apoiando e me ajudando nos momentos de muitas dificuldades, pelo incentivo de continuar lutando pelos meus sonhos e principalmente por estarem presente nos momentos de alegrias.

As Estagiárias Daniela e Adriana pela paciência e companhia na realização deste trabalho.

A todos que colaboraram na realização deste experimento.

TAMEKUNI, Katia. **Produção, caracterização e avaliação da imunogenicidade do complexo protéico MSP1 recombinante (rMSP1a e rMSP1b) de isolado paranaense do *Anaplasma marginale***. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RESUMO

O *Anaplasma marginale* (ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae) é o agente etiológico da anaplasmoze bovina. Esta doença ocorre mundialmente, com maior frequência nas regiões tropicais e subtropicais, determinando perdas econômicas consideráveis à pecuária bovina. O *A. marginale* possui seis proteínas principais de superfície designadas de MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5. A proteína MSP1a tem massa molecular de 105kDa e a MSP1b de 100kDa. Os objetivos deste trabalho foram clonar, produzir, caracterizar as MSP1a e MSP1b recombinantes (rMSP1a e rMSP1b) e avaliar a resposta imune humoral de camundongos imunizados com a *Escherichia coli* BL21 recombinante expressando estas proteínas. Os genes *msp1 α* e *msp1 β* foram obtidos pela PCR de um isolado Paranaense de *A. marginale* e clonados em vetores pET102 e pET101/D-TOPO, respectivamente. Após a certificação da inserção dos genes nos vetores, as proteínas foram induzidas com IPTG e purificadas em colunas de resina ligadas ao níquel. As proteínas rMSP1a e rMSP1b separadas em SDS-PAGE, reagiram com soros anti-rMSP1a e anti-rMSP1b produzidos em coelhos, pelo Western blotting, mostrando massas moleculares de 70kDa a 105kDa e 100kDa, respectivamente. A BL21/rMSP1a e a BL21/rMSP1b aglutinaram as hemácias de bovinos e esta hemaglutinação foi inibida na presença de IgY anti-rMSP1a e anti-rMSP1b, confirmando a função de adesão destas proteínas. A reação de IFI realizada com as IgY anti-rMSP1a e IgY anti-rMSP1b, produzidas em galinhas, demonstraram a presença destas proteínas na membrana externa das *E. coli* BL21 recombinantes. As BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b também foram utilizadas para imunizar camundongos Balb/c para avaliação de produção de IgG total e IgG2a, por meio de técnica de ELISA. Os animais imunizados com BL21/rMSP1a tiveram uma forte resposta humoral (IgG total e IgG2a), enquanto que os camundongos imunizados com a BL21/rMSP1b apresentaram uma fraca resposta após as três primeiras imunizações. Pelo Western blotting foi detectado, resposta de IgG total contra as proteínas rMSP1a e rMSP1b. Soros de camundongos imunizados com BL21/rMSP1a reagiram com a BL21 e rMSP1a com massas moleculares variando de 70 a 105 kDa e uma banda de 20 kDa sugerindo a quebra da proteína. Soros de animais imunizados com a BL21/rMSP1b reagiram com a BL21 e rMSP1b com massa molecular de 100 kDa. Os resultados deste trabalho confirmam o papel das MSP1a e MSP1b como adesinas no processo de invasão de eritrócitos e evidenciam a importância destas proteínas na elaboração de uma vacina de subunidades para o controle da anaplasmoze bovina. Também demonstram que as BL21 expressando as rMSP1a e a rMSP1b na membrana externa são capazes de produzir resposta imune em camundongos.

Palavras-chave: Bovinos. *Anaplasma marginale*. Clonagem. MSPs.

ABSTRACT

The *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is a pathogen that cause bovine anaplasmosis. This disease occurs in world wide, and it is more frequently in tropical and subtropical areas, causing important economic losses in cattle herds. Six Major Surface Protein (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 and MSP5) have been identified in *A. marginale*. The function of MSP1a and MSP1b is adhesion in bovine erythrocytes and tick cells. The molecular mass of these proteins is 105kDa for MSP1a and 100kDa for MSP1b. The objectives of this work were clone, produce and characterize recombinant proteins from MSP1a and MSP1 and to evaluate the humoral immune responses in mice immunized with *Escherichia coli* BL21 recombinant expressing rMSP1a and rMSP1 of *A. marginale*. The *msp1 α* and *msp1 β* gene obtained from a PCR assay of *A. marginale* from Parana isolated, were cloned into vectors pET102 and pET101/D-TOPO, respectively. After certification of the recombinant vector construction, these vectors were transformed into *E. coli* BL21 Star and the proteins were expressed on *E. coli* BL21Star after induction by IPTG and purified in resin charged with the nickel ion. Antibodies anti-MSP1a and anti-MSP1b reacted with rMSP1a and MSP1b showing a molecular mass of 70 kDa to 105 kDa and 100 kDa, respectively. rMSP1a and rMSP1b were inoculated in chickens to produce IgY anti-MSPs. Bovine erythrocytes were agglutinated with BL21/rMSP1a and BL21/rMSP1b and, this agglutination was inhibited by the presence of the IgY anti rMSP1a and rMSP1b, confirming the adhesion function of these proteins. Indirect immunofluorescence assay (IFA) was performed using IgY anti-rMSP1a and rMSP1b, and we observed reaction in the external membrane of the recombinant *E. coli* BL21. Additionally, Balb/c were immunized with BL21/rMSP1a and rMSP1b, and the production of whole IgG and IgG2a were determined by indirect ELISA. The animals immunized with BL21/rMSP1a had a strong humoral response (whole IgG and IgG2a), while the mice immunized with BL21/rMSP1b presented a weak response after three immunizations. Western blotting of whole IgG was detected against the proteins rMSP1a and rMSP1b. Sera of mice immunized with BL21/rMSP1a reacted with BL21 and rMSP1a with molecular masses varying from 70 to 105 kDa and a band of 20 kDa suggesting the break of the protein. Sera from mice immunized with BL21/rMSP1b reacted with BL21 and rMSP1b in a molecular mass of 100 kDa. In conclusion, the results confirmed the adhesion function of rMSP1a and rMSP1b in the bovine erythrocytes invasion mechanism and showed the importance of these recombinant proteins in the development of a new vaccine for the bovine anaplasmosis control. In addition these results also demonstrated that BL21 containing the rMSP1a and rMSP1b in the outer membrane are able to produce immune response in mice, and could be supposed that will also be able to induce protection against the bovine anaplasmosis.

Keywords: Bovine. *Anaplasma marginale*. Cloning. MSPs.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1** - Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% das clivagens dos plasmídios recombinantes com as endonucleases de restrição e amplificação dos genes a partir do plasmídio recombinante.....35
- Figura 2** - Gel de poliacrilamida 10% corada em comassie blue, ilustrando a indução da rMSP1a, a rMSP1a purificada e a extração de membrana externa (OMP) e Western blotting utilizando soro de coelho anti-MSP1a.....36
- Figura 3** - Gel de poliacrilamida 10% corada em comassie blue, representando a indução da MSP1b, a MSP1b purificada e a extração de membrana externa e Western blotting utilizando soro de coelho anti-MSP1b36
- Figura 4** - Western blotting utilizando IgY pré-imune e pós imune contra rMSP1a e rMSP1b37
- Figura 5** - Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando IgY pós-ímmunes contra as bactérias BL21 expressando as proteínas rMSP1a e rMSP1b37
- Figura 6** - Fotomicrografia de esfregaços de hemácias utilizadas na Hemaglutinação *in vitro* corados pelo Giemsa (objetiva de 100x) utilizando, as BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b e a BL21 não recombinante38
- Figura 7** - Fotomicrografia de esfregaços de hemácias utilizadas na Inibição de hemaglutinação *in vitro*, corados pelo Giemsa (objetiva de 100x), utilizando as IgY pós-ímmune contra as rMSP1a e rMSP1b.....38

ARTIGO 2

- Figura 1** - Resposta de IgG total em camundongos imunizados com BL21 e BL21 recombinantes55
- Figura 2** - Resposta de IgG2a em camundongos imunizados com BL21 e BL21 recombinantes56
- Figura 3** - Reação de IgG total produzida em grupos de camundongos imunizados com BL21 e BL21 recombinantes, pela técnica de Western blotting57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 ARTIGO 1: “CLONAGEM, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DAS PROTEÍNAS MSP1A E MSP1B RECOMBINANTES DE ISOLADO PARANAENSE (PR1) DO <i>ANAPLASMA MARGINALE</i>”	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
Material e Métodos	21
Resultados	27
Discussão	30
Referências	32
4 ARTIGO 2: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS BALB/C IMUNIZADOS COM <i>E. COLI</i> BL21 EXPRESSANDO MSP1A E MSP1B RECOMBINANTES DE <i>ANAPLASMA MARGINALE</i>”	39
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Material e Métodos	44
Resultados	47
Discussão	48
Perspectivas	50
Referências	51

5 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	63
Apêndice A	64

1 INTRODUÇÃO

O *Anaplasma marginale* é uma Proteobacteria da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001) que causa doença febril com anemia severa, abortos e mortes de animais, determinando prejuízos econômicos aos rebanhos bovinos, principalmente, de regiões tropicais e subtropicais (RISTIC, 1977; NAKAMURA et al., 1990).

Nos Estados Unidos, a perda anual causada pela anaplasmosose, devido à morbidade e mortalidade dos animais, é estimada em mais de 300 milhões de dólares e na América latina em aproximadamente de 800 milhões de dólares (KOCAN, 2003).

O *A. marginale* é transmitido biologicamente por carrapatos da família Ixodidae (KOCAN et al, 1981), sendo o *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) como principal transmissor na América Latina. A transmissão mecânica pode ocorrer pela picada de artrópodes (Tabanídeos, *Stomoxys calcitrans*, mosquitos), instrumento de castração, descorna e agulhas de vacinações contaminadas com sangue infectado (DIKMANS, 1950; KOCAN et al, 1981; 2003).

Animais que se recuperaram da doença aguda permanecem infectados, com parasitemias não detectáveis em esfregaços sanguíneos examinados ao microscópio óptico, tornando-se importantes reservatórios da doença (RICHEY & PALMER, 1990; TORIONI de ECHAIDE et al., 1998; KESSLER, 2001; KOCAN, 2003).

São conhecidas seis proteínas principais de superfície do corpúsculo inicial de *A. marginale*, que são denominadas de MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER, 1989; TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993; ALLEMAN et al., 1996). Estas proteínas são antigênicas e induzem a produção de anticorpos em animais que sofrem infecção natural ou vacinação com corpúsculos iniciais de *A. marginale* (TEBELE et al., 1991). As proteínas designadas de MSP1a e MSP1b, MSP4 e MSP5 estão presentes em isolados de diferentes regiões geográficas (PATARROYO et al., 1994; KNOWLES et al., 1996; KANO et al., 2002), tornando-as importantes na pesquisa como fonte de imunógenos para o diagnóstico (KNOWLES et al., 1996) e a imunoprofilaxia da infecção (PALMER et al., 1989b).

A MSP1 é um complexo proteico formado pela MSP1a e MSP1b, com massas moleculares em torno de 105kDa e 100kDa, respectivamente. Estas proteínas estão envolvidas na adesão de *A. marginale* em eritrócitos bovinos e células de carrapatos, sendo que a MSP1b tem importância na adesão de eritrócitos bovinos (McGAREY et al., 1994; PALMER et al., 1987; McGAREY & ALLRED, 1994).

A imunização de animais com o complexo MSP1 conferiu uma intensa proliferação de células mononucleares de sangue periférico e de células T-CD4⁺ contra isolados homólogos e heterólogos de *A. marginale*. Esta proliferação de células está relacionada com a participação de epitopos T conservados, que estão localizados na região C terminal da MSP1a, que estimula altos níveis de interferon γ . Porém, a proliferação celular contra a proteína MSP1b não foi significativa. A resposta humoral foi observada contra as MSP1a e MSP1b (BROWN et al, 2001).

Segundo Garcia-Garcia et al. (2003), a imunização de animais com antígenos de *A. marginale* estimulou forte resposta de células B após a imunização com a MSP1a, inibindo a infecção em eritrócitos bovinos.

MSP2 e MSP3 são proteínas codificadas por família multigene, e são descritas como não conservadas entre os vários isolados de *Anaplasma marginale* (ALLEMAN & BARBET, 1996; PALMER et al., 1994; PALMER et al., 2000). Estudos epidemiológicos e imunológicos utilizando diferentes MSPs revelaram que a proteína MSP5, em particular, apresenta características antigênicas que possibilitam o seu emprego como antígeno em ensaios de diagnóstico sorológico a anaplasnose bovina conferindo sensibilidade e especificidade aos testes (KNOWLES et al., 1996; TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

Dentre as técnicas utilizadas como diagnóstico estão a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), e a técnica de “nested” PCR (nPCR), que possibilitaram a detecção do *A. marginale* em bovinos durante a fase crônica da doença (TORIONI de ECHAIDE, 1998).

Outra técnica utilizada como diagnóstico, é o ensaio imunoenzimático por competição (cELISA), que tem sido utilizado para pesquisar anticorpos anti-proteínas de superfície e a sua distribuição em diversas regiões geográficas (VIDOTTO et al, 1998).

As vacinas existentes comercialmente, compostas por organismos mortos, vivos atenuados de *A. marginale* ou da cepa heteróloga de *A. centrale*,

apresentam limitações quanto à eficiência devido a sua incapacidade de proteger contra isolados heterólogos de *A. marginale* e pela indução de anticorpos que são transferidos pelo colostro e causam isoeritrólise dos recém nascidos (KUTTLER et al., 1984).

A proteção de animais imunizados com a membrana externa do *A. marginale* ou com a proteína purificada, está associada com o desenvolvimento de linfócitos T dependente de Interferon γ (IFN γ) e com altos títulos de imunoglobulina G (IgG) (BROWN, 1998; PALMER, 1986a; TEBELE, 1991).

Adjuvantes como oligodeoxynucleotídeos contendo Citosina dinucleotídeo fosfodiester guanina (CpG ODN) tem induzido ótima resposta, estimulando a proliferação de células B e a indução de interleucinas 6 e 12 (IL-6, IL-12) e IFN- γ , produzidos pelas células mononucleares do sangue periférico (ZHANG, 2003). Outro adjuvante que tem demonstrado boa resposta imune é o ISCOM, que é um complexo imunoestimulante composto do adjuvante Quil-A, colesterol e antígenos anfipáticos que estimulam a resposta imune humoral e celular (GUPTA, 1995).

A imunização de bovinos com imunógeno composto de membranas externas purificadas de *A. marginale* em matrix Quil-A estimulou altos títulos de anticorpos para as proteínas individuais e os animais imunizados foram uniformemente protegidos contra o desafio com amostras virulentas (COX & COULTER, 1997). Entretanto, a extração e a purificação das proteínas de membrana (MSPs) nativas de *A. marginale* em larga escala é praticamente impossível. Com isso, a utilização de bactérias recombinantes expressando MSP1a e MSP1b pode ser uma alternativa para a imunização de bovinos contra a *A. marginale*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Clonar, produzir e caracterizar as proteínas MSP1a e MSP1b recombinantes de *A. marginale* e avaliar resposta imune humoral em camundongos imunizados com a bactéria *Escherichia coli* (BL21) recombinante expressando as proteínas MSP1a e MSP1b.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar os genes *msp1 α* e *msp1 β* de *A. marginale* em vetor de expressão pET102 e pET101/D-TOPO;
- Produzir as MSP1a e MSP1b recombinantes de *A. marginale*;
- Caracterizar as proteínas recombinantes pela técnica de Western blotting;
- Avaliar a função das MSP1a e MSP1b como adesinas em hemácias de bovinos;
- Comprovar a presença das proteínas recombinantes na membrana externa da *E. coli* BL21 (OMP) pelo teste de imunofluorescência.
- Avaliar a resposta imune humoral de camundongos imunizados com a *E. coli* recombinante BL21/MSP1a e BL21/MSP1b.

3 ARTIGO 1
“CLONAGEM, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DAS
PROTEÍNAS MSP1A E MSP1B RECOMBINANTES DE ISOLADO PARANAENSE
(PR1) DO *ANAPLASMA MARGINALE*”

Clonagem, produção e caracterização antigênica das proteínas MSP1a e MSP1b recombinantes de isolado paranaense (PR1) do *Anaplasma marginale*

K. Tamekuni¹; F.S. Kano¹; P.M. Kawasaki¹; M. Igarashi¹; M.C. Vidotto²; A. C. Ataliba¹; O. Vidotto^{1*}

¹Depto. Medicina Veterinária Preventiva/CCA/UEL. ²Depto. de Microbiologia/CCB/UEL.
Caixa Postal 6001, CEP: 86051-970, Londrina, Pr. E-mail: vidotto@uel.br

Resumo

O *Anaplasma marginale* é uma bactéria intracelular obrigatória da família Anaplasmataceae, que se multiplica nos eritrócitos de bovinos determinando um quadro febril e hemolítico que provoca importantes perdas econômicas à pecuária bovina, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais. As proteínas MSP1a e MSP1b formam um complexo antigênico que está envolvido no processo de adesão e invasão de eritrócitos de bovinos e em células intestinais de carrapatos. O objetivo deste trabalho foi clonar, produzir e caracterizar as proteínas recombinantes MSP1a e MSP1b (rMSP1a e rMSP1b) do *A. marginale*. Os genes *msp1α* e *msp1β*, de *A. marginale*, obtidos pela PCR, foram clonados nos vetores pET102 e pET101/D-TOPO. Após a certificação da inserção dos genes nos vetores, as proteínas foram induzidas com IPTG e purificadas em colunas de resina ligadas ao níquel. No Western blotting os soros anti-rMSP1a e anti-rMSP1b produzidos em coelhos reagiram com a rMSP1a e a rMSP1b separadas em SDS-PAGE, mostrando massas moleculares de 70kDa a 105kDa e 100kDa, respectivamente. A BL21/rMSP1a e a BL21/rMSP1b aglutinaram hemácias de bovinos e esta hemaglutinação foi inibida na presença de IgY anti-rMSP1a e anti-rMSP1b, confirmando a função de adesão destas proteínas. A reação de IFI realizada com as IgY anti-rMSP1a e anti-rMSP1b, produzidas em galinhas, demonstraram a presença destas proteínas na membrana externa das *E. coli* BL21 recombinantes. Os resultados deste trabalho confirmam a função das MSP1a e MSP1b como adesinas no processo de invasão de eritrócitos e evidenciam a importância destas proteínas na elaboração de uma vacina de subunidades para o controle da anaplasmoze bovina.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, clonagem, MSP1a, MSP1b, IgY

Abstract

The *Anaplasma marginale* is a bacteria of the Anaplasmataceae family that have a obligate intraerythrocytic multiplication and causes important economic loss in tropical and subtropical areas, due to high morbidity and mortality in susceptible cattle. This disease is characterized by severe anemia and fever. The *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1) complex is formed by MSP1a and MSP1b. MSP1a was shown to be an adhesin for bovine erythrocytes and tick cells and MSP1b is adhesin only for the bovine erythrocytes. This work aims the production and characterization of the MSP1a and MSP1b recombinants of *A. marginale*. The *msp1 α* and *msp1 β* gene were cloned, using PCR with DNA of *A. marginale* from Parana isolated, into vectors pET102 and pET101/D-TOPO. After certification of the recombinant vectors construction, they were transformed into *E. coli* BL21 Star and the proteins were expressed on *E. coli* BL21Star after induction by IPTG and purified in resin charged with the nickel ion. Antibodies anti-MSP1a and anti-MSP1b reacted with rMSP1a and MSP1b showing a molecular mass of 70 kDa to 105 kDa and 100 kDa, respectively. Bovine erythrocytes were agglutinated by BL21/rMSP1a and BL21/rMSP1b and, this agglutination was inhabited by the presence of the IgY anti rMSP1a, confirming the adhesion function of these proteins. Additionally, using the IgY anti rMSP1a and rMSP1b in a IFI, it was confirmed the presence of rMSP1a and rMSP1b on the outer membrane of the recombinant *E. coli* BL21. In conclusion, the results confirm the adhesion function of rMSP1a and rMSP1b in the bovine erythrocytes invasion mechanism and show the importance of these recombinant proteins in the development of a new vaccine for the bovine anaplasmosis control.

Keywords: *Anaplasma marginale*, cloning, MSP1a, MSP1b, IgY

INTRODUÇÃO

A anaplasmosose bovina é uma enfermidade causada pelo *Anaplasma marginale* pertencente, a família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). Este é um patógeno de multiplicação intraeritrocítica obrigatória e causa importantes perdas econômicas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, devido ao quadro febril e hemolítico com anemia grave que determina altas taxas de morbidade e mortalidade em animais suscetíveis, (RICHEY & PALMER, 1990; KESSLER et al, 1992; KOCAN et al., 2003).

O corpúsculo inicial *Anaplasma marginale* é formado por seis proteínas principais de superfície designadas de MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER, 1989; TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993; ALLEMAN et al., 1996). Estas proteínas são antigênicas e induzem a produção de anticorpos em animais que sofrem infecção natural ou vacinação com corpúsculos iniciais de *A. marginale* (TEBELE et al., 1991).

A MSP1a e MSP1b compõem o complexo protéico MSP1. A MSP1a é codificada por um único gene *msp1 α* e a MSP1b codificada por dois genes *msp1 β 1* e *msp1 β 2* (BARBET et al., 1987; CAMACHO-NUEZ et al., 2000; de la FUENTE et al., 2005). A MSP1a apresenta massa molecular variável entre diferentes isolados de *A. marginale*, em função da variação do número de repetições de 28 ou 29 aminoácidos, localizados na porção amino terminal da proteína (ORBELE et al., 1988; ALLRED et al., 1990). Estas repetições determinam epitopos que são conservados em diversos isolados de *A. marginale* (MCGAREY et al., 1994; PALMER et al., 1987; ALLRED et al., 1990; KANO et al., 2002).

Estas proteínas MSP1a e MSP1b têm como função a adesão e invasão celular; a MSP1a está relacionada com o mecanismo de invasão em células

intestinais de carrapatos e eritrócitos bovinos e a MSP1b apenas com a invasão em eritrócitos bovinos (McGAREY et al., 1994; McGAREY & ALLRED, 1994; de la FUENTE, 2003).

O complexo protéico MSP1 induziu intensa proliferação de células mononucleares de sangue periférico e células TCD4⁺ em bovinos inoculados com isolados homólogos e heterólogos de *A. marginale* (PALMER et al., 1989a; BROWN et al, 2001). A proliferação de células mononucleares está relacionada com a participação de epitopos T conservados, que estão localizados na região C terminal da MSP1a, os quais estimulam altos níveis de interferon γ . Entretanto há uma fraca resposta imune celular contra a MSP1b. Uma intensa resposta imune humoral foi observada contra as MSP1a e MSP1b (BROWN et al, 2001).

O objetivo deste trabalho foi clonar, produzir e caracterizar as proteínas rMSP1a e rMSP1b do isolado paranaense de *A. marginale*.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA de Anaplasma marginale e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A extração de DNA foi realizada de acordo com o Kit Puregene Genta System®, utilizando sangue isolado de um bezerro Holandês parasitado com *Anaplasma marginale* da região de Londrina (PR1) (KANO et al., 2002).

A amplificação dos genes *msp1 α* e *msp1 β* foi obtida pela técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) confeccionados a partir de seqüências cadastradas no *GenBank* (N° M32871; N° M59845). Na posição 5' dos *primers* diretos foi adicionada a seqüência CACC, que é complementar ao vetor pET101/D-TOPO e pET102/D-TOPO, e nos *primers* reverso foram removidos os códons de parada. *msp1 α* F: 5' CACCATGTCAGCAGAGTATGTG 3' e R: 5' CGCCGCCGCGTGCGCC 3'; *msp1 β* F: 5' CACCATGACAGAAGACGACAA 3' e R: 5'CCTAGACCAACCAGAAGACTGC 3'

Na reação de amplificação do DNA, utilizou-se 20 pmoles de cada Primer, 10 mM dioxinucleotídeo trifosfato, 1,5 mM MgCl₂, uma unidade de *Pfx* DNA polimerase Platinum® (Invitrogen Life Thecnologies™), tampão da PCR 1x (40 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl) . As condições de amplificação do gene *msp1 α* foram: uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguidos por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 55 °C e 68 °C e finalizado com extensão realizada a 68 °C por 7 min. As condições de amplificação do gene *msp1 β* foram semelhantes, exceto na temperatura de anelamento que foi de 63 °C.

A seqüência parcial do gene *msp1 α* amplificado a partir do isolado de *A. marginale* PR1 está cadastrado no GenBank (acesso N° AY602768).

Clonagem, produção e purificação das proteínas MSP1a e MSP1b

Os fragmentos de DNA que expressam a MSP1a e a MSP1b, foram clonados em vetor de expressão pET102/D-TOPO e pET101/D-TOPO, respectivamente, segundo as especificações do fabricante (Invitrogen Life Technologies™).

Estes plasmídios recombinantes foram transformados em *E. coli* TOP10 competente e extraídos pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1990), e então submetidos à PCR e à digestão com endonuclease de restrição para verificar a presença dos genes inseridos nos vetores. O plasmídio pET102/*msp1a* foi clivado com enzima *Bgl* II e o plasmídio pET101/*msp1b* com a enzima *Acc* I e visualizados em gel de agarose 0,8%. Após a confirmação da presença dos genes, os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformação em *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot, para expressão das proteínas recombinantes.

As bactérias *E. coli* BL21 recombinantes foram cultivadas, até atingir a densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,5 para induzir a expressão da proteína pela adição de Isopropil-thio-D-Galactoside (IPTG) na concentração de 1mM. O tempo adequado de indução da expressão das proteínas foi de aproximadamente 4 h. A cultura foi centrifugada e lisada por sonicação e congelamento em nitrogênio líquido. Esta suspensão foi centrifugada, e o sobrenadante foi utilizado na purificação protéica utilizando coluna de resina ligada ao níquel (QIAGEN - Integrated Solutions for the Life Sciences), segundo o protocolo do fabricante. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Produção de soro hiperimune em coelhos e de IgY em galinhas

Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA n° 47/05, processo n° 26957/05.

Para a produção de soro hiperimune foram utilizados dois coelhos da raça Nova Zelândia, com idade entre 60 e 70 dias, e para produção de IgY foram utilizadas duas galinhas da linhagem Shaver, para cada proteína recombinante.

Cada animal recebeu três inoculações de 100 µg de proteína, sendo nos coelhos por via subcutânea e nas galinhas via intramuscular, com intervalo entre as imunizações de 14 dias. Na primeira imunização utilizou-se adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) e nas demais imunizações, utilizou-se adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich).

Nos coelhos foi colhida uma alíquota de sangue cinco dias após a última imunização, para a certificação da produção de anticorpos pela técnica de Western blotting. Com a confirmação da produção de anticorpos anti-MSP1a e anti-MSP1b, a colheita de sangue foi realizada por via intracardíaca para obtenção do soro.

A colheita de ovos foi realizada diariamente, no período entre uma semana anterior à primeira imunização (pré-imune) até duas semanas após a última inoculação (-7 até 42 dias). A extração de IgY dos ovos foi realizada segundo a técnica de precipitação de IgY com polietilenoglicol (POLSON, et al., 1980). A gema foi separada da clara e a película protetora removida e adicionado tampão fosfato de sódio (100 mM Na₂HPO₄ pH 7.6). Então clorofórmio foi adicionado até formar uma massa semi-sólida e centrifugada, o sobrenadante foi colhido e decantado com PEG-6000 (polietilenoglicol). O produto foi novamente centrifugado e o sedimento foi ressuspensso com 2 ml de tampão fosfato de sódio e estocado a - 20 °C.

As extrações da IgY pré e pós-imune foram previamente adsorvidas com a *E. coli* BL21 Star para realização dos testes de inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta.

Detecção de anticorpos contra MSP1a e MSP1b, pela técnica de Western blotting

As proteínas recombinantes e as extrações de proteínas de membrana externa da *E. coli* BL21 recombinante (MORONA AND REEVES, 1981). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences 0.45 μ m). A membrana foi bloqueada durante 1 h em tampão de bloqueio (PBS + 0.1% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado). Em seguida, foi incubada com os soros pré e pós-ímenes de coelhos anti-MSP1a e anti-MSP1b (nas diluições de 1:5000) e com as extrações de IgY pré-imune e pós-imune (na diluição de 1:2000). E novamente incubada com proteína G (1:5000) para soro de coelho e, anti-IgY de galinha marcado com peroxidase. Após cada etapa descrita acima foram realizadas três lavagens por 10 min com PBS-T (PBS + 0,1% tween 20). As membranas foram reveladas por quimioluminescência (ECL – NEN® Life Science Products).

Teste de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando IgY em E. coli recombinantes

As *E. coli* BL21 recombinantes foram crescidas em LB caldo e induzidas para expressar as proteínas MSP1a e MSP1b. As bactérias foram sedimentadas, lavadas com PBS pH 7.2 e ressuspendidas para a confecção de lâminas contendo

as bactérias recombinantes, que foram fixadas em metanol por 15 min e em acetona por 1 min.

As lâminas foram bloqueadas em PBS contendo 1% de soro albumina bovina (SAB) durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 60 min com as extrações de IgY pré e pós-imune nas diluições 1:200, 1:400 e 1:800 em PBS contendo 1% de SAB. As lâminas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-anti-chicken, Sigma, diluído em 1:1000 em PBS com 1% de SAB) por 30 min e lavadas três vezes em PBS. A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente.

Hemaglutinação

Hemaglutinação in vitro (HA)

O sangue utilizado para a realização de HA e HI foram colhidos sangue de bovino Holandês negativo para *Anaplasma marginale*, que foi mantido isolado em uma baia. O sangue foi acondicionado em frasco contendo anticoagulante elsever na proporção de 1:1, lavadas cinco vezes em PBS pH 7.2 e fixadas em PBS contendo Glutaraldeído a 1% durante 12 h, a 4 °C. As células fixadas foram lavadas quatro vezes em PBS e centrifugadas quatro vezes com água destilada estéril. As hemácias fixadas foram estocadas em PBS contendo 1.54 μM de NaN_3 (Azida Sódica) e estocadas a 4 °C até o momento do uso.

A HA foi realizada adicionando-se 5×10^7 hemácias/ml em 2×10^9 células de *E. coli*. Após a homogeneização, as células foram incubadas a 37 °C sem agitação por 30 min, lavadas em PBS e ressuspensas com o mesmo volume para a confecção do esfregaço sanguíneo. As lâminas foram fixadas com metanol por 15

min e corada pelo Giemsa. As porcentagens de hemaglutinação foram realizadas calculando-se o número de bactérias aderidas nas hemácias (JAY et al., 2004).

Inibição de Hemaglutinação in vitro (HI)

A HI foi realizada utilizando IgY pós-imune e adicionados em 2×10^9 células de *E. coli* recombinantes expressando as proteínas MSP1a e MSP1b. As IgY foram diluídas em 1:2, 1:5 e 1:10 e incubadas à 37 °C, por 30 min. Posteriormente, 5×10^7 hemácias/ml foram adicionadas e novamente incubadas a 37 °C, por 30 min. O material foi lavado com PBS e ressuspendido com o mesmo volume anterior e realizado esfregaço sanguíneo, fixado com metanol por 15 min e corado pelo Giemsa (JAY et al, 2004).

RESULTADOS

Clonagem, expressão e caracterização das proteínas MSP1a e MSP1b recombinantes

A Figura 1 mostra a confirmação da inserção dos genes *msp1 α* e *msp1 β* de *A. marginale* nos plasmídios pET102 e pET101, respectivamente. O plasmídio pET102/*msp1 α* recombinante clivado com a enzima *Bgl II* apresentou tamanho molecular de 8.5Kb, sendo 6.3Kb do tamanho do vetor e 2.2Kb do gene *msp1 α* . O gene *msp1 α* foi amplificado pela PCR com tamanho molecular de 2.2Kb a partir deste plasmídio recombinante. O plasmídio pET101/*msp1 β* recombinante, ao ser linearizado apresentou tamanho molecular de 7.7Kb, sendo 5.7Kb o tamanho do vetor e 2Kb do gene *msp1 β* . O gene *msp1 β* foi amplificado com o tamanho molecular de 2.0Kb a partir do plasmídio pET101/*msp1 β* . As proteínas induzidas rMSP1a e rMSP1b foram recuperadas do sobrenadante do lisado das bactérias, o que as caracteriza como proteínas solúveis.

As Figuras 2 e 3 demonstram a indução das rMSP1a e rMSP1b e suas reatividades contra soros hiperimunes de coelhos pelo Western blotting. As proteínas recombinantes purificadas, as proteínas de membrana externa da BL21 recombinante (OMP) e a BL21/rMSP1a induzida, foram observadas no SDS-PAGE, caracterizadas por massas moleculares entre 70 a 105 kDa (Fig. 2A).

O soro anti-MSP1a produzido em coelhos reagiu contra a BL21/rMSP1a induzida, rMSP1a, OMP e corpúsculos iniciais de *A. marginale* do isolado PR1, com massas moleculares variando de 70kDa a 105kDa (Fig. 2B).

A indução da rMSP1b, a rMSP1b purificada e a OMP foram observadas no SDS-PAGE com a massa molecular de 100kDa (Fig. 3A). No Western blotting, a BL21/rMSP1b induzida, a proteína rMSP1b, a OMP e o corpúsculo inicial de *A.*

marginale (PR1), reagiram com o soro anti-MSP1b de coelho apresentando massa molecular de 100kDa (Fig. 3B).

Na figura 4 podem ser visualizados os resultados do Western blotting das IgY pós-ímmunes específicas contra a rMSP1a e rMSP1b reagindo com as rMSP1a e rMSP1b purificadas com massas moleculares de 70 a 105kDa e 100kDa, respectivamente. As IgY pré-ímmunes não reagiram contra estas proteínas recombinantes.

Análise da expressão das rMSP1a e rMSP1b na membrana externa de E. coli recombinantes pela IFI

A Figura 5 mostra a reatividade das IgY anti-rMSP1a e anti-rMSP1b pós-ímmunes, pela IFI, com BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b, respectivamente. As IgY pós-ímmunes das aves inoculadas com ambas as proteínas foram reativas na diluição de 1:800, enquanto as pré-ímmunes foram todos negativos. Nenhuma reação foi observada quando se utilizou IgY anti-MSP1a em BL21/rMSP1b e IgY anti-MSP1b em BL21/rMSP1a. O mesmo aconteceu quando IgY anti-MSP1a e anti-MSP1b foram incubadas com BL21 e com as IgY pré-ímmunes incubadas com BL21, BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b (Tabela 1).

Avaliação da participação das MSP1a e MSP1b como adesinas em hemácias de bovinos pelas técnicas de HA e HI in vitro

As Figuras 6 e 7 mostram esfregaço de hemácias, utilizadas nos testes de HA e HI coradas pelo Giemsa, onde podem ser visualizadas as bactérias BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b aderidas aos eritrócitos. A HA com a BL21/rMSP1a apresentou 59,7% bactérias recombinantes aderidas às hemácias e com a BL21/rMSP1b 53,9% de aglutinação. O controle negativo, representado pela BL21, apresentou apenas 10% de aglutinação (Fig. 6).

Na HI utilizando IgY anti-MSP1a e anti-MSP1b, as bactérias BL21/rMSP1a apresentaram hemaglutinação de 5,3% e a BL21/rMSP1b 9,2%. Como controle negativo da reação foi utilizado PBS, no qual a média da porcentagem de hemaglutinação foi de 55,8% com a BL21/rMSP1a e 48,5% com a BL21/rMSP1b (Fig.7).

DISCUSSÃO

Imunizações em bovinos utilizando as proteínas MSP1a e MSP1b mostraram proteção contra isolados homólogos e heterólogos de *A. marginale*, sugerindo que estas proteínas são importantes para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a anaplasmoze bovina (PALMER et al., 1989; MCGAREY, 1994; BROWN et al., 2001).

Os plasmídios recombinantes ao serem submetidos à PCR amplificaram os genes *msp1 α* e *msp1 β* com tamanho molecular esperado, que confirma a presença do gene no vetor. A rMSP1a e a rMSP1b, obtidas da clonagem dos genes específicos do isolado PR1 de *A. marginale*, mantiveram a antigenicidade na imunização dos coelhos, uma vez que os anticorpos produzidos reagiram pelo Western blotting com as proteínas nativas do corpúsculo inicial do *A. marginale*.

A proteína MSP1a possui repetições que variam de 28 a 29 aminoácidos localizados na porção amino terminal (ORBELE et al., 1988; ALLRED et al., 1990). Os soros hiperimunes de coelhos e IgY das aves reagiram com a rMSP1a caracterizada neste trabalho, evidenciando proteínas com massas moleculares de 70 a 105kDa. As proteínas rMSP1a e rMSP1b expressas em *E. coli* estão presentes na superfície das bactérias, como evidenciadas pelas técnicas IFI e Western blotting da OMP das *E. coli* BL21/ pET102-*msp1a* e BL21/pET101-*msp1b*.

Trabalho descrito por de la FUENTE et al (2003) demonstrou por IFI, a expressão da proteína MSP1a na membrana da *E. coli* recombinante. Porém ao realizar a IFI com MSP1a sem a porção das repetições obtiveram pouca fluorescência, mostrando que a região das repetições da proteína MSP1a é necessária para a adesão em células de carrapatos e eritrócitos bovinos.

As bactérias BL21/pET102-*m*sp1a e BL21/pET101-*m*sp1b aglutinaram as hemácias bovinas e a IgY pós-ímmunes contra a MSP1a e a MSP1b inibiram esta reação, demonstrando que MSP1a e MSP1b tem a função de adesão em eritrócitos bovinos. Estes resultados estão de acordo com MCGAREY & ALLRED (1994), os quais sugeriram que eritrócitos bovinos possuem receptores de superfície que interagem com as hemaglutininas do *A. marginale*. A associação entre as proteínas MSP1a e MSP1b é essencial para completar a função de adesão, devido à conformação molecular destes polipeptídeos na superfície da bactéria. Acredita-se que a associação destas duas proteínas tem ação sinérgica, devido ao aumento de número de células aderidas em hemácias bovinas em relação à utilização das proteínas isoladas (MCGAREY et al., 1994).

Anticorpos anti-MSP1a reduzem a infectividade de *A. marginale* em células de carrapatos *in vitro* e *in vivo* (de la FUENTE et al, 2003). Portanto, os anticorpos anti-MSP1a produzidos em bovinos, além de inibirem a adesão nos eritrócitos, poderiam também controlar a infecção em carrapatos e, conseqüentemente, controlar a transmissão da anaplasmoze bovina. Os resultados deste trabalho ratificam a função das MSP1a e MSP1b como adesinas no processo de invasão de eritrócitos e evidenciam a importância destas proteínas na construção de uma vacina de subunidades para o controle da anaplasmoze bovina.

REFERÊNCIAS

- ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.
- ALLRED, D. R.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; LEIB, S. D.; HARKINS T. M.; McELWAIN, T. E.; BARNET, A. E. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of National of Academy Science**, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.
- BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; McGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 2428-2435, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and method for the quantification of microgram quantities of prteins utilizing the principle of protein **Analitycal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, W.; 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**, v. 69, n. 11, p. 6853-6862, 2001.
- CAMACHO-NUEZ, M.; MUÑOZ, M. L.; SUAREZ, C. E.; McGUIRE, T. C.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of polymorphic msp1 β genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. **Infection and Immnity**, v. 68, n. 4, p. 1946-1952, 1999.
- de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E.F.; KOKAN, K. M. Characterization of functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to the host cells. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 265-283, 2003b.
- de la FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A. J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.;

GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A. L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E. F.; KOKAN, K. M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Seach Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S.T.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'EGH agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

JAY, C. M.; BHASKARAN, S.; RATHORE, K. S.; WAGHELA, S. D. Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by pili protein. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 153-160, 2004.

KANO, F.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R.C.; VIDOTTO, M.C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-347, 2004

McGAREY, D. J.; ALLRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4587-4593, 1994.

McGAREY, D. J.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4594-4601, 1994.

MORONA R, REEVES P. Molecular cloning of the *tolC* locus of *Escherichia coli* K-12 with the use of transposon Tn10. **Molecular & general genetics**, v. 184, n. 3, p. 430-433, 1981.

ORBELE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserve MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.

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

PALMER, G. H.; 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**, v. 57, n. 11, p. 3666-3669, 1989a.

POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; VAN REGENMORTEL, M. V. H. isolation of viral IgY antibodies from eggs yolks of immunized hens. **Immunology Communication**, v. 4, p. 475-493, 1980.

RICHEY, E. J.; PALMER, G. H. Bovine Anaplasmosis. **Continuing Education Article 10**, v. 12, n. 11, p. 1661-1668, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - A laboratory manual. 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

TEBELE, N., McGUIRE, T.C., PALMER G.H. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

Tabela 1: Reação da IgY em *E. coli* BL21 expressando as proteínas recombinantes pela técnica de Imunofluorescência Indireta.

IgY	BL21/MSP1a	BL21/MSP1b	BL21
Pré-imune MSP1a	-	-	-
Pré-imune MSP1b	-	-	-
Imune MSP1a	+	-	-
Imune MSP1b	-	+	-

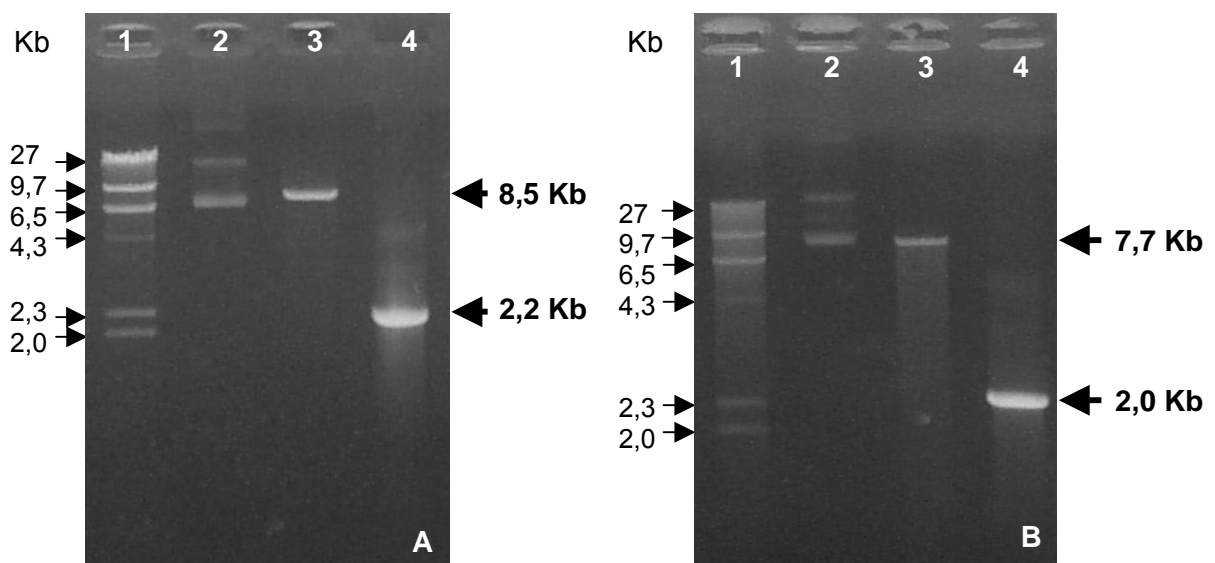


Figura 1 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% das clivagens dos plasmídios recombinantes com as endonucleases de restrição e amplificação dos genes a partir do plasmídeo recombinante. Painel A: Clivagem do pET102/*msp1a* com *Bgl* II - canaleta 1: padrão molecular λ hind, 2: pET102/*msp1a* não clivado; 3: pET102/*msp1a* clivado com *Bgl* II, 4: Amplificação do gene *msp1a* a partir do plasmídeo pET102/*msp1a*. Painel B: pET101/*msp1b* com a enzima *Acc* I - canaleta 1: padrão molecular λ hind, 2: pET101/*msp1b* não clivado; 3: pET101/*msp1b* clivado com *Acc* I, 4: Amplificação do gene *msp1b* a partir do plasmídeo pET101/*msp1b*.

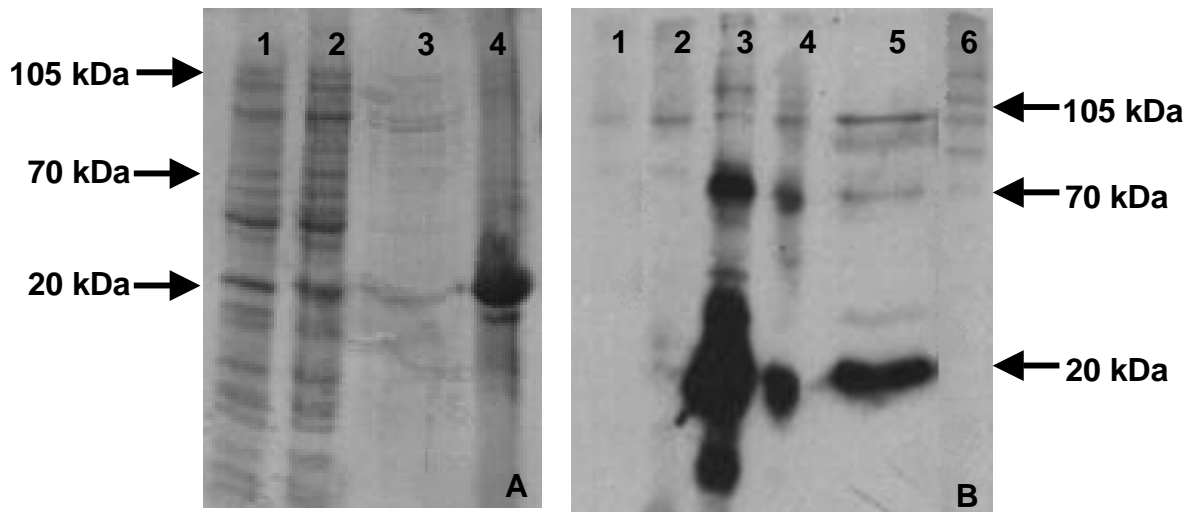


Figura 2 - Painei A: Gel de poliacrilamida a 10% corado pelo Comassie blue ilustrando a indução da rMSP1a, a rMSP1a purificada e a extração de membrana externa (OMP) - canaleta 1: BL21/rMSP1a não induzido; 2: BL21/rMSP1a induzido; 3: rMSP1a purificada; 4: OMP de BL21 expressando rMSP1a. Painei B: Western blotting com soro de coelho anti-MSP1a - canaleta 1: BL21; 2: BL21/rMSP1a não induzida; 3: BL21/rMSP1a induzido; 4: OMP de BL21 expressando rMSP1a; 5: rMSP1a purificada; 6: Corpúsculo inicial de *A. marginale* do isolado PR1.

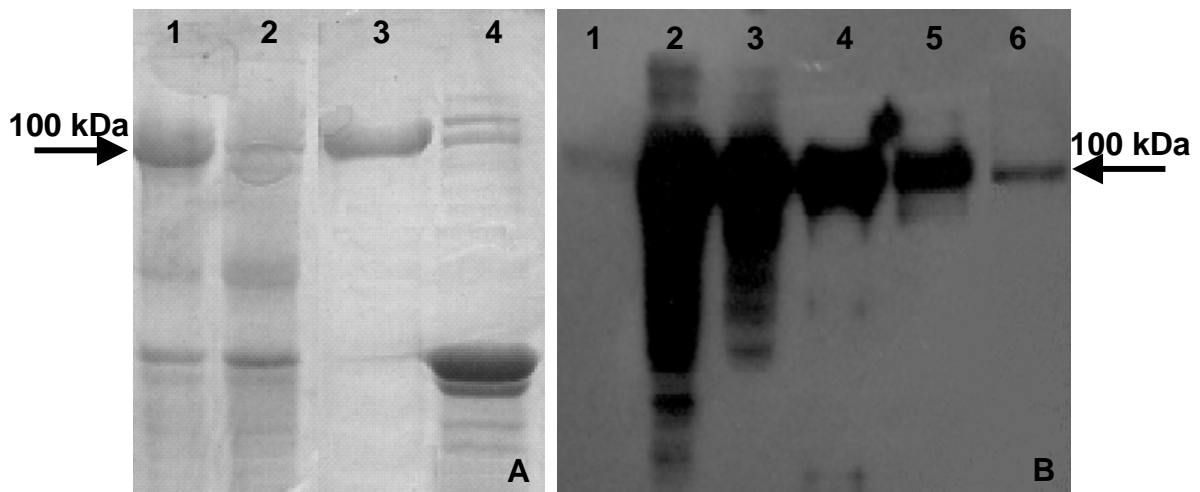


Figura 3 - Painei A: Gel de poliacrilamida a 10% corado pelo Comassie blue ilustrando a indução da rMSP1b, a rMSP1b purificada e a extração de membrana externa (OMP) - canaleta 1: BL21/rMSP1b não induzido; 2: BL21/rMSP1b induzido; 3: rMSP1b purificada; 4: OMP de BL21 expressando rMSP1b. Painei B: Western blotting com soro de coelho anti-MSP1b - canaleta 1: BL21; 2: BL21/rMSP1b não induzido; 3: BL21/rMSP1b induzida; 4: OMP de BL21 expressando rMSP1b; 5: rMSP1a purificada; 6: Corpúsculo inicial de *A. marginale* do isolado PR1

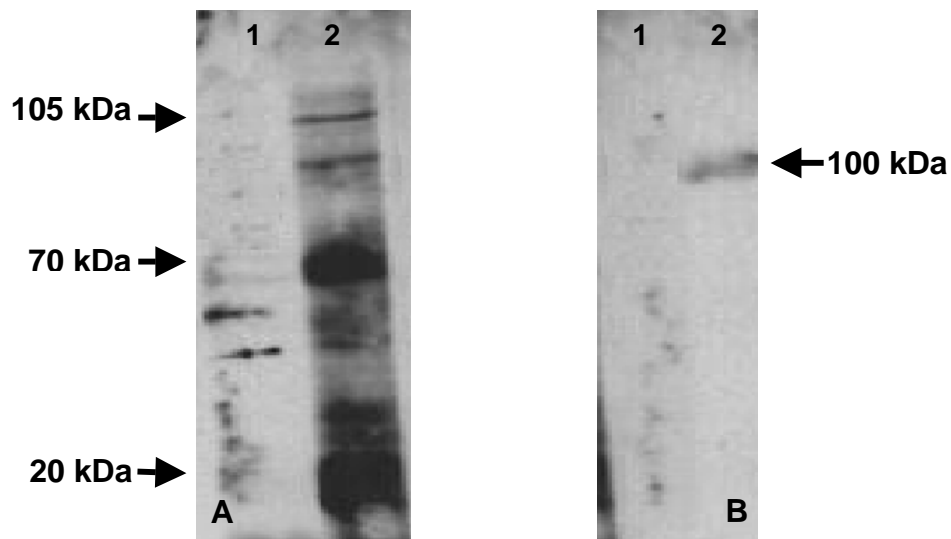


Figura 4 - Western blotting utilizando IgY pré-imune e pós imune contra rMSP1a e MSP1b. Painel A: canaleta 1: rMSP1a + IgY pré-imune; canaleta 2: rMSP1a + IgY pós-imune contra rMSP1a. Painel B: canaleta 1: rMSP1b + IgY pré-imune; canaleta 2: rMSP1b + IgY pós-imune contra rMSP1b.

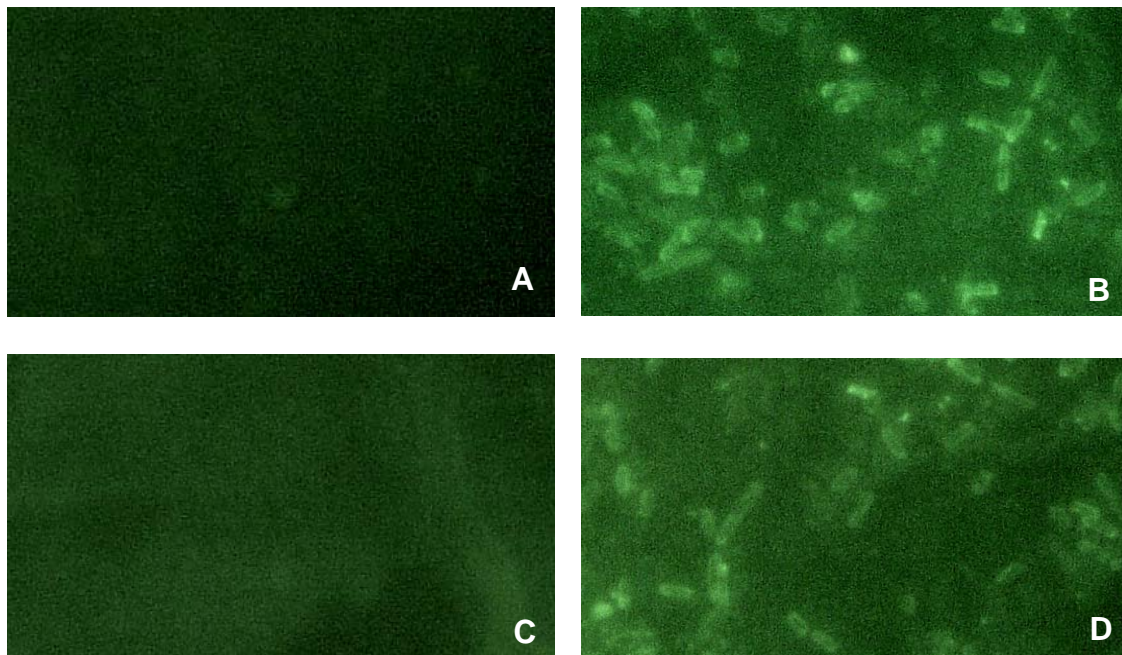


Figura 5 - Imunofluorescência Indireta (IFI), observada em aumento de 100x utilizando IgY pós-íunes contra as bactérias BL21 expressando as proteínas rMSP1a e rMSP1b. A: IgY pré-imune em lâmina contendo BL21/rMSP1a; B: IgY pós-imune contra proteína recombinante MSP1a em lâmina contendo BL21/rMSP1a; C: IgY pré-imune em lâmina contendo BL21/rMSP1b; D: IgY pós-imune contra proteína recombinante MSP1b em lâmina contendo BL21/rMSP1b.

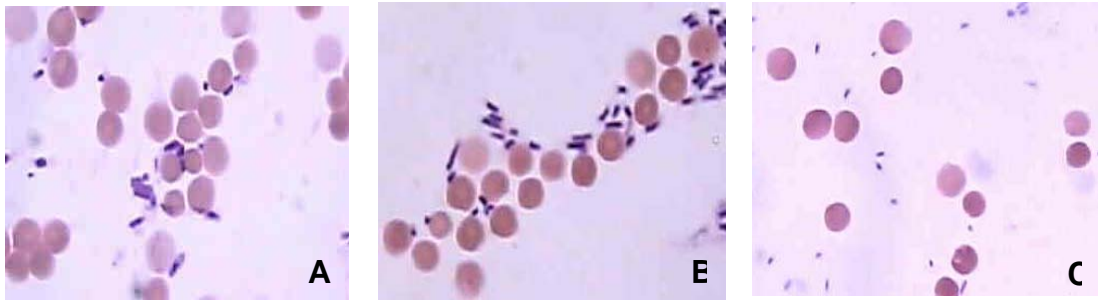


Figura 6 - Fotomicrografia de esfregaços de hemácias utilizadas na Hemaglutinação *in vitro* corados pelo Giemsa (objetiva de 100x) utilizando, as BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b e a BL21 não recombinante. A: BL21/rMSP1a aderidas em hemácias de bovino; B: BL21/rMSP1b aderidas em hemácias de bovino; C: BL21 não aderidas nas hemácias.

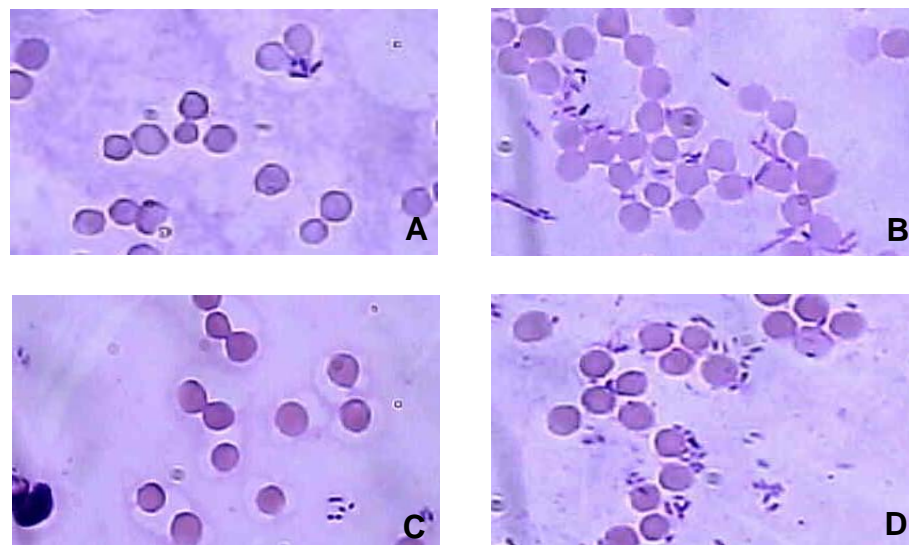


Figura 7 - Fotomicrografia de esfregaços de hemácias utilizadas na Inibição de hemaglutinação *in vitro*, corados pelo Giemsa (objetiva de 100x), utilizando as IgY pós-imune contra as rMSP1a e rMSP1b. A: BL21/rMSP1a + IgY imune; B: Controle negativo (PBS) + BL21/rMSP1a; C: BL21/rMSP1b + IgY imune; D: Controle negativo (PBS) + BL21/rMSP1b.

4 ARTIGO 2

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS BALB/C
IMUNIZADOS COM *E. COLI*/BL21 EXPRESSANDO MSP1A E MSP1B
RECOMBINANTES DE *ANAPLASMA MARGINALE*”**

Avaliação da resposta imune de camundongos Balb/c imunizados com *E. coli* BL21 expressando MSP1a e MSP1b recombinantes de *Anaplasma marginale*

K. Tamekuni¹; *; F.S. Kano¹; P.M. Kawasaki¹; M. Igarashi¹; J.L. Garcia³; M.C. Vidotto²; O. Vidotto¹

¹Depto. Medicina Veterinária Preventiva/CCA/UUEL. ²Depto. de Microbiologia/CCB/UUEL.

³Depto de Ciências Biológicas/UNICENTRO.

Caixa Postal 6001, Cep:86051-970, Londrina, Pr. E-mail: vidotto@uel.br

Resumo

O *Anaplasma marginale* é o agente anaplasmosose bovina que pertence à família Anaplasmataceae. A doença é de ocorrência mundial, com maior frequência nas regiões tropicais e subtropicais, gerando grandes perdas econômicas à pecuária bovina. O *A. marginale* possui seis proteínas principais de superfície (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5). A proteína MSP1a tem como função a adesão em eritrócitos bovinos e células intestinais de carrapatos e a MSP1b adere apenas em eritrócitos bovinos. Estas proteínas formam o complexo protéico MSP1, cujas massas moleculares são de 105kDa para MSP1a e 100kDa para MSP1b. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune humoral em camundongos imunizados com *E. coli* BL21 recombinante expressando as MSP1a e MSP1b (BL21/MSP1a e MSP1b) de *A. marginale*. Os animais imunizados com BL21/rMSP1a tiveram uma forte resposta humoral (IgG total e IgG2a), enquanto que os camundongos imunizados com a BL21/MSP1b apresentaram fraca resposta após as três primeiras imunizações. Pelo Western blotting foi detectado resposta de IgG total contra as proteínas rMSP1a e rMSP1b. Soros de camundongos imunizados com BL21/rMSP1a reagiram com a BL21 e rMSP1a com massas moleculares variando de 70 a 105 kDa e uma banda de 20 kDa sugerindo a quebra da proteína. Soros de animais imunizados com a BL21/rMSP1b reagiram BL21 e rMSP1b com massa molecular de 100 kDa. Estes resultados demonstram que as BL21 contendo as rMSP1a e arMSP1b na membrana externa são capazes de produzir resposta imune em camundongos.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, MSP1a, MSP1b, *Escherichia coli*, IgG total, IgG2a.

Abstract

Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae), is a pathogen that cause bovine anaplasmosis. This disease occurs in the entire world, and it is more frequent in tropical and subtropical areas, causing important economic losses in cattle production. Six Major Surface Protein (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5) have been identified in *A. marginale*. The function of these is the adhesion in bovine erythrocytes and tick cells. The molecular mass of the MSP1a is 105kDa and of the MSP1b is 100kDa. The objective is the production of a vaccine, using *E. coli* BL21 expressing the recombinant proteins (MSP1a and MSP1b) of *Anaplasma marginale*. The recombinant plasmids pET102/msp1 α e pET101/msp1 β was transformed with the competent bacteria *E. coli* BL21 and the recombinant proteins MSP1a e MSP1b was expressed on *E. coli* BL21Star after induction by IPTG. Balb/c were immunized with BL21 expressing rMSP1a and rMSP1b proteins, and the production of whole IgG and IgG2a were determined by indirect ELISA. The animals immunized with BL21/rMSP1a had a strong humoral response (whole IgG and IgG2a), while the mice immunized with BL21/rMSP1b presented a weak response after the first three immunizations. Western blotting of whole IgG was detected against the proteins rMSP1a and rMSP1b. Serum of mice immunized with BL21/rMSP1a reacted with BL21 and rMSP1a with molecular masses varying from 70 to 105 kDa and a band of 20 kDa suggesting the break of the protein. Sera of animals immunized with BL21/rMSP1b reacted with BL21 and rMSP1b in a molecular mass of 100 kDa. These results demonstrate that BL21 containing the rMSP1a and rMSP1b in the outer membrane are able to produce immune response in mice, and could be supposed that will also be able to induce protection against the bovine anaplasmosis.

Keywords: *Anaplasma marginale*, MSP1a, MSP1b, *Escherichia coli*, whole IgG, IgG2a.

INTRODUÇÃO

O *Anaplasma marginale* pertencente à família Anaplasmataceae é responsável pela anaplasmoose bovina (DUMLER et al, 2001). Esta doença ocorre mundialmente, sendo mais grave nas regiões tropicais e subtropicais, determinando perdas econômicas elevadas à pecuária bovina (RICHEY & PALMER, 1990).

O *A. marginale* possui seis proteínas principais de superfície denominadas MSPs, designadas de MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5 (PALMER, 1989 TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993; ALLEMAN et al., 1996). A proteína MSP1a tem como função a adesão em eritrócitos bovinos e células intestinais de carrapatos e a MSP1b adere apenas em eritrócitos bovinos. Estas proteínas formam o complexo protéico MSP1, cujas massas moleculares são de 105kDa para MSP1a e 100kDa para MSP1b (McGAREY et al., 1994; PALMER et al., 1987; McGAREY & ALLRED, 1994).

A proteína MSP1a é codificada, por um único gene *msp1α* e a MSP1b por uma família multigênica, os genes *msp1β1* e *msp1β2*, que apresentam uma pequena variação nas seqüências das proteínas MSP1b1 e MSP1b2 durante as fases de multiplicação em bovinos e carrapatos (OBERLE et al, 1988).

O gene *msp1α* que codifica a proteína MSP1a foi identificado apenas em *A. marginale* (LEW et al, 2002). A proteína MSP1a apresenta massa molecular variável entre os diferentes isolados, devido à presença de um número variável de regiões repetitivas de 28 ou 29 aminoácidos na região N-terminal (ALLRED et al., 1990; OBERLE et al., 1993). Estas regiões possuem epitopos sensíveis à neutralização os quais são conservados entre os diferentes isolados (PALMER et al, 1987; ALLRED et al., 1990; KANO et al, 2002)

A vacinação de bovinos pode ser uma alternativa econômica para controlar a anaplasmoze bovina, porém as vacinas existentes comercialmente apresentam limitações na proteção dos rebanhos contra isolados heterólogos de *A. marginale* e pela indução de anticorpos que são transferidos ao colostro, determinando a isoeritrólise em bezerros recém nascidos (KUTTLER et al., 1984). Outra desvantagem da vacina viva é o risco de introdução de outros patógenos existentes no sangue utilizado na produção da vacina (PALMER, 1989; KOCAN et al., 2000).

Bovinos imunizados com o complexo protéico MSP1 têm mostrado proliferação de células T-CD4⁺ e interferon- γ contra isolados homólogos e heterólogos de *A. marginale*. Esta proliferação de interferon- γ está relacionada à presença de epitopos T na região C-terminal da proteína MSP1a, e uma fraca resposta celular contra a proteína MSP1b (BROWN et al, 2002).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune em camundongos Balb/c imunizados com *E. coli* recombinante, expressando a MSP1a e a MSP1b de *A. marginale*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras bacterianas

Para obtenção da *E. coli* BL21 expressando as proteínas recombinantes foram realizadas as transformações da bactéria *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot competente com plasmídios recombinantes pET102/msp1 α e pET101/msp1 β que expressam as proteínas MSP1a e MSP1b, respectivamente (Tamekuni et al., 2006 não publicado). A bactéria foi incubada com os plasmídios em gelo e posteriormente aquecido em banho-maria por 30 s, a 42 °C e rapidamente transferida ao gelo. Após este processo, adicionou-se 250 μ l de meio SOC e incubou-se por 30 min em estufa a 37 °C, sob forte agitação. Após a transformação, as bactérias recombinantes BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b foram cultivadas em Luria Bertani (LB) caldo a 37 °C, durante 12 h sob agitação. Esta cultura foi repicada em meio LB caldo contendo ampicilina na diluição 1:100 para induzir a expressão das proteínas. A indução protéica foi estimulada pela adição de Isopropil-thio-D-Galactoside (IPTG), quando a cultura atingiu a densidade óptica (D.O._{600nm}) entre 0,5 - 0,8. A cultura foi mantida por 4 h de crescimento e depois centrifugada.

O sedimento de bactérias foi lavado e ressuspenso em PBS, pH 7,2, cuja concentração final das bactérias para a inoculação foi de 10⁹ CFU (Unidades formadoras de colônias) (Heller et al. 1990).

Imunização de camundongos Balb/c com *E. coli* BL21 expressando as proteínas MSP1a e MSP1b recombinantes

Foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c fêmeas com peso entre 18 a 20g. Os animais foram separados aleatoriamente em seis grupos contendo sete animais em cada grupo. O grupo 1 (G1) recebeu 100 µl de salina (grupo controle negativo), o grupo 2 (G2) recebeu 100 µg de corpúsculos iniciais de *A. marginale* do isolado PR1, o grupo 3 (G3) 10^9 UFC de *E. coli* BL21/rMSP1a, o grupo 4 (G4) recebeu 10^9 UFC de *E. coli* BL21/rMSP1b, o grupo 5 (G5) 10^9 UFC de *E. coli* BL21/rMSP1a e *E. coli* BL21/rMSP1b e o grupo 6 (G6) 10^9 UFC de *E. coli* BL21. Cada animal recebeu três doses pela via subcutânea, com intervalos de 14 dias. As bactérias recombinantes e o corpúsculo inicial de *A. marginale* foram preparados com o adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) para a primeira imunização e nas demais com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich).

As colheitas de sangue foram realizadas nos dias 0, 7, 21, 35 para avaliar a resposta imune humoral utilizando as técnicas de Western blotting e ELISA.

Avaliação da resposta humoral

Teste Imunoenzimático Indireto (ELISA)

A técnica de ELISA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Garcia et al (2005), em placa de 96 escavações (Imunulon 2) adsorvida em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 contendo 5 µg/ml de cada proteína recombinante. Após incubação a 6 °C, por 18 h, as placas foram lavadas com PBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20, pH 7.4) e bloqueadas com 200 µL de tampão carbonato /bicarbonato contendo 8% de leite em pó desnatado por 1 h à 37 °C. Os soros dos camundongos foram diluídos 1:50 em tampão PBST contendo 5% de leite

em pó desnatado e incubados durante 1 h, à 37 °C. Após a lavagem, adicionou-se conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase diluído em PBST contendo 5% de leite em pó desnatado e as placas foram incubadas à 37 °C, por 45 min. A diluição do conjugado para detecção de IgG total foi de 1:10.000 e para IgG2a foi de 1:30.000 (Sigma-Aldrich). As placas foram lavadas novamente, e a revelação foi realizada adicionando 100 µl de tampão substrato cromógeno (OPD). A reação foi interrompido com a adição de 50 µl de 1 M HCl. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 490nm.

Os grupos imunizados com o corpúsculo inicial de *A. marginale* e com salina foram utilizados, respectivamente, como controle positivo e negativo nas técnicas de ELISA. O título do controle positivo em IFI foi de 640.

O valor do ponto de corte foi calculado a partir da DO_{490} do controle negativo multiplicado por dois (VERCAMEN et al, 2000).

Técnica de Western Blotting

Na técnica de Western blotting as proteínas recombinantes MSP1a e MSP1b foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida à 10% à 100 V e 50 mA, em tampão Tris-glicina pH 8.8. Como padrão de massa molecular foi utilizado Multimarck pré-corado (Invitrogen Life Technologies™)

Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences 0.45 µm), durante 12 h, a 30 V, em geladeira a 4 °C. A membrana foi bloqueada durante 1 h em tampão de bloqueio (PBS + 0.1% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado), e lavada em PBS-T (PBS + 0.1% Tween 20), O "pool" de soro colhido após a última imunização dos grupos foi diluído a 1:100, e incubado por 1h em tampão de bloqueio. A membrana foi lavada

novamente incubada com proteína G (1:5.000) conjugada à peroxidase. As membranas foram reveladas por quimoluminescência (ECL – NEN® Life Science Products).

RESULTADOS

Avaliação da resposta de IgG total e IgG2a em camundongos imunizados com bactérias recombinantes pela técnica de ELISA indireto

As respostas de IgG total e IgG2a estão representadas pelas Figuras 1 e 2, respectivamente.

O G1 (controle negativo), imunizado apenas com salina, apresentou valores de DO_{490} abaixo do ponto de corte. Em G2 (controle positivo) imunizado com corpúsculos iniciais de *A. marginale*, os animais apresentaram resposta imune a partir da primeira imunização, que foi crescente até a terceira imunização. Os animais dos grupos 3, 5 e 6, inoculados com BL21/rMSP1a, BL21/rMSP1a + BL21/rMSP1b e BL21 tiveram uma forte resposta imune humoral, equivalente ao grupo controle positivo, enquanto o grupo 4, imunizado com BL21/rMSP1b apresentou uma fraca resposta nas três primeiras imunizações.

Avaliação da resposta imune humoral pela técnica de Western blotting

A Figura 3 mostra a reação dos soros produzidos em camundongos imunizados com as proteínas recombinantes de *A. marginale* e BL21.

O soro pré-imune reagiu apenas com a rMSP1b pelo Western blotting, porém com a massa molecular inferior à da rMSP1b. O soro do G3 imunizado com BL21/rMSP1a reagiu com a BL21 e rMSP1a com massa molecular variando de 70 a 105 kDa e uma banda truncada de 20kDa. O soro do G4, imunizado com

BL21/rMSP1b com massa molecular de 100 kDa mostrou uma forte reação com a proteína rMSP1b. O soro do G5, imunizado com BL21/rMSP1a + BL21/rMSP1b, reagiu com a BL21, rMSP1a e rMSP1b, com massas moleculares esperadas. O G6 imunizado apenas com BL21, reagiu com a própria BL21, rMSP1a e rMSP1b, porém a massa molecular visualizada com rMSP1b foi abaixo de 100kDa. A mesma reação inespecífica ocorreu com rMSP1a, embora as proteínas inespecíficas apresentassem massas semelhantes da MSP1a.

DISCUSSÃO

As proteínas MSP1a e MSP1b são importantes para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade, por serem eficientes na redução considerável da parasitemia e anemia nos animais em diferentes isolados, homólogos e heterólogos, de *A. marginale* (PALMER et al., 1986; PALMER et al., 1989; BROWN et al., 2002). Anticorpos produzidos contra o complexo protéico MSP1 podem ter a função de bloquear a invasão em eritrócitos ou facilitar a fagocitose por macrófagos (McGAREY et al., 1994; BROWN et al., 2001).

A proteína MSP1a possui regiões nas porções C-terminal e N-terminal importantes na resposta imune. A porção C-terminal induz uma intensa proliferação de linfócitos T-CD4⁺ e produção de IFN- γ , além de ser uma região altamente conservada entre as diferentes isolados de *A. marginale* (BROWN et al., 1998, 2001, 2002). A região N-terminal apresenta a maior parte de epitopos sensíveis às células B (PALMER et al., 1987; GARCIA-GARCIA et al., 2003a), a qual é composta por repetições com 28 a 29 aminoácidos (OBERLE et al., 1993; de la FUENTE et al., 2001a).

Segundo McGAREY et al. (1994), a utilização de *E. coli* expressando as proteínas MSP1a e MSP1b, proporcionou aumento significativo na adesão das bactérias às hemácias, o que indicou um efeito sinérgico quando se utilizou bactérias expressando as duas proteínas juntas. Neste trabalho, o grupo imunizado com BL21/rMSP1a + BL21/rMSP1b, não demonstrou resultado superior em relação ao grupo imunizado apenas com BL21/rMSP1a. A provável causa deste resultado pode ser devida à ausência de interações moleculares como as pontes dissulfeto e ligações não-covalentes existentes na conformação deste complexo protéico, demonstrado por VIDOTTO et al (1994).

Os grupos imunizados com a BL21/rMSP1a produziram forte resposta de IgG total e IgG2a na técnica de ELISA. No entanto, nos grupos de camundongos imunizados com BL21/rMSP1a, pode ter ocorrido aumento da reatividade proporcionado pelas reações cruzadas entre a proteína rMSP1a e as proteínas da própria BL21 que não foram completamente eliminadas na purificação da proteína recombinante. Esta hipótese é reforçada pelo resultado do Western blotting, em que o soro do grupo imunizado apenas com bactéria BL21 reagiu com a proteína MSP1a.

A proteína de 20 kDa, que reagiu fortemente com soro anti-MSP1a no Western blotting, ainda não descrita na literatura, pode ser devido ao truncamento desta proteína.

O soro do grupo imunizado com BL21/rMSP1b apresentou baixa resposta de IgG total e IgG2a no ELISA, no entanto, mostrou uma forte reação quando submetido ao Western blotting. Esta discrepância que ocorreu entre as duas técnicas é explicada por problemas de adsorção da rMSP1b na placa devido às

características hidrofóbicas nas regiões conservadas desta proteína (CAMACHO-NUEZ et al, 1999).

BROWN et al. (1998), imunizaram três bovinos com frações de membrana externa de *A. marginale*, demonstrando que dois dos três animais que apresentaram maior título de IgG2 se deu após a segunda imunização, e ao serem desafiados com *A. marginale* não tiveram manifestações clínicas da anaplasnose.

Este experimento mostrou forte resposta de IgG2a, o que demonstra que estas proteínas provavelmente induziram uma proliferação de linfócitos T-CD4+. Estes linfócitos são importantes para a defesa durante a fase aguda da anaplasnose, pois produzem IFN- γ , que é essencial para resposta imune contra *A. marginale*. O IFN- γ atua sobre as células B, estimulando a produção de IgG2 e ativa os macrófagos aumentando a produção de óxido nítrico (ON) que é tóxico para o *Anaplasma* (BROWN et al, 1998, 2001).

PERSPECTIVAS

Ao imunizar bovinos com as BL21/rMSP1a e BL21/rMSP1b, poderá também induzir resposta imune humoral e celular e conseqüentemente a proteção dos animais contra a anaplasnose, e assim pode ser uma alternativa de baixo custo e fácil produção de uma vacina contra o *Anaplasma marginale*.

REFERÊNCIAS

- ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.
- ALLRED, D. R.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; LEIB, S. D.; HARKINS T. M.; McELWAIN, T. E.; BARNET, A. E. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of National of Academy Science**, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.
- BROWN, W.; 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**, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998.
- BROWN, W.; 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**, v. 69, n. 11, p. 6853-6862, 2001.
- BROWN, W.; McGUIRE, T. C.; MWANGI, W.; KEGERREIS, K. A.; MACMILLAN, H.; LEWIN, H. A.; PALMER, G. H. Major Histocompatibility complex Class II DR-Restricted Memory CD4⁺ T Lymphocytes Recognize Conserved Immunodominant Epitopes of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5521-5532, 2002.
- CAMACHO-NUEZ, M; LOURDES-MUNOZ, M; SUAREZ, C. E.; McGUIRE, T. C.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of polymorphic *mSP1β* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1946-1952, 1999.
- de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E.F.; RODRÍGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; KOKAN, K. M. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, p. 163-173, 2001a

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

de la FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A. J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A. L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E. F.; KOKAN, K. M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Seach Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005.

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

GARIA-GARCIA, J. C.; la FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p. 137-151, 2003a.

JAY, C. M.; BHASKARAN, S.; RATHORE, K. S.; WAGHELA, S. D. Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by pili protein. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 153-160, 2004.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T.; MACHADO, R. Z.; SINHORINI, I. L.; FREIRE, L. F.; MARANA, E. R. M.; TSUTSUI, V.; CONTENTE, A. P. A.; BEGALE, L. P. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 209-217, 2005.

- KANO, F.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R.C.; VIDOTTO, M.C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002.
- KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. **Annals of New York Academy of Sciences**, n. 916, p. 501-509, 2000.
- KUTTLER, K.L., ZAUGG J.L., JOHNSON, L.W. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale*. **American Journal Veterinary Research**, v. 45, n. 11, p. 2233, 1984.
- LEW, A. E.; BOCK, R. E.; MINCHIN, C. M.; MASACA, S. A msp1 α polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *anaplasma marginale*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 325-335, 2002.
- McGAREY, D. J.; ALRRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4587-4593, 1994.
- McGAREY, D. J.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 4594-4601, 1994.
- ORBELE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C. molecular Size Variation in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.
- ORBELE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.. Expression and immune recognition of the conserve MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.
- PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle anaplasmosis. **Science**, v. 231, n. 11, p. 1299-1302, 1986a.
- PALMER, G. H.; WAGHELA, S. D.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, W. C. Caracterização of a neutralization sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 7, p. 1279-1285, 1987.

PALMER, G. H.; 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**, v. 57, p. 3666-3669, 1989.

RICHEY, E. J.; PALMER, G. H. Bovine Anaplasmosis. **Continuing Education Article 10**, v.12, n. 11, p. 1661-1668, 1990.

TEBELE, N., MCGUIRE, T.C., PALMER G.H. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; HUYGEN, K.; DE BRAEKELEER, J.; DIET, R.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; VERSCHUEREN, H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 38-45, 2000.

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

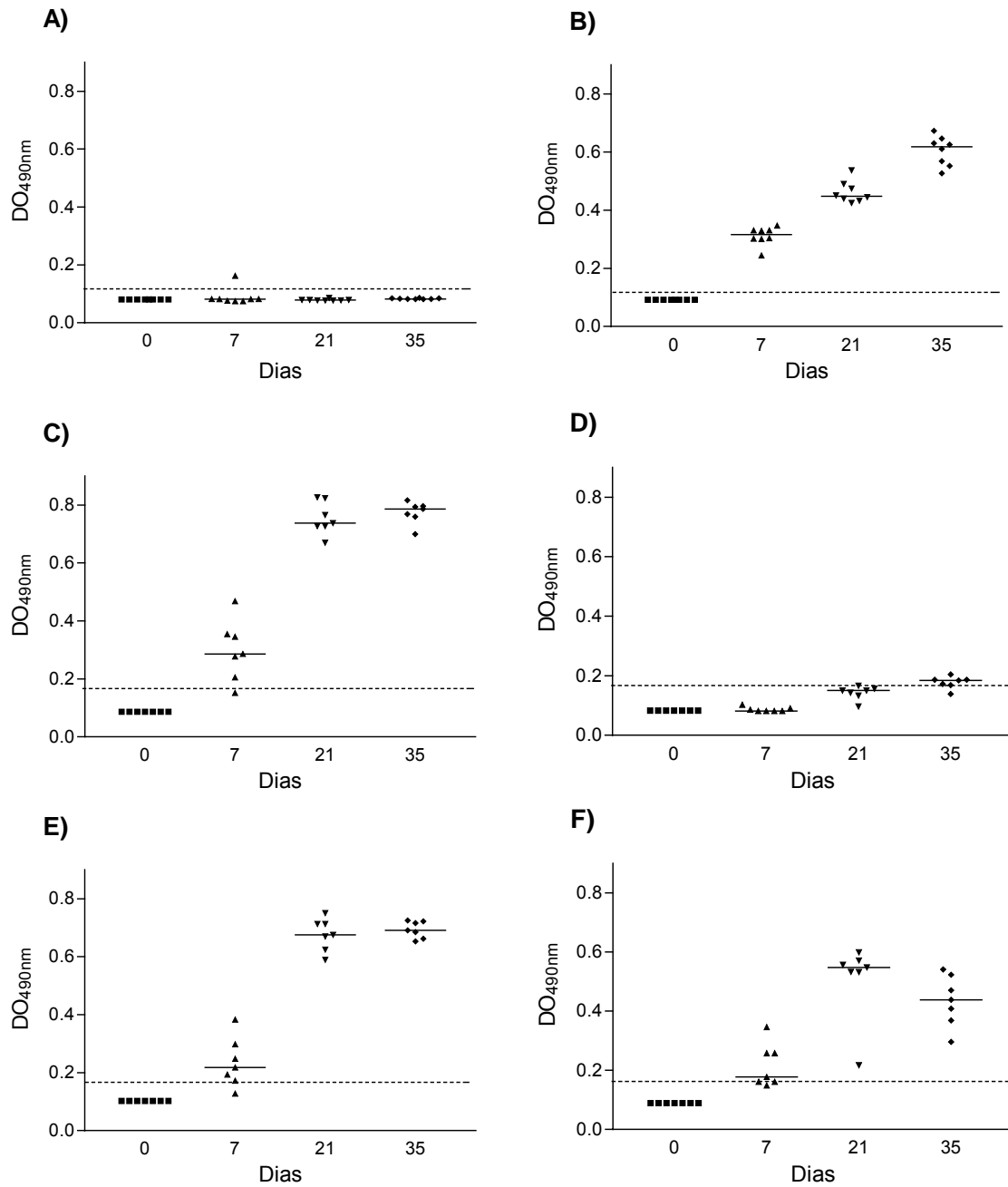


Figura 1 - Resposta de IgG total em camundongos imunizados com BL21 e BL21 recombinantes. O gráfico A: Grupo 1 (controle negativo) imunizado com salina; B: Grupo 2 (controle positivo) imunizado com Corpúsculo Inicial de *A. marginale*; C: Grupo 3 (BL21/rMSP1a); D: Grupo 4 (BL21/rMSP1b); E: Grupo 5 (BL21/rMSP1a+BL21/rMSP1b); F: Grupo 6 (BL21). As placas A e B foram sensibilizadas com corpúsculos iniciais de *A. marginale*; C: rMSP1a; D: rMSP1b; E, F: rMSP1a + rMSP1b.

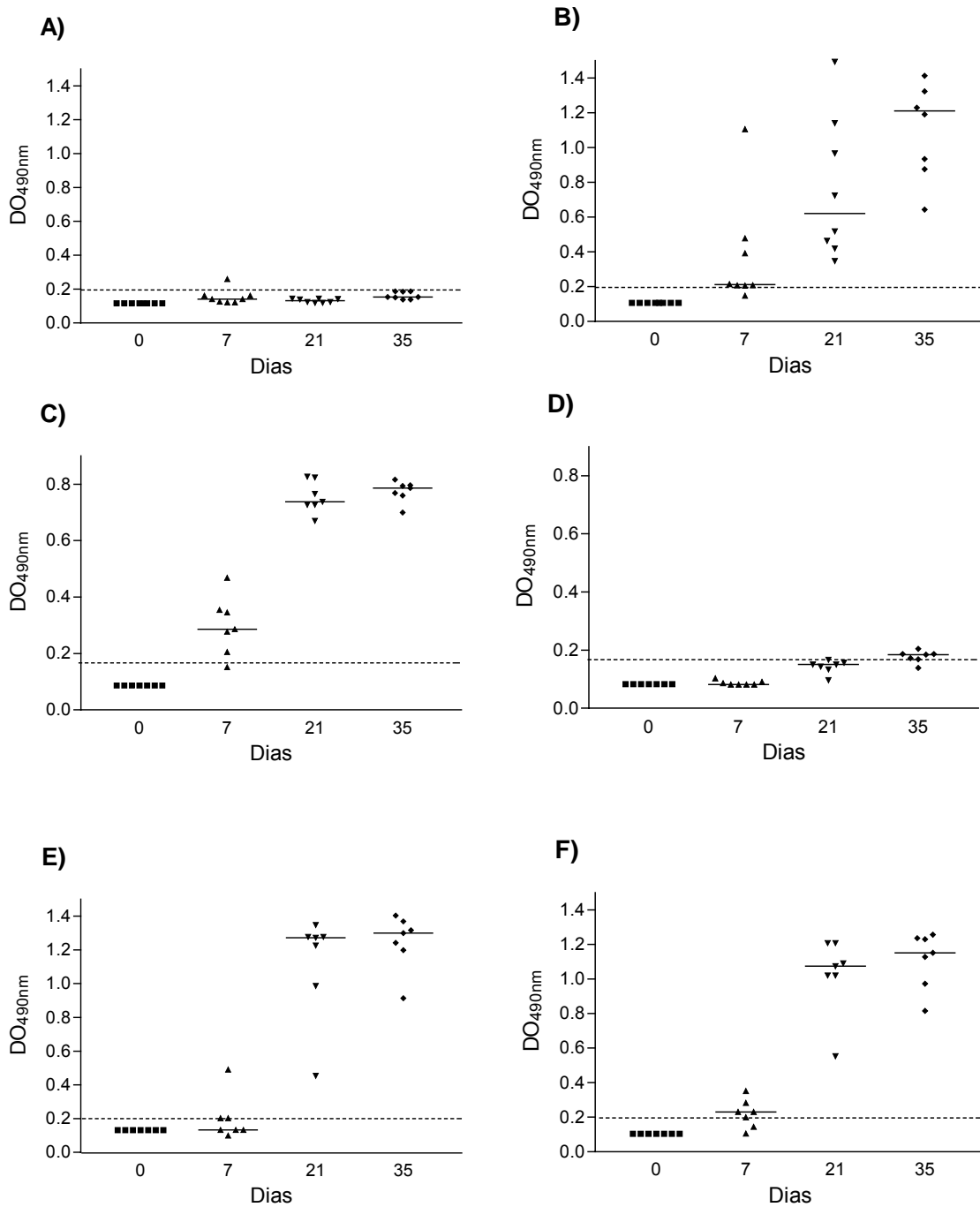


Figura 2 - Resposta de IgG2a em camundongos imunizados com BL21 e BL21 recombinantes. O gráfico A: Grupo 1 (controle negativo) imunizado com salina; B: Grupo 2 (controle positivo) imunizado com Corpúsculo Inicial de *A. marginale*; C: Grupo 3 (BL21/rMSP1a); D: Grupo 4 (BL21/rMSP1b); E: Grupo 5 (BL21/rMSP1a+BL21/rMSP1b); F: Grupo 6 (BL21). As placas A e B foram sensibilizadas com corpúsculos iniciais de *A. marginale*; C: rMSP1a; D: rMSP1b; E, F: rMSP1a + rMSP1b.

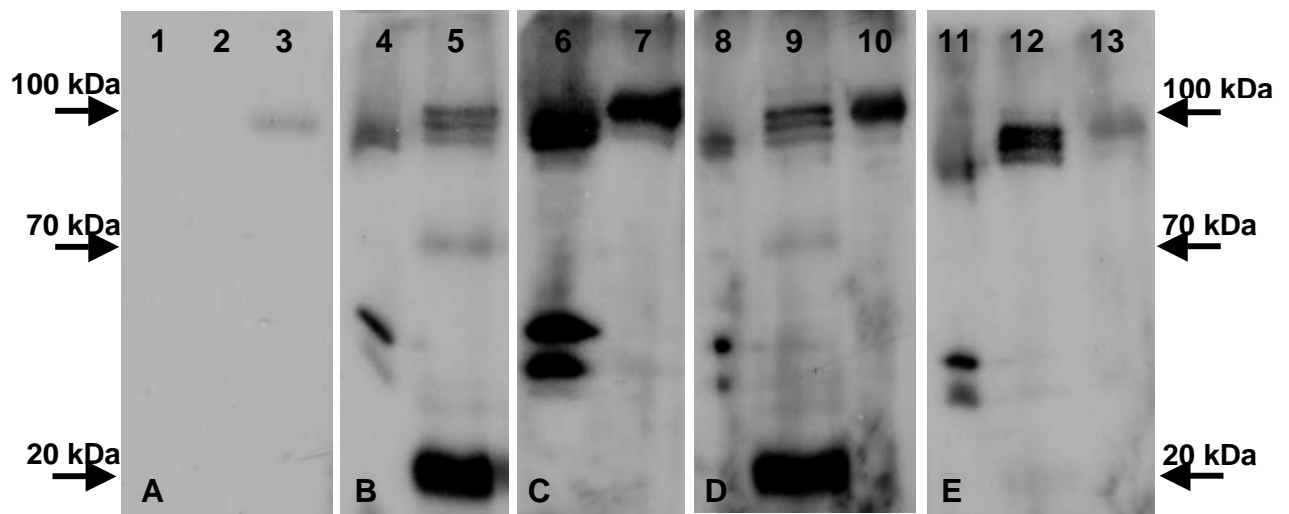


Figura 3 - Reação de IgG total produzida em grupos de camundongos imunizados com BL21 e BL21 recombinantes, pela técnica de Western blotting. *E. coli* BL21 (1, 4, 6, 8, 11); rMSP1a (2, 5, 9, 12); rMSP1b (3, 7, 10, 13). Painel A: Soro pré-imune; B: Soro Grupo 3 (BL21/rMSP1a); C: Soro Grupo 4 (BL21/rMSP1b); D: Soro Grupo 5 (BL21/rMSP1a + BL21/rMSP1b); E: Soro Grupo 6 (BL21).

5 CONCLUSÕES

- As proteínas MSP1a e MSP1b recombinantes são imunogênicas, mantiveram a antigenicidade e estão localizadas na membrana externa da *E. coli* BL21;
- As proteínas recombinantes MSP1a e MSP1b têm como função adesão em hemácias de bovinos;
- As *E. coli* contendo as rMSP1a induziu a produção de IgG total e IgG2a, sugerindo a indução de resposta humoral e celular em camundongos.

REFERÊNCIAS

- ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.
- BROWN, W.; 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 Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998.
- BROWN, W.; 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**, v. 69, n. 11, p. 6853-6862, 2001.
- COX, C. J.; COUTER, A. R. Adjuvants a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, n. 3, p. 248-256, 1997.
- DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 11, p. 5-16, 1950.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S.T.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'EGH agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.
- GARIA-GARCIA, J. C.; la FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, n. 3, p. 137-151, 2003.
- GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvantes for human vaccines current status, problems and future prospects. **Butterworth Heinemann**, v. 13, n. 14, p. 1263-1276, 1995.

KANO, F.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R.C.; VIDOTTO, M.C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KNOWLES, D.; TORIONI, D. E.; PALMER, G. H.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

KOCAN, K. M.; HAIR, J. A.; EWING, S. A.; STRATTON, L. G. Transmission of *Anaplasma marginale* theiler by *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p.15-18, 1981.

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

KUTTLER, K.L., ZAUGG J.L., JOHNSON, L.W. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale*, **American Journal Veterinary Research**, v. 45, n. 11, p. 2233, 1984.

McGAREY, D. J.; ALLRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4587-4593, 1994.

McGAREY, D. J.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4594-4601, 1994.

NAKAMURA, Y.; KAWAZU, S.; MINAMI, T. Analysis of protein compositions and surface protein epitopes of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. **Journal of Veterinary Medicine of Science**, v. 53, n. 1, p. 73-79, 1990.

ORBELE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.

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

PALMER, G. H.; WAGHELA, S. D.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, W. C. Characterization of a neutralization sensitive epitope on the Am105 surface protein of *Anaplasma marginale*. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 7, p. 1279-1285, 1987.

PALMER, G. H. Anaplasma vaccines. In: WRIGHT, I. G. **Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines**, p. 1-29, 1989a.

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**, v. 57, n. 11, p. 3666-3669, 1989.

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

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

PATARROYO J.H., HENCKEL D.J., PRATES A A, MAFRA C.L. Antigenic profile of pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin using western blot technique. **Veterinary Parasitology**, v. 52, n. 1, p. 124-137, 1994.

RICHEY, E. J.; PALMER, G. H. Bovine Anaplasmosis. **Continuing Education Article 10**, v. 12, n. 11, p. 1661-1668, 1990.

RISTIC, M.; CARSON, C. A. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on the use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. **In Workshop on hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis)** v. 12, p. 105-132, 1977.

TEBELE, N., McGUIRE, T.C., PALMER G.H. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

TORIONI de ECHAIDE, S. T.; KNOWLES, D. P.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. S.; McELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; PALMER, G.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D. P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Paraná State, Brazil, by MSP5 competitive ELISA. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 823, n. 1, p. 424-426, 1998.

ZHANG, Y.; PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROMN, W. C. CpG ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a rickettsial outer membrane protein in alum, **Vaccine**, n. 21, p. 3307-3317, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A

EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE (KIT PUREGENE)

1. Descongele o sangue armazenado à -20 °C em banho Maria 37 °C
2. Adicione 1 ml de reagente RBC em tubo de 1,5 ml
3. Acrescente 300 µl do sangue e incube 10 minutos à temperatura ambiente
4. Centrifugue a 3000 x g por 2 min a 4-8 °C
5. Remova o sobrenadante com cuidado, deixando aproximadamente 10 a 20 µl de resíduo.
6. Adicione ao resíduo 300 µl de solução de lise celular, 6 µl proteínase K ([] final 200 µg/ml)
7. Homogeneizar em vórtex
8. Incube a 37 °C por 1 h
9. Resfrie as amostras no gelo
10. Adicione 200 µl de Solução de precipitação de proteína e homogeneíze
11. Centrifugue a 13000 x g por 3 min para formação do pelete escuro
12. pipete 300 µl de Isopropanol 100% em tubo novo estéril e adicione o sobrenadante obtido
13. Misture as amostras, invertendo delicadamente até homogeneização completa
14. Centrifugue a 13000 x g por 3 min
15. Despreze o sobrenadante e drene o tubo com papel absorvente
16. Adicione 300 µl de Etanol 70% misture e centrifugue a 13000 x g por 2 min despreze o etanol e drene os tubos
17. Deixe secar
18. Adicione 100 µl de solução de hidratação ou água
19. Deixe T.A. ou refrigerada durante à noite para hidratar
20. Estoque as amostras

PROCOLO TRANSFORMAÇÃO DA *E. coli* BL21 STAR (DE3) ONE THE SHOT

1. Descongele no gelo, a BL21 Star (DE3) One Shot competente para transformação
2. Adicione 5-10 ng do DNA em um volume de 1 a 5 μ l em BL21 (DE3) e misture delicadamente com o pipetador
3. Incubar no gelo por 30 min
4. Aqueça por 30 s a 42 °C sem agitar
5. Transfira imediatamente os tubos para o gelo
6. Adicione 250 μ l de meio SOC à temperatura ambiente
7. Feche o tubo firmemente, prenda os tubos em seus lugares (para maior aeração) e incube a 37 ° C por 30 min sob agitação
8. Adicione toda a reação de transformação em 10 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado (ampicilina 100 μ g/ml)
9. Crescer “overnight” em agitador

INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

1. A partir do pré-inóculo (10 ml de LB crescido “overnight” com 100 μ g de ampicilina, preparar a seguinte diluição: 500 μ l de pré-inóculo para 2,0 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado)
2. Total de 6 ml: 2,0 ml sem induzir (sem IPTG)
2,0 ml induzido piloto
2,0 ml induzido (solúvel e insolúvel)
3. Incubar a 37 ° C durante 1 hora sob forte agitação
4. Verificar a D.O._{600nm} entre 0,5 - 0,8 (ideal entre 0,5 - 0,6)
5. Adicionar IPTG para induzir a expressão da proteína recombinante para uma concentração final de 1 mM (solução estoque de IPTG 1 M)
6. Incubar a 37 ° C durante 3 a 5 h

PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA

1. Semear o pré-inóculo em 100 ml de LB caldo (contendo 100 µg/ml ampicilina), na proporção de 1:100
2. Incubar a 37 ° C “overnight” sob agitação
3. Verificar a D.O._{600nm} entre 0,5 - 0,8 (ideal entre 0,5 - 0,6)
4. Adicionar IPTG para induzir a expressão da proteína recombinante para uma concentração final de 1 mM
5. Incubar a 37 ° C durante 3 a 5 h
6. Passar esta cultura em 1000 ml de LB caldo (contendo 100 µg/ml ampicilina), na proporção de 1:10
7. Incubar a 37 ° C “overnight” sob agitação
8. Verificar a D.O._{600nm} entre 0,5 - 0,8 (ideal entre 0,5 – 0,6)
9. Adicionar IPTG para induzir a expressão da proteína recombinante para uma concentração final de 1 mM
10. Incubar a 37 ° C durante 3 a 5 h
11. Centrifugar durante 15 min a 10.000 rpm
12. desprezar o sobrenadante
13. Ressuspender o pellet em PBS, distribuir em microtubos e centrifugar novamente por 3 min à 13.000 rpm
14. conservar o pellet congelado, para purificação

PREPARO DE LISADO DE *E. coli* BL21 EM CONDIÇÕES NATIVAS (QUIAGEN)

1. deixe o pelete no gelo por 15 min e ressuspenda em tampão de lise (2-5 ml de tampão para 1 g de cultura)
2. Adicione lizosima (1 mg/ml) e incube por 30 min no gelo
3. Sonicar no gelo durante 10 s a 200 - 300 W e deixe congelando no nitrogênio líquido aproximadamente 1 minuto
4. Repita passo 3 três vezes
 - * Descogelar em banho a 42 °C
5. Se o lisado estiver viscoso, adicione RNase (10 µg/ml) e DNase (5 µg/ml) e incube no gelo por 10 a 15 min
 - * Acrescentar TCLK e PMSF ([] 1 mM)
6. Centrifugue o lisado a 10.000 x g por 20 - 30 min a 4 °C para formar um pelete de debris celulares a salve o sobrenadante
7. Armazenar 5 µl sobrenadante para análise em SDS-PAGE

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE *E. COLI* EM CONDIÇÕES NATIVAS

1. Adicione 1 ml de 50% NI-NTA em 4 ml de lisado e agite gentilmente por 60 min
2. Remova o botão da coluna e deixe guardado o conteúdo para análise em SDS-PAGE
3. Lave duas vezes com 4 ml de tampão de lavagem e armazene uma alíquota da lavagem para análise
4. Eluir a proteína 4 vezes com 0,5 ml de tampão de eluição e colete o eluído em quatro tubos
 - Opcional pode adicionar PMSF ([] 1 mM)

Soluções para purificação em condições nativas

1. Tampão de lise pH 8,0

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g
300 mM NaCl	17,54 g
10 mM Imidazol	0,68 g

2. Tampão de lavagem pH 8,0

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g	
20 mM Imidazol	1,36 g	
2 M NaCl	116,9 g	} Modificado
Sarcozil	0,3%	

3. Tampão de eluição pH 8,0

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g
300 mM NaCl	17,54 g
250 mM Imidazol	17,0 g

PROTOCOLO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10%

Lower TRIS/SDS 1,5 M	8%	10%	12%	15%
H ₂ O destilada	3,82 ml	3,29 ml	2,75 ml	1,95 ml
TRIS/SDS 1,5 M pH 8,8	2,03 ml	2,03 ml	2,03 ml	2,03 ml
BIS/ACRILAMIDA 30%	2,13 ml	2,66 ml	3,2 ml	4,0 ml
Persufato de amônio (10%)	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	3,2 µl	3,2 µl	3,2 µl	3,2 µl

Upper TRIS/SDS 0,5 M

H ₂ O destilada	1,68 ml
TRIS/SDS 0,5 M pH 6,8	0,75 ml
BIS/ACRILAMIDA 30%	0,54 ml
Persufato de amônio (10%)	15 µl
TEMED	1,5 µl

Preparo das soluções:**1. Acrilamida**

N, N' Metileno-bis-acrilamida	1 g
Acrilamida	29 g
Água destilada	100 ml

2. Lower TRIS/SDS 1,5M pH 8,8

TRIS base	18,165g
SDS	0,4 g
Água destilada	100 ml

3. Upper TRIS/SDS 0,5M pH 6,8

TRIS base	6,055 g
SDS	0,4 g
Água destilada	100 ml

PROTOCOLO DA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING

1. Retirar a membrana de nitrocelulose do tampão de transferência
2. Enquanto seca a membrana de nitrocelulose, marcar com um lápis os respectivos pesos moleculares do padrão
3. Reidratar a membrana em água destilada
4. Bloquear a membrana com tampão de bloqueio por pelo menos 1 h
5. Lavar a membrana em PBS-T (Tampão de lavagem) uma vez
6. Incubar com o anticorpo por uma hora diluídos em tampão de bloqueio pH 7,2
 - Anticorpo contra MSP1a e MSP1b produzido nos coelhos (1: 5000)
 - IgY contra MSP1a e MSP1b (1:2000)
 - Soro dos camundongos (anti-MSP1a, anti-MSP1b, anti-BL21) diluição de 1:100
7. Lavar a membrana em PBS-T 5 vezes por 10min.
8. Incubar com Anticorpo anti-proteína G, na proporção de 1:1000 por 1 h, Lavar 5 vezes por 10 min
9. Revelar a reação com kit de ECL (quimioluminescência) 1 ml de cada solução (diluição em partes iguais)

HEMAGLUTINAÇÃO EM LÂMINA (JAY et al., 2004)

Preparação de Células Vermelhas Fixadas com glutaraldeído:

- Hemácias frescas colhidas em elsever (1:1)
- Lavar 5 vezes em PBS pH 7,2 e após as lavagens misturar em PBS acrescentado em Glutaraldeído 1%
- Deixar overnigth à 4 °C
- As células fixadas são lavadas 4 vezes em PBS à 2000 rpm por 2 min e 4 vezes com água destilada estéril e estocadas em PBS contendo 1,54 μ M de NaN_3 (Azida Sódica) e estocado à 4 °C

Hemaglutinação in vitro:

- Adicionar 5×10^7 He/ml em 2×10^9 células de E. coli
- Homogeneizar e deixar na estufa à 37 °C sem agitação por 30 min
- Lavar com PBS e ressuspender com o mesmo volume anterior
- Fazer esfregaço sanguíneo
- Fixar com metanol por 15 min
- Corar com giensa por 30 min (2 gotas de giensa para 1ml de água)

Inibição da hemaglutinação in vitro:

- Adicionar 2×10^9 células de E. coli em IgY pré-imune e pós-imune em diferentes concentrações
- Homogeneizar e deixar na estufa à 37 °C sem agitação por 30 min
- Adicionar 5×10^7 Hemácias/ml
- Lavar com PBS e ressuspender com o mesmo volume anterior
- Fazer esfregaço sanguíneo
- Fixar com metanol por 15 min
- Corar com giensa por 30 min

PURIFICAÇÃO DE IgY (POLSON, et al., 1980)

1. Separe a gema da clara (o máximo possível)
2. Retire a película protetora da gema
3. Coloque a gema em tubos graduados de 50 ml
4. Adicione o tampão fosfato de sódio (100 mM Na₂HPO₄ pH 7,6) ate completar o volume de 25 ml
5. Misture bem e adicione 20 ml de clorofórmio
6. Misture até formar uma fase semi-sólida
7. Centrifugue a 1200 x g por 30 min a 4 °C.
8. Recupere o sobrenadante e decante-o por PEG-6000 (polietilenoglicol) na concentração final de 12 %
9. Centrifugue a 15.700 x g por 10 min
10. Ressuspenda o precipitado com 2 ml de tampão fosfato de sódio e estoque a -70 °C ou -20 °C

EXTRAÇÃO DE MEMBRANA EXTERNA (OMP) (MORONA AND REEVES, 1981)

1. cultivar as células em meio LB caldo (induzido com IPTG) 30 ml até a fase exponencial, centrifugar 10 min a 5000 x g
2. Lavar a cultura com 1,5 ml de Tris 30 mM pH 8,1 e centrifugue a 5000 x g por 10 min
3. Ressuspender em 0,5 ml de sacarose a 20% em Tris 30 mM pH 8,1
 - OBS: adicionar 11,4 µl de inibidores de protease [] final 1 mM
4. Adicionar 50 µl de lisozima (10 mg/ml) em EDTA 0,1 M pH 7,3
5. Incubar no gelo durante 30 min
6. Adicionar 5 ml EDTA 3 mM, pH 7,3
7. Romper as células em sonicador por 10 a 20 s no gelo
8. Centrifugar a 5000 x g durante 5 min
9. Recuperar o sobrenadante e centrifugar a 20000 x g por 30 min
10. Ressuspender o centrifugado em 3 ml de Tris 30 mM pH 8,1 Com triton X-100 a 0,2% e MgCl₂ 2 mM, durante 5 min no gelo
11. Centrifugar a 25.000 x g durante 60 min
12. Ressuspender o centrifugado em 100 µl de água milliQ

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (Sigma-Aldrich)

1. Cresça as bactérias recombinantes em LB caldo até atingir a D.O. de 0,5 e induz com IPTG 1 M
2. Lave as células em PBS e faça um esfregaço em lâmina
3. Fixe as células com metanol -20 °C por 10 min e então com acetona -20 °C por 1 min
4. Lave 2 vezes em PBS durante 5 min
5. Bloqueie com PBS contendo 1% de BSA durante 10 min em temperatura ambiente e seque
6. Incubar com anticorpo primário em PBS contendo 1% de BSA, durante 60 min
7. Lave 3 vezes
8. Incube com o anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído em PBS contendo 1% de BSA, durante 30 min
9. Lave 3 vezes
10. Seque e adicione a glicerina e lamínula para fazer a leitura em microscópio epifluorescente

TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (GARCIA et al., 2005)

1. Adsorver as placas com 100 µl de solução de antígeno + tampão de sensibilização (Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6). Concentração do antígeno 5 µg/ml, deixar “overnigth” a 4 °C
2. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20
3. Cobrir os orifícios com 200 µl de tampão de bloqueio (Tampão de sensibilização + 8% de leite em pó desnatado), por 1 h
4. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20
5. Adicionar em duplicata 100 µl do soro diluído (1:50). O soro deve ser diluído em PBS-Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado, e incubar a 37 °C por 45 min em câmara úmida
6. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20
7. Adicionar 100 µl de conjugado peroxidase espécie específica diluído (anti-mouse IgG1 sigma 1:10.000 e anti-mouse Ig2a sigma 1:30.000) em PBS-Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado e incubar a 37 °C durante 45 min em câmara úmida
8. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20
9. Adicionar 100 µl de Tampão substrato cromógeno e manter em agitação
10. Para a reação com 50 µl de 1 M HCl, fazer a leitura com filtro de 490nm.

Soluções:

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

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 ml

2. Tampão de bloqueio

Tampão de sensibilização + 8% de leite em pó desnatado

3. PBS-Tween 20

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 ml
pH 7,4	

4. Tampão de substrato cromógeno

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

5. Substrato cromógeno

Tampão substrato	100 ml
OPD	40 mg
H ₂ O ₂ PA 30%	40 µl