



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FLORA SATIKO KANO

Anaplasma marginale: ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE
msp1 α E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DA VACINA DE DNA
CONTENDO GENES PARA MSP1a, MSP1b E MSP5 EM
CAMUNDONGOS BALB/c.

Londrina
2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FLORA SATIKO KANO

Anaplasma marginale: ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE *msp1 α* E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DA VACINA DE DNA CONTENDO GENES PARA MSP1a, MSP1b E MSP5 EM CAMUNDONGOS BALB/c.

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilda Carlos Vidotto
Co-Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2007

FLORA SATIKO KANO

Anaplasma marginale: ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE
msp1 α E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DA VACINA DE DNA
CONTENDO GENES PARA MSP1a, MSP1b E MSP5 EM
CAMUNDONGOS BALB/c.

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor
em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade
Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Rosângela Zacarias Machado
Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Amauri A. Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a Dr^a Marilda Carlos Vidotto
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de abril de 2007.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação da Prof^a Dr^a Marilda Carlos Vidotto.

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

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Mikio e Tokiko Kano pelo eterno incentivo e amor incondicional; pelo exemplo de simplicidade, honestidade, respeito ao próximo e de otimismo de enfrentar as situações mais adversas.

Aos meus irmãos pelo amor, carinho e amizade. Em especial minha irmã Emiko, minha maior incentivadora e por me proporcionar uma base sólida a cada caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de crescimento e evolução...

À Prof^a Dr^a Marilda C. Vidotto pela orientação, amizade, pela oportunidade de iniciar os estudos na área de biologia molecular e por acreditar que eu pudesse atender suas expectativas.

Ao Prof. Dr. Odilon Vidotto pela co-orientação, colaboração e pela amizade formada nestes 11 anos de convívio, desde que iniciei atividades de iniciação científica sob sua orientação.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Prof. Dr. Amauri A. Alfieri, Prof. Dr. Emerson José Venâncio, Prof. Dr. João Luis Garcia, Prof. Dr. Odilon Vidotto pelas valiosas contribuições.

Agradecimentos especiais ao pesquisador Dr. Fabio Gregori pela receptividade e ensinamentos para a realização das análises filogenéticas; ao Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley pelo auxílio na reconstrução das análises filogenéticas, pela amizade, pelo exemplo de otimismo e pelos agradáveis momentos filosóficos; ao Prof. Dr. João Luis Garcia pelo enorme auxílio que foram indispensáveis nesta tese; ao Prof. Dr. Emerson José Venâncio pelo auxílio em bioinformática; ao Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas pela paciência, coragem e disponibilidade de auxiliar nos primeiros passos na utilização da bioinformática; à técnica e amiga Kerlei Cristina Médici pelo preparo das células da linhagem Vero utilizado neste estudo; a Prof^a Dr^a Eiko N. Itano e a Mari Sumigawa, técnica responsável pelo laboratório de Imunologia, pela colaboração na execução da proliferação de células esplênicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Programa de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de doutorado.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica. Agradecimento especial aos Prof. Dr. Itamar T. Navarro e Prof. Dr. Amauri A. Alfieri pelas sábias palavras de encorajamento que me fizeram prosseguir...

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG).

À Prof^a Dr^a Teresa Cristina de Oliveira por autorizar a utilização de equipamentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, imprescindíveis para realização desta tese.

À Dr^a Elizabete R. M. Marana, responsável pelo Laboratório de Protozoologia, pela disponibilidade e auxílio técnico para realização desta tese.

Aos técnicos de laboratório Ademir, Jussevânia, Dalva, Dalíria, Maria Yoshie, Zé Aldivino e Antônio (Sr. Toninho do Rx) pela ajuda incondicional, pela amizade e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial, dona Cidinha, Neusa, Maria José e aos funcionários do Departamento de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas, Ediel e Josefa (Dona Zefa) pelo bom dia alegre de cada dia nestes longos anos de convivência.

Aos secretários Valdecir, Reinaldo, Nelson e Helenice pela paciência e colaboração na parte burocrática.

Aos queridos amigos que tornaram esta caminhada em momentos especiais. À querida amiga-irmã Betinha agradeço pelo carinho e pela amizade verdadeira incondicional, pelos muitos momentos alegres e difíceis compartilhados ao longo destes anos. A sua amizade com certeza persistirá pela vida inteira onde quer que estejamos. Às amigas Kátia, Michelle e Paula (“as três japinhas”) pela amizade que tão rapidamente se tornou significativa e, por tornar mais leve e tão alegres os intermináveis dias de trabalho; À querida amiga Renatinha pelas valiosas palavras de incentivo e conforto, ensinamentos e pela disponibilidade dedicadas a esta amizade. À Vanas (“japa”) pelo carinho e cuidados dispendidos à nossa amizade. Às amigas Marlise, Ju Dias e Lu Takemura (Lulis) pela amizade, pelo caloroso carinho e zelo. À querida amiga Silvia Trapp que sempre esteve presente em todos os momentos mesmo no pensamento. À querida Dóris pela amizade e pelas inúmeras gargalhadas compartilhadas no laboratório do CCB. À amiga Marisa que me recebeu com tanto carinho na sua casa. Aos amigos e colegas do Laboratório de Zoonoses Felipe, Robertinha, Bruno, Kênio, Mauro e Valeska pelos momentos agradáveis e pelas risadas compartilhadas. Aos amigos do laboratório de Virologia Animal Alexandre, Danilo, Daniel (Frango), Michele, Aline, Rita pela amizade e pelos momentos compartilhados. Agradeço também aos amigos Daniela Pilz, Yurika, Liza, Walfrido, Eleine, Kledir, Melissa Campitelli, Kleber, Claudia e a todos os colegas de pós-graduação.

A todos os estagiários e bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Protozoologia Animal, em especial a Adriana Coelho (Dri) que tanto me ajudou nesta etapa final.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, Muito Obrigada!

RESUMO

KANO, F.S. *Anaplasma marginale*: Análise da variabilidade do gene *msp1 α* e avaliação imunogênica da vacina de DNA contendo genes para MSP1a, MSP1b e MSP5 em camundongos BALB/c. 2007. 142.f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

O *Anaplasma marginale* é um importante patógeno riquetsial de bovinos transmitido por carrapato que invade e se multiplica dentro de eritrócitos, causando anemia hemolítica durante a infecção aguda. A imunização com proteínas de membrana externa (OMP) purificadas induz proteção contra doença aguda. Das 21 OMPs descritas, seis MSPs (1a, 1b, 2-5) já foram bem caracterizadas. O complexo MSP1 (MSP1a e 1b) é adesinas de eritrócitos de bovinos. A MSP1a varia em tamanho pelo número de repetições *in tandem* de 28-29 aminoácidos. Vacina de DNA contra a anaplasnose tem sido investigada usando os genes *msp1 α* e *msp1 β* , e os resultados evidenciaram resposta celular e humoral em camundongos e bovinos. A imunização com DNA plasmidial que codifica genes de interesse é uma tecnologia nova e promissora no desenvolvimento de vacinas. Vacinas de DNA que visam múltiplos epitopos têm se mostrado mais eficientes aumentando a imunogenicidade e a proteção de animais vacinados quando comparadas com as de epitopo único. Os objetivos deste trabalho foram analisar a variabilidade do gene *msp1 α* de amostras paranaenses de *A. marginale*, testar a capacidade dos plasmídios recombinantes expressarem MSP1a, MSP1b e MSP5 em células eucarióticas e avaliar a imunogenicidade destas vacinas administradas individualmente ou em associação, em camundongos BALB/c. A análise da região repetitiva do gene *msp1 α* identificou a presença de seis, cinco e três repetições nas amostras PR1, PR2 e PR3, respectivamente, e seis padrões de repetições inéditas. Contudo, a região da MSP1a responsável pela imunogenicidade foi conservada. Os plasmídios pcDNA/*msp1 α* , pcDNA/*msp1 β* e pcDNA/*msp5*, os quais codificam os genes das MSPs sob o controle do promotor do citomegalovírus e *intron A*, foram construídos, multiplicados em *E. coli* TOPO10 e purificados. A expressão das proteínas MSP1a, MSP1b e MSP5 *in vitro* foi realizada em células Vero usando lipofectamina 2000 e Imunofluorescência Indireta (IFA), utilizando anticorpos monoclonais. Sete grupos de camundongos foram imunizados para avaliar a produção de IgG total e determinar os isotipos IgG1 e IgG2a: G1-100 μ L PBS; G2-100 μ g de vetor; G3- 100 μ g de corpúsculos iniciais de *A. marginale* + adjuvante de Freund; G4- 100 μ g pcDNA-*msp1 α* ; G5-100 μ g pcDNA-*msp1 β* ; G6-100 μ g of pcDNA-*msp5* e G7- pool de plasmídios (33 μ g de cada plasmídio). Três semanas após a última imunização, os camundongos foram sacrificados para avaliar a proliferação dos esplenócitos. As células Vero transfectadas com plasmídios recombinantes reagiram com anticorpos monoclonais específicos, demonstrando a expressão dos genes *msp*. IgG específica para a MSP1a e MSP5 foram detectadas tanto por ELISA quanto por Western blot. Os grupos que receberam pcDNA-*msp1 α* and pcDNA-*msp5* mostraram predomínio do isotipo IgG2a, e proliferação de esplenócitos, sugerindo que estes plasmídios são bons candidatos para estimular resposta imune Th1. A associação dos três plasmídios recombinantes (pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* and pcDNA-*msp5*) empregados na imunização de camundongos induziram altos títulos de anticorpos por ELISA e reagiram com todas proteínas recombinantes (rMSP1a, rMSP1b e rMSP5) de *A. marginale* por Western blot. Adicionalmente, a combinação dos plasmídios levou a uma forte proliferação de linfócitos (SI = 12, 2), enquanto o gene *msp1 α* determinou proliferação significativa (SI = 2,6) e os genes *msp1 β* e *msp5* não promoveram proliferação (SI<2). Os resultados demonstraram que a associação dos plasmídios induziu a expressão das MSPs e estimulou proliferação de linfócitos T, podendo ser uma estratégia eficiente para a imunoprofilaxia da anaplasnose.

Palavras-chave: MSPs, *Anaplasma marginale*, Vacina DNA, imunogenicidade

ABSTRACT

KANO, F.S. *Anaplasma marginale*: Variability analysis of gene *msp1 α* and immunogenic evaluation of DNA vaccine containing genes for MSP1a, MSP1b and MSP5 in BALB/c mice. 2007. 142.f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

Anaplasma marginale is an important tick-transmitted rickettsial pathogen of cattle that invades and multiplies within erythrocytes, causing severe hemolytic anemia during acute infection. Immunization with purified outer membrane proteins (OMP) induces protection against acute *A. marginale* disease. Of 21 OMP described six major surface proteins (MSPs 1a, 1b, 2-5) have been well-characterized. The complex MSP1 (MSP1a and 1b) is an adhesin for bovine erythrocyte, and MSP1a vary in size and sequence due to the number of tandem 28-29-amino acid repeats. DNA vaccine against anaplasmosis has been investigated using the *msp1 α* and *msp1 β* genes, and the results related cellular and humoral response in mice and cattle. Immunization with DNA plasmids encoding antigens of interest represents a novel and promising method in vaccine research and development. Multiepitope DNA vaccine is a new experience to increase immunogenicity and protection for vaccinated animal as compared in single epitope. The objectives of this study were to analyze the variability of the *msp1 α* gene of *A. marginale* strains from Parana State, evaluate the capacity of the recombinant plasmids to express MSP1a, MSP1b, and MSP5 in eukaryotic cells, and evaluate the immunogenicity of BALB/c mice immunized with these DNA vaccines encoding MSPs of *A. marginale* PR1 strain individually or in association. The analysis of the *msp1 α* gene identified the presence of six, five and three tandem repeats in PR1, PR2 PR3, respectively; however, the region of MSP1a responsible for immunogenicity was conserved. The plasmids pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* and pcDNA-*msp5*, which encode the MSPs genes under the control of cytomegalovirus enhancer/promoter and intron A, were constructed, multiplied in TOP10 *E. coli* and purified. Expression of MSP1a, MSP1b, and MSP5 *in vitro* was performed into Vero cells using lipofectamine 2000, following Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) using monoclonal antibodies. Seven experimental groups of mice were immunized to evaluate the production of whole IgG and to determine IgG1 and IgG2a isotype: G1-100 μ l PBS; G2-100 μ g empty vector; G3-100 μ g *A. marginale* initial bodies + Freund's adjuvant; G4-100 μ g pcDNA-*msp1 α* ; G5-100 μ g pcDNA-*msp1 β* ; G6-100 μ g pcDNA-*msp5*; and G7-pool of recombinant plasmids (33 μ g for each). Three weeks after the last immunization, mice were sacrificed to evaluate spleen cells proliferation. Vero cells transfected with recombinant plasmids reacted with specific monoclonal antibodies, demonstrating the expression of *msp* genes. Specific IgG against MSP1a and MSP5 were detected in either by ELISA and Western blot. The groups that received pcDNA-*msp1 α* and pcDNA-*msp5* exhibited predominance for IgG2a production and splenocytes proliferation, suggesting that these recombinant plasmids are good candidates for elicited T helper 1 immune response. The association of three recombinant plasmids (pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* and pcDNA-*msp5*) used in the immunization of mice induced high antibodies response by ELISA and reacted with all recombinant proteins (rMSP1a, rMSP1b, and rMSP5) of *A. marginale* by Western blot. Also, the combination of plasmids provide strong lymphoproliferation (SI = 12,2), whereas the genes to MSP1a provide significant splenocytes (SI = 2,6) and the genes to MSP1b and MSP5 did not provide significant proliferation (SI<2). The results showed no suppression when the recombinant plasmids were taken in association, and demonstrated that they can generate significant T-cell lymphocyte. Thus, the immunization in association of recombinant plasmids encoding MSPs can be an effective strategy for immunoprophylaxis of anaplasmosis.

Key Words: MSPs, *Anaplasma marginale*, variability, DNA vaccine, immunogenicity

LISTA DE FIGURAS

Artigo de Revisão

Fig.1. Representação esquemática das principais características genéticas de um vetor plasmidial utilizado na vacina de DNA.....35

Fig.2. Hipótese mais aceita do mecanismo de ação das vacinas de DNA utilizando DNA plasmidial. Após a imunização com vacina de DNA o antígeno pode ser apresentado às células T pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) ou células somáticas (células musculares) transfectadas com o DNA plasmidial expressando antígenos. Pelo contrário, estas células, particularmente as células somáticas, podem liberar antígeno para outra APC, pela secreção ou da apoptose das células transfectadas. Estas APCs podem então, apresentar antígeno para células T CD4+ e CD8+.....39

Phylogenetic Analysis of *Anaplasma marginale* Strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1 α* and *msp4* genes

Fig.1. Fig. 1. Amplification of *msp1 α* tandem repeat sequences from different strains of *Anaplasma marginale* by PCR using the 1733 forward and 2956 reverse primers (Lew et al., 2002). Lanes 1 and 11, 100 bp ladder (Invitrogen™); Lane 2–9 *A. marginale* strains: Lane 2, Florida; Lane 3, Parana1; Lane 4, Parana2; Lane 5, Parana3; Lane 6, Rio Grande do Sul (RS18); Lane 7, Minas Gerais (UFV1); Lane 8, Centro Oeste; Lane 9, São Paulo (Jaboticabal); Lane 10, *A. centrale*.68

Fig.2. Sequence of MSP1a tandem repeats in New World strains of *Anaplasma marginale*. (a) The one letter amino acid code was used to depict the different sequences found in MSP1a repeats. Repeat forms α to \square were revised by de la Fuente et al. (2004) and λ to θ are the new repeat forms described from Brazilian strains. Asterisks indicate identical amino acids. Gaps indicate deletions/insertions. (b) The structure of the MSP1a repeat regions was represented for New World strains of *A. marginale* using the repeat forms described in (a)69

Fig.3. Phylogenetic analysis of MSP1a amino acid sequences of *Anaplasma marginale*. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accession numbers are given after sequence)70

Fig.4. Phylogenetic analysis of MSP4 amino acid sequences of *Anaplasma marginale*. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accession numbers are given after sequence)71

Fig.5. Phylogenetic tree showing the relationship of *Anaplasma marginale* strains

from different geographical locations based on the DNA *msp1α* gene sequences deposited in GenBank. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accessions numbers are given after sequence)72

Fig.6. Phylogenetic tree showing the relationship of *Anaplasma marginale* strains from different geographical locations based on the DNA *msp4* gene sequences deposited in GenBank. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accessions numbers are given after sequence)72

DNA vaccines encoding *Anaplasma marginale* MSPs induced immunogenicity in BALB/c mice

Fig.1. Amplification of *msp1α*, *msp1β* and *msp5* gene of *A. marginale* using pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5* as template by PCR using specific primers for each full-length genes. Lane 1: 1 kb leader; Lane 2: *msp1α* amplified from pcDNA-*msp1α*; Lane 3: *msp1β* gene amplified from pcDNA- *msp1β*; Lane 4: *msp5* gene amplified from pcDNA- *msp5*; Lane 5:100 bp ladder95

Fig.2. IgG antibody response measured by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in BALB/c mice of the (a) G1 (phosphate buffer saline-PBS), (b) G2 (100 µg initial bodies *A. marginale*), (c) G3 (100 µg pcDNA-*msp1α*), (d) G4 100 µg pcDNA-*msp1β* + sucrose-phosphate-glutamato (SPG), (e) G4 (100 µg pcDNA-*msp1β* + 2% levamisole), (f) G5 (100 µg pcDNA-*msp5* + SPG). Mice were immunized and blood collected at weeks 0, 3, 6 and 9. Dashed line indicates positive cut-off 96

Fig.3. Humoral responses of serum IgG isotype from BALB/c mice immunized with DNA-vaccine encoding *A. marginale* MSP1a, MSP1b, and MSP5 proteins. Pool of serum taken 0, 3, 6 and 9 weeks after initial immunization were analysed by ELISA. (a) G1 (phosphated buffer saline-PBS), G2 (100 µg initial bodies *A. marginale* + Freund’s Adjuvant), (c) G3 (100 µg pcDNA-*msp1α* + SPG), (d) G4 (100 µg pcDNA-*msp1β* + SPG), (e) G4 (100 µg pcDNA-*msp1β* + 2% levamisole) and (f) G5 (100 µg pcDNA-*msp5* + SPG) 97

Fig.4. Figure. 4: Reactivity of sera from mice immunized with DNA vaccines encoding MSP1a, MSP1b and MSP5 by Western blot. Serologic analysis was developed with a pool of six groups antisera at weeks 0 and 9 from mice immunized in experimental study. Lanes 1 and 2 represents pre immune sera. Lanes 3 and 4: post immune sera at week 9. (A) G3 - pcDNA-*msp1α* + SPG (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP1a). (B) G4 - pcDNA-*msp1β* + SPG (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP1b). (C) G5 - pcDNA-*msp1β* + levamisole 2% (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP1b). (D) G6 - pcDNA-*msp5* + SPG (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*;

lanes 2 and 4: rMSP5). The positions and molecular masses (in kilodaltons) of protein standards are also shown 98

Fig.5. *In vitro* proliferation of splenocytes from DNA-vaccinated BALB/c mice after stimulation of rMSP1b and rMSP5, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added for 4 h. The incorporated MTT cell was then measured. Control splenocytes from mice received the PBS. For comparative purposes, splenocytes from no immunized BALB/c mice were included in the experiment. Stimulation Index (SI) values higher than 2.0 (dashed line) was considered significant 99

Enhanced immunogenicity of DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale* in association

Fig.1. Immunofluorescence of Vero cells transfected with DNA vaccine encoding *A. marginale* MSP1a, MSP1b and MSP5 antigens, using monoclonal antibodies (400x) a. non-transfected Vero cells; b. pcDNA-*lacZ* Vero cells transfected using anti-histidine monoclonal antibody (positive control); c. pcDNA-*msp1α* using ANA22B1 monoclonal antibody; d. pcDNA-*msp1β* using anti-histidine monoclonal antibody; e. pcDNA-*msp5* using ANAF16C1 monoclonal antibody 117

Fig.2. Whole IgG antibody response measured by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in immunized BALB/c mice. (a) G2 (only vector), (b) G3 (100 µg initial bodies of *A. marginale*), (c) G4 (100 µg pcDNA-*msp1α*), (d) G5 (100 µg pcDNA-*msp1β*), (e) G6 (100 µg pcDNA-*msp5*), (f) G7 (33 µg for each pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5*). Mice were immunized at weeks 0, 2, 5, 8 and 11, and the blood collect were at weeks -1, 1, 4, 7, 11 and 15 (back arrows). Dashed line indicates positive cut-off 118

Fig.3. IgG isotype humoral responses of serum from BALB/c mice immunized with DNA-vaccine encoding *A. marginale* MSP1a, MSP1b, and MSP5 proteins. (a) G2 (only vector), (b) G3 (100 µg initial *A. marginale*), (c) G4 (100 µg pcDNA-*msp1α*), (d) G5 (100 µg pcDNA-*msp1β*), (e) G6 (100 µg pcDNA-*msp5*), and G7 pool of plasmids (33 µg each pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β*, and pcDNA-*msp5*). Measured IgG1 and IgG2a responses were taken of pool of serum at -1, 4, 11, and 15 weeks after initial immunization by ELISA 119

Fig.4. Reactivity of mice sera from *A. marginale* and DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b and MSP5 of *A. marginale* by Western blot. Serologic analysis was developed with a pool of seven antisera at weeks -1 and 15 from experimental group. In A: mice immunized with empty vector (G2) (lane 1 and 2), *A. marginale* initial bodies - G3 (lane 3 and 4), pcDNA-*msp1α* - G4 (lane 5 and 6), pcDNA-*msp1β* - G5 (lane 7 and 8), pcDNA-*msp5* - G6 (lane 9 and 10). In B: mice immunized with pool of plasmid (pCnda-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5*). The positions and molecular masses (in kilodaltons) of protein standards are also shown.....118

Fig.5. Proliferation of splenocytes cells from mice immunized with single DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b and MSP5 and in association. The data are presented for

splenocytes proliferation cultured for 5 days with 5 μg of *A. marginale* homogenate/ml. Results are presented as means count per minute of triplicate ultures in Stimulation Index values (SI). SI values ≥ 2.0 (dashed line) were considered significant. Experimental groups were: G1 (saline); G2 (empty vector); G3 (100 μg initial bodies *A. marginale*); G4 (100 μg pcDNA-*msp1* α); G5 (100 μg pcDNA-*msp1* β); G6 (100 μg pcDNA-*msp5*) and G7 (33 μg for each pcDNA-*msp1* α , pcDNA-*msp1* β and pcDNA-*msp5*) 121

LISTA DE TABELAS

Phylogenetic Analysis of *Anaplasma marginale* Strains from Paraná State, Brazil, using the *msp10* and *msp4* genes

Table 1. Source of *Anaplasma marginale* strains used in this study including molecular size and predicted number of internal repeats of each product amplified.....69

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Revisão de Literatura	16
1.2. Artigo de Revisão	29

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral	65
2.2. Objetivos Específicos	65

3. ARTIGO PUBLICADO

3.1. Phylogenetic Analysis of *Anaplasma marginale* Strains from Paraná State, Brazil, Using the *msp1 α* and *msp4* genes

Abstract	67
3.1.1. Introduction	67
3.1.2. Materials and Methods	68
3.1.2.1. <i>Anaplasma marginale</i> strains	68
3.1.2.2. Polymerase chain reaction	68
3.1.2.3. Sequence	68
3.1.2.4. Sequence alignment and phylogenetic analysis.....	68
3.1.3. Results	68
3.1.4. Discussion	69
Acknowledgements	73
References	73

4. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1. DNA vaccines encoding *Anaplasma marginale* MSPs induced immunogenicity in BALB/c mice

Abstract	77
4.1.1. Introduction	77
4.1.2. Materials and Methods	79
4.1.2.1. <i>Anaplasma marginale</i> strain and DNA extract.....	79
4.1.2.2. Construction of the recombinant plasmids.....	79
4.1.2.3. Production of DNA vaccines	81
4.1.2.4. Production of recombinant MSPs protein.....	81
4.1.2.5. Animal and experimental design	82
4.1.2.6. Antibody assays and isotypes	82
4.1.2.7. Western blot analysis	83

4.1.2.8. <i>Statistical analysis</i>	83
4.1.2.9. <i>Lymphocyte proliferation</i>	84
4.1.3. Results	84
4.1.3.1. <i>A. marginale DNA vaccine construction</i>	84
4.1.3.2. <i>Humoral Immune response of mice elicited by DNA vaccination</i>	85
4.1.3.3. <i>Cellular Immune response of mice elicited by DNA vaccination</i>	86
4.1.4. Discussion	86
Acknowledgements	89
References	89

4.2. Enhanced immunogenicity of DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale* in association

Abstract.....	101
4.2.1. Introduction.....	102
4.2.2. Material and Methods.....	103
4.2.2.1. <i>Anaplasma marginale strain and DNA extract</i>	103
4.2.2.2. <i>Production of DNA vaccines</i>	103
4.2.2.3. <i>Production of recombinant MSPs proteins</i>	104
4.2.2.4 <i>In vitro transfection and expression</i>	104
4.2.2.5. <i>Animal and experimental design</i>	105
4.2.2.6. <i>Antibody assays and isotypes</i>	105
4.2.2.7. <i>Western blot analysis</i>	106
4.2.2.8. <i>Statistical analysis</i>	106
4.2.2.9. <i>Proliferation Assay</i>	107
4.2.2. Results.....	107
4.2.2.1. <i>Eukaryotic expression of MSPs antigens of A. marginale</i>	107
4.2.2.2. <i>Humoral immune response of mice elicited by DNA vaccination</i>	108
4.2.2.3. <i>T cell-mediated immune responses</i>	109
4.2.3. Discussion.....	109
Acknowledgements	112
References	113

5. CONCLUSÕES

APÊNDICES

A. Lista de reagentes	124
B. Soluções e tampões	126
C. Protocolo de técnicas	129

ANEXOS

A. Normas de publicação do periódico <i>Semina Ciências Agrárias</i>	135
B. Normas de publicação do periódico <i>Research in Veterinary Science</i>	138

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

A anaplasmosose é uma hemoparasitose de caráter febril e hemolítico de bovinos causada pelo *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). Esta riquetsia pertence à família Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001) e tem distribuição mundial. Bovinos das regiões de clima tropical e subtropical são mais acometidos devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento dos transmissores biológicos (carrapatos ixodídeos) e mecânicos (insetos hematófagos) (Rickey, 1981; Kocan et al., 2004).

Os prejuízos econômicos ocasionados pela anaplasmosose bovina são atribuídos à redução na produção de carne e leite, abortamento, morte e ao custo com o tratamento dos animais (Rickey, 1981; Kuttler, 1984). Bovinos que se recuperam da doença aguda tornam-se persistentemente infectados e estão protegidos contra o desafio com cepas homólogas e parcialmente protegidos ao desafio com cepas heterólogas (Kocan et al., 2003).

As medidas de controle da anaplasmosose incluem: redução ou eliminação dos transmissores utilizando o tratamento dos animais com produtos acaricidas e rotação de pastagem; quimioprofilaxia; premunição com sangue de bovinos portadores; vacinação com cepas vivas atenuadas ou com cepa heteróloga não-patogênica (*Anaplasma centrale*) ou com vacinas mortas (Palmer, 1989; Kocan et al., 2003).

As vacinas em uso para a anaplasmosose são compostas por cepas vivas atenuadas de *A. marginale* ou pela cepa heteróloga de *A. centrale*. Essas vacinas apresentam limitações devido à necessidade de criopreservação; eficácia (incapacidade para proteger contra cepa heteróloga de *A. marginale*); dificuldade de padronização da quantidade de inóculo; risco de transmissão de outros patógenos como os vírus da leucose enzoótica bovina (Rogers et al., 1988), *Babesia* spp, *Trypanosoma* spp, *Brucella* spp, *Mycobacterium* spp e cepas heterólogas de *A. marginale*, e possibilidade de indução de isoeritrólise nos recém nascidos (Kuttler et al., 1984).

Os corpúsculos iniciais de *A. marginale* semipurificados induziram imunidade eficaz contra a doença clínica (Montenegro-James et al. 1991). Adicionalmente, bovinos imunizados com a fração de membrana externa do *A. marginale* demonstraram proteção total aos desafios homólogos e heterólogos pela redução significativa de ricketsemia nos animais imunizados (Tebele et al., 1991).

Estudos com bovinos e camundongos identificaram que a principal resposta da imunidade protetora está relacionada com a proliferação de linfócito T CD4⁺, e a síntese de interferon-gama (IFN- γ) e anticorpos da subclasse IgG2 contra os antígenos de superfície do microrganismo do gênero *Anaplasma* (Brown et al., 1998). Entretanto, a identificação de antígenos de membrana externa do *A. marginale* que confere imunidade protetora não é bem caracterizada.

O seqüenciamento do genoma do *A. marginale* (cepa Saint Maries) identificou 21 proteínas antigênicas de membrana externa, das quais, quatorze são proteínas de secreção do tipo IV (Lopes et al., 2005). Entre elas, seis proteínas principais de superfícies (MSPs) foram melhor caracterizadas e designadas de MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa) e MSP5 (19 kDa) (McGuire, et al., 1984; Visser et al., 1992; Oberle et al., 1993; McGarey et al., 1994; Palmer & Alleman et al., 1997). Estas proteínas estão envolvidas nos mecanismos de transporte de nutrientes, adesão e invasão dos eritrócitos, multiplicação nas células hospedeiras e com o mecanismo de evasão do sistema imune (McGarey et al., 1994; McGarey & Allred, 1994; Lanzer et al., 1997; French et al., 1998).

A MSP1 é um complexo protéico formado pelas MSP1a e MSP1b. A MSP1a é codificada por um único gene (*msp1 α*) e apresenta variação na massa molecular de 70 a 105 kDa devido ao número de repetições *in tandem* de 28 a 29 aminoácidos entre as diferentes cepas de *A. marginale* (Allred et al., 1990, de la Fuente et al., 2001; 2003). A MSP1b é

codificada por família multigênica (*mSPβ1* e *mSPβ2*) e apresenta massa molecular de 100 kDa (Barbet & Allred, 1991, Camacho-Nuez et al., 2000). Este complexo protéico apresenta função de adesina, onde a MSP1a participa na adesão em células de carrapatos e eritrócitos bovinos e a MSP1b faz a adesão apenas em eritrócitos bovinos (McGarey et al., 1994; Blouin et al., 2003; Garcia-Garcia et al., 2004).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região da seqüência repetitiva, possibilitou a identificação do número de repetições existente entre as cepas de *A. marginale* (Lew et al., 2002; Vidotto et al., 2006). As cepas australianas apresentaram apenas uma única seqüência repetitiva, o que não foi verificado nas cepas de origem americana, mexicana, argentina e brasileira de *A. marginale* que variaram entre uma a oito repetições *in tandem* (de la Fuente et al., 2004, Vidotto et al., 2006). O gene *mSP1α* demonstrou ser um marcador genético estável entre as cepas americanas de *A. marginale* (de la Fuente et al., 2001, Bowie et al., 2002). Entretanto, a análise filogenética da seqüência de aminoácidos e de nucleotídeos da MSP1a não possibilitou a definição ou distribuição das cepas brasileiras e do Novo Mundo de *A. marginale* por regiões geográficas (de la Fuente et al., 2003).

A caracterização antigênica da MSP1a, utilizando o anticorpo monoclonal ANA22B1, de cepas de *A. marginale* de diferentes regiões geográficas demonstrou a conservação do epitopo (Kano et al., 2002, Oliveira et al., 2003). Dentro das seqüências repetitivas da MSP1a existem aminoácidos conservados e variáveis e são reconhecidos epitopos para linfócito T CD4⁺ localizados, preferencialmente, na região amino-terminal (Brown et al., 2002). A resposta humoral também é direcionada mais fracamente para a região carboxi-terminal da MSP1a, diferentemente da região amino-terminal (Garcia-Garcia et al., 2004). O epitopo da MSP1a foi reconhecido pelos linfócitos CD4⁺ de memórias em bovinos

imunizados com proteínas de membrana externa e os bovinos apresentaram proteção total contra o desenvolvimento da riquetsemia (Brown et al., 1998).

Animais imunizados com as proteínas MSP1a e MSP1b apresentaram diminuição da parasitemia, leve queda de hematócrito e redução do número e gravidade dos casos clínicos da doença. Os animais foram protegidos contra desafios homólogos e heterólogos (Palmer et al., 1986; Barbet et al., 1987; Palmer et al., 1989; Brown et al., 2002).

A imunidade protetora conferida pela fração de membrana externa de *A. marginale* inclui as seis MSPs. Bovinos imunizados com esta fração, tiveram predomínio da resposta humoral e celular (linfócito T) direcionada contra a MSP1, MSP2 e MSP3. Bovinos imunizados com pcDNA/*msp1β*, após o desafio também apresentaram forte resposta de anticorpos direcionados para a MSP2 (Andrade et al., 2004). A MSP2 e a MSP3 são codificadas por multigenes que apresentam variação genética e antigênica entre as cepas de *A. marginale* (Alleman et al., 1997; French et al., 1998; Kano et al., 2002; Oliveira et al., 2003). A variação antigênica da MSP2 pode ocorrer num mesmo ciclo de riquetsemia da infecção aguda (Eid et al., 1996) e foram detectadas três variantes antigênicas da MSP2 numa infecção persistente. Polimorfismos genéticos e antigênicos foram identificados na MSP2 e MSP3 e, em função disso, são atribuídas a estas proteínas atividades no mecanismo de evasão da resposta imune e persistência do microrganismo no hospedeiro (, French et al., 1998; Palmer et al., 2000). A região hipervariável da MSP2 existem múltiplos epitopos para linfócito T CD4⁺ com produção de IFN- γ e estão em maior número na membrana (Brown et al., 2003; Lopez et al., 2005).

As proteínas MSP4 e MSP5 são codificadas por um único gene (*msp4* e *msp5*) e são conservadas antigênica e molecularmente em todas as cepas de *A. marginale* estudadas e entre as espécies de *A. centrale* e *A. marginale* (Visser et al., 1992; Oberle et al., 1993; Knowles et al., 1996; Kano et al., 2002). A MSP4 mostrou-se pouco imunogênica frente aos soros de

animais vacinados com a proteína nativa purificada do isolado Flórida de *A. marginale* (Oberle et al., 1993). A MSP5 é uma das proteínas de *A. marginale* mais estudadas e utilizadas no diagnóstico de anaplasnose, além de demonstrar boa imunogenicidade (Knowles et al., 1996; Lopez et al., 2005; Marana et al., 2006).

Cepas brasileiros de *A. marginale* apresentaram certo polimorfismo quanto aos epítopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais, produzidos contra as MSPs da cepa Florida, entre eles, os epítopos da MSP1b e MSP2. A MSP1a e MSP4 estão conservados entre as cepas brasileiras. A MSP5 que apresenta epítopos conformacionais também se apresentou conservada (Patarroyo et al., 1994; Kano et al., 2002).

A imunidade contra o *A. marginale* requer mecanismos humorais e celulares. Anticorpos direcionados contra os corpúsculos iniciais bloqueiam a infectividade da riquetsia (Palmer & McGuire, 1984). Possivelmente, anticorpos contra as MSPs funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a eliminação de *A. marginale* por macrófagos (Cantor et al., 1993). Outra possível função dos anticorpos neutralizantes seria o bloqueio da invasão da riquetsia em eritrócitos. Anticorpos contra a MSP1a e a MSP1b bloqueiam a aglutinação de eritrócitos de bovinos por corpúsculos iniciais de *A. marginale* (McGarey & Allred, 1994; de la Fuente et al., 2003; Tamekuni et al., 2006).

Isoladamente, é pouco provável que os anticorpos contra o *A. marginale* sejam capazes de proteger os bovinos contra a anaplasnose (Brown et al., 2001), pois a inoculação de soro de animais imunes em bovinos susceptíveis não protegeu contra o desafio com *A. marginale* (Gale et al., 1992). Dessa forma, evidencia-se a importância da resposta celular, a qual envolve a participação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), produtores de interferon-gama (IFN- γ) (Brown et al., 1998). Esta citocina ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que apresenta ação tóxica sobre o *A. marginale*, estimulando a expressão de receptores de Fc e a fusão de fagossomo e lisossomos (Brown et al., 1998). Em

bovinos o IFN- γ atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG2 (Cantor et al., 1994). Este isotipo de imunoglobulina apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio da opsonização em comparação ao isotipo IgG1 (McGuire et al, 1979), possivelmente por estar envolvido no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (Tuo et al., 2000). Valdez et al. (2002) investigaram, *in vitro*, a função de linfócitos T CD4⁺ durante a anaplasnose aguda, mediante a depleção parcial destas células com anticorpo monoclonal anti-CD4 em bezerros esplenectomizados. Não foram observadas diferenças significativas com relação ao decréscimo do volume globular e de riquetsemia dos animais com depleção de linfócitos CD4⁺ e o grupo controle. Estes resultados evidenciam a participação de linfócitos T CD4⁺ na imunidade protetora para a anaplasnose.

A avaliação da indução da resposta imune e a proteção clínica foram avaliadas utilizando cepas heterólogas de *A. centrale* (Vidotto et al., 1998), fração de membrana externa (Tebele et al., 1991), MSPs nativas (Palmer et al., 1986), MSPs recombinantes isoladamente (Palmer et al., 1989), vacinas de DNA com os genes *msp1 α* (Arulkanthan et al., 1999) ou *msp1 β* (Andrade et al., 2004) de *A. marginale*. Os resultados obtidos demonstram o desenvolvimento da indução da imunidade com proteção parcial ou total contra desafios homólogos e heterólogos. A agregação de rMSPs recombinantes ao Complexo Imunoestimulante (ISCOM) demonstrou boa indução da resposta humoral e celular em camundongos (Kawasaki et al., 2007 *in press*), o que pode ser avaliado em bovinos para verificar a capacidade protetora desta construção. Recentemente, a identificação de novas proteínas de membrana externa de *A. marginale*, como a VirB9 em vetor plasmidial de expressão em células de mamíferos demonstrou capacidade promissora na indução da imunidade protetora em bovinos (Lopez et al., 2007 *in press*).

A identificação de outras proteínas com capacidade de indução da resposta imune protetora é de grande importância para a incorporação em vacinas, para permitir o entendimento das funções destas proteínas na patogênese do *A. marginale* e, conseqüentemente, a proteção total contra cepas homólogas e heterólogas.

Referência Bibliográfica

- ALLEMAN, A.R., BARBET, A.F., 1997. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, v 34, 270-276, 1997.
- ALLRED, D.R., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H., LEIB, S.R., HARLLINS, T.M., MCELWAIN, T.F., BARBET, A.F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.87, p.3220-3224, 1990.
- ANDRADE, G.M., R.Z. MACHADO, R.Z., VIDOTTO, M.C., VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1026, p.257-266, 2004.
- ARULKANTHAN, A., BROWN, W.C., MCGUIRE, T.C., KNOWLES, D.P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *m脾1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.67, n.7, p.3481-3487, 1999.
- BARBET, A.F.; PALMER, G.H.; MYLER, P.J.; MCGUIRE, T.C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infection and Immunity*, v.55, p.2428-2435, 1987.
- BARBET, A. F.; ALLRED, D. R. The *m脾1β* multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infection and Immunity*, v.59, n.3, p.971-976, 1991.
- BLOUIN, E.F., SALIKI, J.T., DE LA FUENTE, J., GARCIA-GARCIA, J.C., KOCAN, K.M. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. *Veterinary Parasitology*, v.111, p.247-260, 2003.
- BOWIE, M. V., de la FUENTE, J., KOCAN, K. M., BLOUIN, E. F., BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cycling transmission between ticks and cattle. *Gene*, v.282, p.95-102, 2002.
- BROWN, W.C., SHKAP, V., ZHU, D., MCGUIRE, T.C., TUO, W., MCELWAIN, T.F., PALMER, G.H. CD4⁺ T lymphocytes and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infection and Immunity*, v.66, p.5406-5413, 1998.
- BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; LEWIN, H.A.; MCGUIRE, T.C. CD4⁺ T lymphocyte 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.C.; MCGUIRE, T.C.; MWANGI, W.; KEGERREIS, K.A.; MACMILLAN, H.; LEWIN, H.A.; PALMER, G.H. Major histocompatibility complex class II-derived DR-restricted memory CD4⁺ T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 5521, 2002.
- BROWN, W.C., BRAYTON, K.A., STYLER, C.M., PALMER, G.H. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN-γ responses in MSP2 vaccinates. *The Journal of Immunology*, v.170, p.3790-3798, 2003.

- CAMACHO-NUEZ, M., MUNHOZ, M. L., SUAREZ, C.E., MCGUIRE, T.C., BROWN, W.C., PALMER, G.H. Expression of polymorphic *msp1b* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and Immunity*, v.68, 1946-1952, 2000.
- CANTOR, G.H., PONTZER, C.H., PALMER, G.H. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Veterinary Immunology Immunophatology*, v.37, p.343-350, 1993.
- de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the erlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal of Parasitology*, v.31, p.145-153, 2001.
- de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOWIN, E. F.; KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Veterinary Microbiology*, v.91, n. 2-3, p.265-283, 2003.
- de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BARBET, A.F.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (Rickettsiales: Anaplasmataceae) to tick cells. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.313-322, 2004.
- DUMLER, J. S., BARBET, A. F., BEKKER, C. P. J., DASCH, G. A., PALMER, G. H., RAY, S.T., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "EGH agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.2145-2165, 2001.
- EID, G.; FRENCH, D. M.; LUNDGREN, A. M.; BARBET, A. F.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and Immunity*, v.64, n.3, p.836-841, 1996.
- FRENCH, D. M.; McELWAIN, T. F.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and Immunity*, v.66, n.3, p.1200-1207, 1998.
- GALE, K.R.; LEATCH, G.; GARTSIDE, M.; DIMMOCK, C.M. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive transfer experiments. *Parasitology Research*, v.78, p.410-415, 1992.
- GARCIA-GARCIA, J.C., DE LA FUENTE, J., BLOUIN, E.F., JONSON, T.J., ALBUR, T., ONET, V.C., SALIKI, J.T., KOCAN, K.M. Differential expression of the *msp1 α* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and ticks cells. *Veterinary microbiology*, v.98, p.261-272, 2004.
- LEW, A.E., BOCK, R.E., MINCHIN, C.M., MASAKA, S. A *msp1 α* Polymerase Chain Reaction assay for species detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.325-335, 2002.
- LOPEZ, J.E., SIEMS, W.F., PALMER, G.H., BRAYTON, K.A., MCGUIRE, T.C., NORIMINE, J., BROWN, W.C. Identification of novel antigenic proteins in a complex

Anaplasma marginale outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infection and Immunity*, v.73, p.8109-8118, 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, p.131-138, 2002.

KAWASAKI, P.M., KANO, F.S., TAMEKUNI, K., GARCIA, J.L., MARANA, E.R., VIDOTTO, O., VIDOTTO, M.C. immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). *Research in Veterinary Science*, v., 2007. *in press*

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

KOCAN, K.M., de la FUENTE, J., BLOUIN, E.F., GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) recent advances in defening host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, v.129, p.S285-S300, 2004.

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

LANZER, M.; GROSS, U.; MOLL, H. Mechanisms of parasite persistence and immune evasion. *Parasitology Today*, v.13, n.1, p.1-3, 1997.

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

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

LOPEZ, J.E., PALMER, G.H., BRAYTON, K.A., DARK, M.J., LEACH, S.E., BROWN, W.C. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infection and Immunity... in press*

MARANA, E.R.M., KANO, F.S., TAMEKUNI, K., ATALIBA, A.C., VICENTINI, J.C., SPURIO, R.S., VIDOTTO, M.C., VIDOTTO, O. Padronização e avaliação de um teste de ELISA por competição para o diagnóstico da anaplasmosse bovina utilizando a proteína recombinante Msp5-PR1. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Riquetisioses, *Anais...*, 5, Ribeirão Preto, SP, 2006.

MCGAREY, D.J. AND ALLRED, D.R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infection and Immunity*, v.62, 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.

- McGUIRE, T. C.; MUSOKE, A. J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*, v.38, p.249-256, 1979.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JAMES, M.A, BENITEZ,M.T., LEON, E., BAEK, B.K., GUILLEN, A T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitology Research*, v.77, p.93-101, 1991.
- OBERLE, S.M., PALMER, G.H., BARBET, A.F. Expression and immune recognition of the conserved MSP-4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.61, p.5245-5251, 1993.
- OLIVEIRA, J.B., MADRUGA, C.R., SCHENK, M.A.M, KESSLER, R.H., MIGUITA, M., ARAÚJO, F.R. 2003. Antigenic characterization of four Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* Rickettsiaceae: Ehrlichiae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.395-400, 2003.
- PALMER, G.H., MCGUIRE, W.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *The Journal Immunology*, v.133, p.1010-1015, 1984.
- PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; DAVIS, W.; MCGUIRE, T. C. Immunization with an isolate common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science*, v.231, p.1299-1302, 1986.
- PALMER, G.H. *Anaplasma vaccines*. In: Wright, I.G. (Ed.), *Vet. Protozoan Hemoparasite Vaccine*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-29, 1989.
- PATARROYO, J.H., HENCKEL, D.J., PRATES, A. A., MAFRA, C.L. Antigenic profile of pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin using western blot technique. *Veterinary Parasitology*, v.52, p.124-137, 1994.
- RICHEY, E.J. Bovine anaplasmosis. In: Howard, R.J. (ed.) *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice*, p.767-772, 1981.
- ROGERS, R.J., DIMMOCK, C.K., VOS, A.J., RODWELL, B.J. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Australian Veterinary Journal*, v.65, p.285-287, 1988.
- TAMEKUNI K., KANO F.S., KAWASAKI P.M., IGARASHI M., ATALIBA A.C., COELHO A.L.M., MARANA E.R.M., VIDOTTO M.C., VIDOTTO O. Cloning, sequencing and antigenic characterization of Msp1a and Msp1b recombinant proteins of the *Anaplasma marginale* PR1 strain. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Riquetisioses, *Anais...*, 5, Ribeirão Preto, SP., 2006.
- TEBELE, N., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H., 1991. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity*, v.59, p.3199-3204, 1991.
- TUO, W.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ZHU, D.; BROWN, W.C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.68, p.270, 2000.
- VALDEZ, RA, MCGUIRE, TC, BROWN, WC, DAVIS, WC, JORDAN, JM, KNOWLES, DP. Selective in vivo depletion of CD4⁺ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibodies

during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, p.417-424, 2002.

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

VIDOTTO, M.C., KANO, F.S., GREGORI, F., HEADLEY, S.A., VIDOTTO, O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1 α* and *msp4*. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 53, p.404-411, 2006.

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

1.2. ARTIGO DE REVISÃO

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Semina: Ciências Agrárias*

Vacina de DNA: Aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária

DNA vaccines: General concerns and its applications in human and veterinary medicine

Authors: Flora S. Kano, Odilon Vidotto e Marilda C. Vidotto*

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Campus Universitário, Caixa postal 6001, 86051-970 Londrina, Paraná, Brasil.

***Universidade Estadual de Londrina, Depto de Medicina Veterinária Preventiva-CCA, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86051-970 – Londrina, Pr- Brasil.**

Fone: 55- 021 43 3371 4068. Fax: 55- 021 43 33274207 E-mail: macarlos@uel.br

Resumo

A vacinação com DNA é uma das mais promissoras técnicas de imunização contra uma variedade de patógenos e tumores, para os quais os métodos convencionais não tem sido eficientes. Vacinas de DNA são capazes de induzir resposta imune humoral e celular, tanto para resposta de linfócitos CD4⁺ quanto CD8⁺, sem a necessidade de microrganismos vivos. Apesar do grande potencial de induzir imunidade protetora, a vacina de DNA nem sempre apresenta bons resultados. A imunidade depende de vários fatores como a seleção do gene alvo, construção do vetor de expressão, frequência e via de administração da vacina, quantidade de DNA, localização do antígeno codificado pelo plasmídeo e idade, saúde e espécies de animais vacinados. Esta revisão relata o desenvolvimento de algumas vacinas de DNA para doenças de interesse na medicina veterinária e humana.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, vacina de DNA, bovinos, resposta humoral, resposta celular

Abstract

The vaccination with DNA is one of the most promising immunization techniques against a pathogens variety and tumors, for which the conventional methods have not been efficient. DNA vaccines are capable to induce immune humoral and cellular response, directed to lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺, without the necessity of live microorganisms. In spite of the great potential of inducing protective immunity, the DNA vaccine not always has success. The immunity depends on several factors such as the selection of the target gene, construction of the expression vector, frequency and route of administration of the vaccine, amount of DNA, location of the antigen codified by the plasmid and age, health and species of vaccinated animals. This revision shows the development of some vaccines of DNA for diseases of interest in the veterinary and human medicine.

Key words: *Anaplasma marginale*, DNA vaccine, cattle, humoral response, cellular response

Introdução

A vacinação é a medida mais eficiente e menos dispendiosa para evitar doenças infecciosas. Apesar dos grandes benefícios das vacinas existentes, há ainda muitas doenças para as quais não

existem vacinas. Recentemente tem ocorrido o ressurgimento de várias doenças, principalmente nos países em desenvolvimento.

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. As vacinas de primeira geração foram produzidas com microrganismos vivos e atenuados, como a vacina BCG contra a tuberculose, ou mortos e inativados como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (BLOOM, 1989). Na última década, o grande avanço da biologia molecular permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e a produção de antígenos e foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Estas estratégias permitiram o desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as de subunidades, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais ou sintéticas, e antígenos recombinantes. As vacinas gênicas ou de terceira geração surgiram com a introdução de genes ou fragmentos de genes, que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial (RODRIGUES JR et al., 2004).

A vacina de DNA foi descrita em 1990, quando o plasmídeo contendo um gene repórter que codifica a β -galactosidase expressou a proteína após a inoculação direta no músculo de camundongos (WOLFF et al., 1990). Este estudo avaliou fatores que determinam a eficiência da transferência do gene e da imunogenicidade conferida pela inoculação do plasmídeo. Posteriormente, a inoculação de DNA que codifica uma proteína imunogênica do vírus influenza conferiu imunidade protetora em camundongos (ULMER et al., 1993). A partir destes resultados, o entendimento sobre o mecanismo imunológico induzido por este tipo de vacina despertou interesse da comunidade científica.

Diversos trabalhos têm demonstrado a indução da imunidade protetora em camundongos pela imunização genética contra uma variedade de microrganismos como vírus (DAVIS & McCLUSKIE, 1999), bactérias (STRUGNELL et al., 1997) e protozoários (KALINNA, 1997), contra o câncer (LIU et al., 2004) e algumas doenças autoimunes (RAMSHAW et al., 1997). Na medicina humana, as pesquisas com vacinas de DNA têm sido direcionadas principalmente para a AIDS, malária e tuberculose (WANG et al., 1998, WANG et al., 2005; ZHANG et al., 2007). A utilização da vacinação por DNA na terapia contra tumores gerou resultados satisfatórios (LIU et al., 2004) e, recentemente, resultou no controle de crescimento de melanoma em estágio avançado (LIAO et al., 2006).

A administração de uma única dose de plasmídeo pode proporcionar um amplo espectro de resposta imune, incluindo a ativação dos linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺, os quais secretam citocinas e têm função reguladora na produção de anticorpos (KOWALCZYK & ERTL, 1999). O sucesso da imunização com DNA depende, principalmente, da natureza dos antígenos, da frequência e via de administração, da concentração de DNA administrada, da localização celular do antígeno codificado pelo plasmídeo (secretado, ligado à membrana ou citoplasmático), da idade e saúde do hospedeiro e da espécie dos animais vacinados (RAINCZUK et al., 2003; MOREL et al., 2004; ROBINSON, 1997; FYAN et al., 1993).

O material genético dos microrganismos é pouco estável na célula humana devido ao tamanho da molécula de DNA e à repulsão existente entre as cargas negativas da membrana da célula e do DNA. Quando o material genético não é transfectado à célula, rapidamente é degradado pelas nucleases (LEVY et al., 1996) e não haverá produção de anticorpos pela ausência da expressão protéica. Para facilitar a entrada do DNA na célula são utilizadas, em geral, partículas virais e lipossomas (PERKINS et al., 2005; BRIANE et al., 2002), mas há reações adversas. No caso das partículas virais o risco está na toxicidade dos vírus, que podem se integrar à célula (GLENTING & WESSELS, 2005). Melhorar a propagação pelas células é de grande importância para o desenvolvimento de vacinas de DNA, uma vez que a indução efetiva da imunidade tem requerido várias imunizações utilizando concentrações altas de plasmídios (MWANGI et al., 2005).

Construção da vacina de DNA

A vacina é baseada na tecnologia do DNA recombinante que envolve a transferência de um determinado gene (transgene), que codifica uma proteína (imunógeno), dentro de um vetor de expressão para células eucarióticas (WAINE & McMANUS, 1995).

Durante a década de 90, diferentes vetores que expressam genes em células de mamíferos foram desenvolvidos, bem como novos métodos de transferência gênica direta (AZEVEDO et al., 1999). Um vetor ideal deve carrear grande capacidade genômica; ser de fácil produção; direcionar a resposta imune para tipos específicos de células; não permitir replicação autônoma do DNA; garantir uma expressão gênica por longo período; não ser tóxico; e não induzir reações de tolerância e auto-

imune nos hospedeiros (GLENTING & WESSLES, 2005). Os vetores virais e plasmidiais são os mais utilizados na transferência gênica direta.

Os vetores virais são de fácil propagação entre as células, eficazes na ativação tanto da resposta imune humoral quanto celular e requerem muitas vezes, apenas uma aplicação (SEDEGAH et al., 1998). Entretanto, têm a desvantagem de serem derivados de patógenos; apresentarem risco de mutagênese insercional; inativação pelo sistema complemento; e serem contra-indicados para pessoas com imunodepressão. Portanto, os vetores virais são de interesse limitado para o propósito de imunização dependendo do gene em questão (GLENTING & WESSELS, 2005).

Um dos vetores utilizados nas vacinas de DNA é o plasmídio bacteriano, desenvolvido originalmente para expressão *in vitro* de proteínas em células de mamíferos (DAVIS & McCluskie, 1999). Os plasmídios apresentam maior segurança biológica, baixo custo, fácil produção, relativa estabilidade e capacidade genômica de 2 a 19 kilobases, que podem ser transferidos para as células musculares.

Os plasmídios utilizados como vacinas devem conter os seguintes elementos essenciais: i) um promotor de expressão para células de mamíferos; ii) sinal de poliadenilação (poliA) do transcrito (mRNA), iii) um marcador de seleção; iv) uma origem de replicação procariótica e v) sítio de múltipla clonagem onde é inserido o gene de interesse. Outras seqüências também são importantes como intron que aumenta a atividade do promotor, peptídeo sinal e seqüências de seis nucleotídeos com função imunoestimulatória (GURUNATHAN et al., 2000; GLENTING & WESSELS, 2005), como mostra a Figura 1.

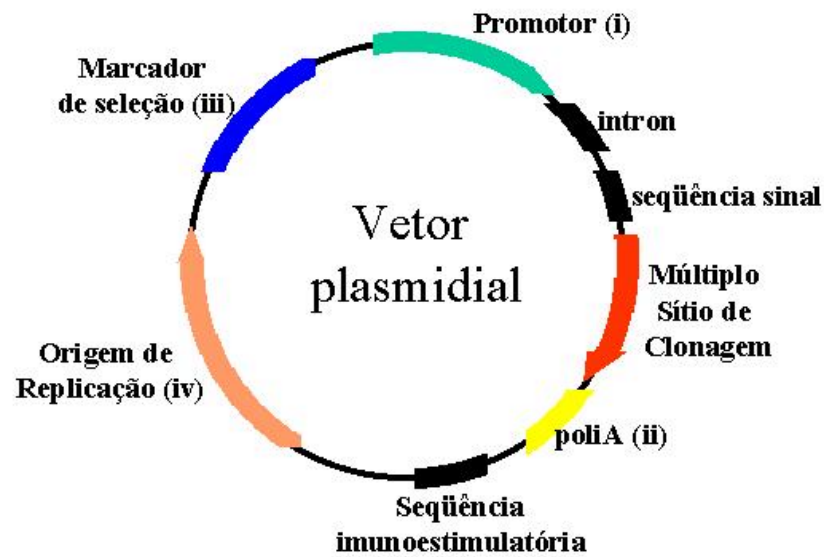


Figura 1. Representação esquemática das principais características genéticas de um vetor plasmidial utilizado na vacina de DNA. Fonte: GLENTING & WESSELS, 2005

Os plasmídios que possuem um forte promotor e que induzem a expressão em altos níveis da proteína em células eucarióticas, induzem uma melhor resposta imune (GARMONY et al., 2003). Os promotores de origem vírica como do citomegalovírus humano (hCMV) ou do vírus Simius 40 (SV40) induzem forte expressão protéica quando comparados com outros promotores (NORMAN et al., 1997, GARMONY et al., 2003), embora promotores de expressão alternativos como do vírus do sarcoma (RSV) possam ser utilizados. A expressão de um gene varia conforme o elemento regulatório. A expressão da glicoproteína D (gD) do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) sob o controle do promotor do citomegalovírus foi superior ao promotor originado do vírus do sarcoma humano. Entretanto, a característica do gene em questão pode influenciar na expressão protéica sob a regulação do mesmo promotor. A expressão da hemaglutinina do parainfluenzavírus bovino 3 e o gene OMLA do *Actinobacillus pleuropneumoniae* sob a regulação do promotor hCMV foi significativamente superior ao gene da gD do BoHV-1 (van DRUNEN LITTEL-van den HURCK et al., 1999).

Posteriormente à região do promotor de expressão há uma região de múltiplos sítios de clonagem, seguida do gene da seqüência de poliadenilação (poliA), para proporcionar estabilidade à fita do RNA mensageiro (RNAm). A origem da seqüência de poliA mais utilizada é originada do gene do hormônio de crescimento bovino (BGH) ou do SV40 (XU, et al., 2001, GARMONY et al., 2003).

Os genes bacterianos de resistência aos antibióticos como a ampicilina e a kanamicina são os marcadores de seleção mais utilizados. Entretanto, a tendência é a substituição por vetores que não utilizam genes de resistência aos antimicrobianos devido ao risco do plasmídeo transformar a microbiota do hospedeiro e disseminar a resistência aos antimicrobianos (GLENTING & WESSELS, 2005). A origem de replicação bacteriana é derivada da *Escherichia coli* ColE1 que está presente nos plasmídios de clonagem da série pUC. Esta origem de replicação proporciona um elevado número de cópias de plasmídios, a qual permite a obtenção de grande quantidade de plasmídios purificados (AZEVEDO et al., 1999, GURUNATHAN et al., 2000, GARMONY et al., 2003).

Vantagens e os potenciais problemas das vacinas de DNA

As vacinas de DNA oferecem uma série de vantagens quando comparadas às vacinas clássicas, em termos econômicos e técnicos. O custo de produção das vacinas gênicas em larga escala é consideravelmente menor ao custo de produção das vacinas compostas de fração subcelular, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (WHALEN, 1996, ROBINSON, 1997). O controle de qualidade é mais fácil, a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente e podem ser liofilizadas (WAINE & McMANUS, 1995). Estes fatores facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso, o que seria interessante para a realidade brasileira e de outros países em desenvolvimento (AZEVEDO et al., 1999, GLENTING & WESSLES, 2005).

A principal vantagem da vacina de DNA é que assim como as vacinas atenuadas ela induz a produção de anticorpos e de resposta imune celular, tanto linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) quanto T citotóxico ($CD8^+$) (van TIENHOVEN et al., 2001, NAGATA et al., 2004). Adicionalmente, as vacinas gênicas não são afetadas pelos anticorpos maternos, não apresentam risco de reversão da atenuação e podem ser produzidas contra agentes infecciosos de difícil cultivo e atenuação. A vacina pode ainda ser co-administrada para multiagentes ou multiepitopos de um determinado agente infeccioso (HAN et al., 1999, DOOLAN & HOFFMAN, 1997).

No caso de indivíduos imunocomprometidos, um grupo com alto risco de desenvolver uma doença, a vacina de DNA seria interessante, pois uma vacina comercial como, por exemplo, contra a

tuberculose (BCG) é contra-indicada (WHALEN, 1996). Em crianças e idosos, cujo sistema imunológico se apresenta imaturo ou deficiente, a avaliação da vacina de DNA não apresentou os riscos proporcionados pelas vacinas vivas atenuadas (SIEGRIST, 1997).

A tecnologia do DNA recombinante permite modificações nas seqüências gênicas, objetivando a melhoria na resposta imunológica do hospedeiro, tais como incorporações de seqüências imunoestimulatórias (ISS), seqüências de genes que codificam interleucinas e genes virais que codificam proteínas que melhoram a propagação em células (RAINCZUK et al., 2003; ZHENG et al., 2005).

Os riscos que podem ser gerados com vacinas de DNA, como a integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro, gerando mutagênese pela ativação de protooncogenes ou pela inativação de genes supressores de tumor, estão sendo avaliados. Estudos têm mostrado baixa probabilidade de ocorrer integração do plasmídeo. Três diferentes vacinas de DNA contendo genes virais foram avaliadas em camundongos, e se a integração tivesse ocorrido, a freqüência seria de oito integrações do DNA por células diplóides. Isto seria três vezes abaixo da freqüência de mutação espontânea. Contudo, ensaios de integração são necessários para todos os DNA plasmidiais que serão usados em vacinas para uso clínico. Outros riscos incluem a indução de tolerância, devido à apresentação do antígeno em longo prazo, ou reações auto-imunes devido à indução de anticorpos anti-DNA. Estes anticorpos têm aumentado de 20-30% em seres humanos, os quais não induzem qualquer doença com os títulos apresentados, ao contrário do aumento de 100-1000 vezes detectado em pacientes com doenças auto-imunes (HENKE, 2002).

Mecanismo de Ação e Indução da Resposta Imune

Inicialmente os mecanismos de processamento e apresentação de antígenos em células musculares foram questionados, uma vez que estas células não expressam antígenos associados ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), moléculas co-estimuladoras B-7 e ao antígeno-3 associado à função da integrina do leucócito, presentes em células especializadas em apresentação de antígenos (BOYLE et al., 1998; LATOUCHE & SADELAIN, 2000). As células musculares, provavelmente, liberam antígenos localmente, os quais são processados pelas células

apresentadoras de antígenos (APCs), tais como as células dendríticas e as de Langerhans (RAZ et al., 1993, WOLFF et al., 1990, MUMPER & LEDEBUR, 2001).

No mecanismo proposto (Figura 2), após a inoculação intramuscular, o DNA é incorporado às células musculares (miócitos) e/ou células APC. Os DNAs que forem endocitados pelas células no sítio de inoculação permanecem no núcleo celular sem ocorrer incorporação ao genoma da célula hospedeira. As vias metabólicas da célula hospedeira são utilizadas para os processos de transcrição do DNA inoculado e, em seguida, o RNA mensageiro é traduzido para que ocorra a síntese do antígeno protéico relacionado ao agente infeccioso. Os antígenos expressos endogenamente são processados pelas APCs e os fragmentos resultantes complexados com moléculas de classe I que são codificadas por genes do complexo de histocompatibilidade (MHC I). Em seguida, estes peptídeos são apresentados na superfície celular para o reconhecimento e ativação específica de linfócitos T CD8 citotóxicos. Alguns dos antígenos produzidos pelas células musculares são secretados para o espaço extracelular, onde podem tanto estimular linfócitos B a produzir anticorpos específicos como ser endocitados por outras células apresentadoras de antígenos. No processo de endocitose os antígenos passam do compartimento extracelular para o interior das células APC e, por este motivo, são considerados antígenos exógenos e assim processados em compartimentos celulares diferentes daqueles realizados quando o antígeno é originado dentro da célula. Os fragmentos de antígenos exógenos são complexados com moléculas da classe II e apresentados na superfície das células apresentadoras para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4 auxiliares. As vacinas de DNA são, portanto, capazes de induzir ambos os tipos de imunidade protetora, humoral e celular, com a estimulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, sem alguns dos possíveis riscos associados às vacinas com organismos vivos (HENKE, 2002).

Após o processamento e apresentação de antígenos pelas APCs são produzidas citocinas, como a IL-12, que estimula a diferenciação das células T virgens em Th1 efectoras (SIN et al., 1999). Por sua vez, as células Th1 produzem citocinas como o IFN- γ que pode atuar na célula alvo que carrega o transgene (OLIVEIRA et al., 1998; NAGATA et al., 2004) e melhorar a expressão de moléculas de MHC classe II pelos macrófagos, facilitando a apresentação do antígeno e a ativação da célula T.

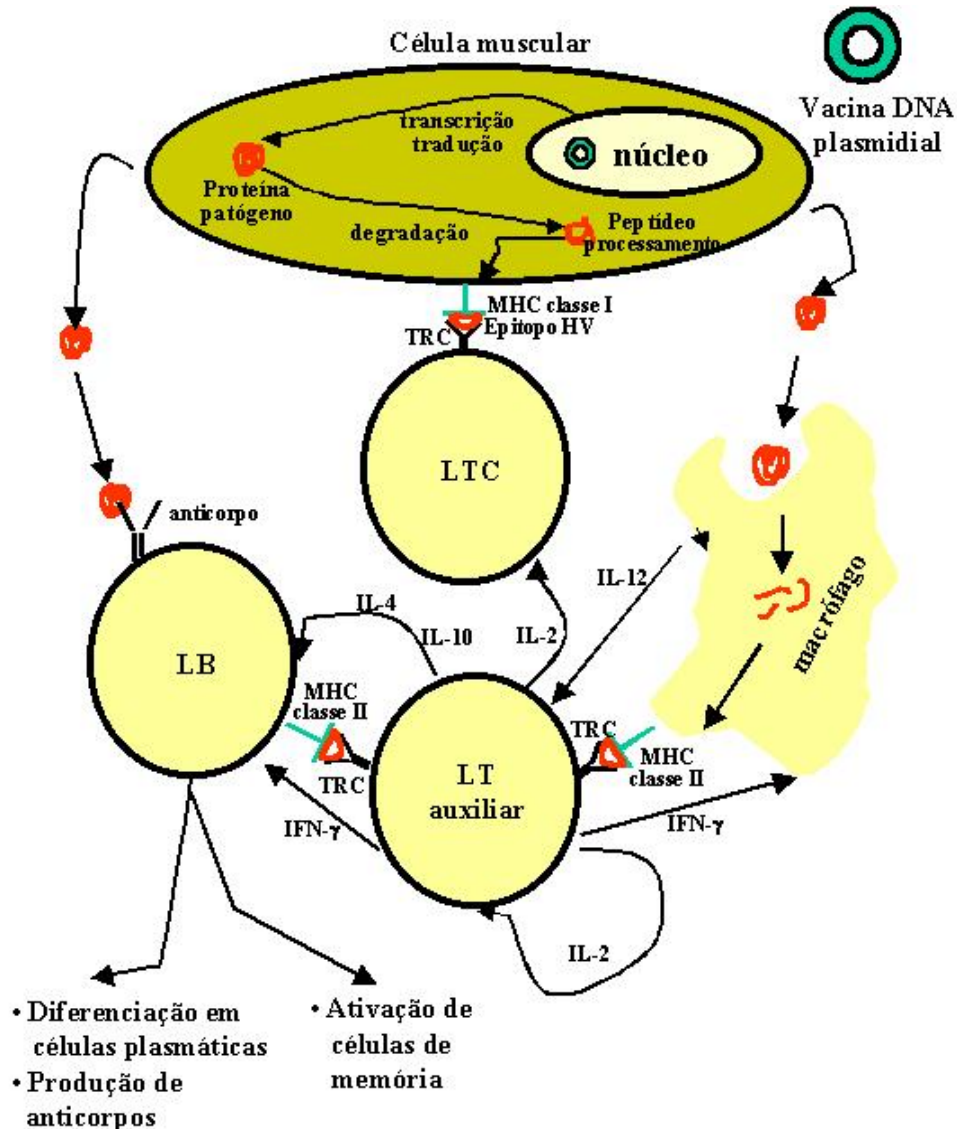


Figura 2. Hipótese mais aceita do mecanismo de ação da vacina de DNA utilizando DNA plasmidial. Após a imunização com vacina de DNA o antígeno pode ser apresentado às células T pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) ou células somáticas (células musculares) transfectadas com o DNA plasmidial expressando antígenos. Estas células, particularmente as células somáticas, podem liberar antígeno para outra APC, pela secreção ou por apoptose das células transfectadas. Estas APCs podem então, apresentar antígeno para células T CD4+ e CD8+. Fonte: adaptado <http://www.brookscope.com>

No plasmídeo contendo o transgene, pode-se clonar os genes que codificam os componentes estimuladores da resposta imune (IL-2, IL-12 e IFN- γ) ou mesmo co-administrar os plasmídios recombinantes que codificam estas citocinas. Isto auxilia no processo de reconhecimento antigênico entre as APCs e os linfócitos (RAZ et al., 1993; XIANG et al., 1997).

A imunidade adquirida pela vacina de DNA persiste por longo período de tempo devido à constante produção endógena do antígeno pela célula hospedeira e à capacidade destes antígenos estimularem linfócitos de memória imunológica (SNADEEP et al., 1996).

A imunidade humoral é responsável por uma significativa resposta preventiva nas infecções e a IgG2a tem sido o isotipo predominantemente induzido pelas vacinas de DNA plasmidial (VERCAMMEN et al., 2000; OÑATE et al., 2003). O IFN- γ produzido pelo linfócito Th1 é uma importante citocina moduladora de células B para a secreção de IgG2a antígeno específico. Em muitas infecções por microrganismos intracelulares em camundongos a resposta humoral é caracterizada pelo domínio dessa imunoglobulina (COUTELIER et al., 1991, NAGATA et al., 2004). Por outro lado, a produção de imunoglobulinas IgG1 e IgE específicas, dependem, em parte, da presença da interleucina 4 (IL-4) produzida pela subpopulação de linfócitos T auxiliares (Th2) (SNAPPER et al., 1988).

Fatores como dose de antígeno, tipo de patógeno, a espécie animal, via de infecção ou imunização, formulação da vacina, e a forma do antígeno (solúvel ou associado) influenciam no desenvolvimento do tipo de resposta imune (FYAN et al. 1993, MOREL et al. 2004, JIN et al., 2004, NAGATA et al., 2004).

Adjuvantes para vacina de DNA e seu papel na imunidade inata

Nas vacinas de subunidade, tais como as vacinas constituídas por proteínas recombinantes, freqüentemente há necessidade da utilização de adjuvantes para aumentar a imunogenicidade do antígeno (ULMER et al., 2006). Os adjuvantes, em sua maioria, são moléculas derivadas de patógenos como o lipídeo monofosforil; derivados de saponina QS21; adjuvantes químicos como o levamisol e a bupivacaína; e seqüências CpG que ativam células do sistema imune inato. Uma vez ativada essas células modulam e direcionam para a resposta imune adquirida ou adaptativa (SINGH & O'HAGAN, 2002; LIMA et al., 2004, JIN et al., 2004).

As seqüências CpG imunoestimulatórias são originadas de DNA bacteriano, não metiladas com dinucleotídeos CpG flanqueados por purinas e pirimidinas, diferentemente do DNA de vertebrados. Estas seqüências podem estar presentes em plasmídios bacterianos ou ser associadas ao plasmídio recombinante para aumentar a efetividade da vacina. O sistema imune de vertebrados detecta

a presença do DNA CpG estranho pela ligação com o receptor *Toll-like* (TLRs) das células APCs e liberação de citocinas, os quais estimulam a resposta imune adquirida (SINGH & O'HAGAN, 2002). O efeito adjuvante das seqüências CpG é influenciado pela presença do antígeno e liberação do DNA (SINGH et al., 2000; COBAN et al., 2005). Existem controvérsias sobre o efeito adjuvante das seqüências CpG porque nem sempre a incorporação em plasmídeo demonstrou melhora na resposta imune. Entretanto, há resultados que demonstram o aumento da imunogenicidade da vacina (ULMER et al., 2006).

Seqüências que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulantes podem ser incorporadas ou co-administradas aos plasmídios recombinantes para modular a resposta imune (ULMER et al., 2006). As citocinas avaliadas como adjuvantes incluem IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e o fator estimulante de macrófago granulocítico (GM-CSF) (PASQUINI et al., 1997). Contudo, todas estas moléculas exibem toxicidade relacionada à dose. Genes que codificam citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IFN- γ foram testados para avaliar a habilidade de ampliação da resposta imune em camundongos (DUFOUR, 2001). A incorporação do gene do GM-CSF de suíno na vacina de DNA contra a Doença de Aujeszky (DA) demonstrou aumento da proteção clínica de suínos, proporcionada pelo aumento da atividade de célula T (SOMASUNDARAM et al., 1999). A adição do gene que codifica o IFN- γ à vacina de DNA contra vírus da imunodeficiência felina (FIV) também aumentou a proteção clínica revelando um decréscimo da carga viral após a infecção (HOSIE et al., 1999). Entretanto, a incorporação do gene do IFN- γ suíno reduziu a proteção clínica contra a DA (SOMASUNDARAM et al., 1999).

Outra citocina particularmente interessante, a IL-15, semelhante a IL-2, tem importante participação na proliferação das células T de memória CD8⁺ (KUTZLER et al., 2005). Porém, o DNA plasmidial que codifica a IL-15 tem o seu uso limitado devido sua regulação complexa, que resulta na baixa expressão da citocina *in situ*. Contudo, em recente estudo, uma forma do plasmídeo IL-15 aumentou a proliferação, longevidade e função efetora das células T CD8⁺, quando medida pelo aumento da imunogenicidade e eficácia protetora da vacina de DNA para influenza e HIV em camundongos (KUTZLER et al., 2005).

Genes de receptores estimulatórios (NKG2D) encontrado nas células *natural killer* (NK) e nas células T citotóxica também podem ser incorporados ao DNA plasmidial. Esta incorporação demonstrou aumento da eficácia das vacinas de DNA contra o câncer em camundongos (ZHOU et al., 2005).

Vias de administração da vacina de DNA

A administração da vacina de DNA utilizando a inoculação direta do plasmídeo pelas vias intratraqueal, intravenosa, intrabursal, intraorbital, intradérmica, intramuscular, oral, subcutânea e via mucosa demonstraram sucesso na indução da resposta imune em todas as vias testadas (FYNNAN et al., 1993; ULMER et al., 1997; UCHIJIMA et al., 1998; REN et al., 2002; YOSHIDA et al., 2000; CONG et al., 2005, LI, et al., 2006). Entretanto, algumas vias proporcionaram maior ou menor nível de expressão de antígenos influenciando diretamente na imunogenicidade da vacina.

Os níveis de expressão dos antígenos obtidos pelas diferentes vias de administração parecem estar relacionados com a quantidade de células transfectadas obtidas após administração dos plasmídios. A via intramuscular (i.m.) e a intradérmica (i.d.) liberam o DNA plasmidial no meio extracelular, localização pela qual, a maioria do DNA é rapidamente degradada pelas nucleases (LEVY et al., 1996). Diferentemente, o sistema *gene gun* libera o DNA dentro das células amenizando a perda inicial do DNA. Nos trabalhos iniciais avaliando as vias de administração da vacina foi necessária uma concentração de DNA pela via intramuscular 100 vezes maior que o sistema *gene gun* para proporcionar uma resposta imune equivalente (ROBINSON, 1997).

O sistema *gene gun* utilizado para vacinas de DNA foi avaliado em bovinos, eqüinos, suínos, caninos e em aves (FYNNAN et al., 1993; MACKLIN et al., 1998; VANROMPAY et al., 1999). Em galinhas, o *gene gun* foi o sistema mais eficiente para a liberação da vacina de DNA para influenza (FYNNAN et al., 1993). Em perus, a combinação das vias i.m. e intranasal induziu equivalente proteção contra a *Clamydia psittaci* comparada à liberação obtida pelo *gene gun* (VANROMPAY et al., 1999). Por outro lado, em suínos as imunizações pela via i.m. da vacina de DNA contra peste suína clássica induziram mais altos títulos de anticorpos do que pelo sistema *gene gun* (ANDREW et al., 2000).

Assim, a eficácia da vacina de DNA varia com vários fatores que podem influenciar nestas vias de administração, como vetor, adsorção às partículas, a espécie animal e o patógeno.

O tipo de vetor utilizado nas imunizações com DNA na geração da resposta imune protetora adquirida foi relatado. A imunização de camundongos com os vetores VR1020 (expressa proteína secretória) e o vetor que expressa a proteína quimotática associada ao monócito 3 (MCP-3), administradas pela via i.d., induziram altos títulos de anticorpos. Contudo apenas o vetor MCP-3 apresentou resposta imune protetora pela imunização com DNA plasmidial. A proteção utilizando o vetor VR1020 foi observada apenas após o reforço da dose com proteínas recombinantes (RAINCZUK et al., 2003).

A localização celular da proteína, influenciada pela via, é importante no tipo de resposta imune gerada (LEWIS et al., 1999, MOREL et al., 2004). Geralmente, a imunização pela via i.m. induz preferencialmente a resposta Th1, enquanto que o sistema *gene gun* administrado na derme, estimula a resposta Th2 ou uma resposta balanceada Th1/Th2, caracterizando a resposta imune humoral (NAFTZGER et al., 1996; WEBER et al., 1998). Entretanto, a imunização de camundongos por sistema *gene gun* com plasmídios que codificam proteínas (ovoalbumina) citoplasmáticas e transmembrana induziram forte resposta imune Th1 e CD8⁺ (MOREL et al., 2004). O predomínio da resposta Th1, determinada pelos títulos de IgG2a (razão de IgG2a/IgG1 =3), também foi demonstrado em camundongos imunizados com o plasmídio contendo o gene da proteína do envelope do vírus da encefalite japonesa. Por outro lado, quando os plasmídios foram administrados revestidos com micropartículas catiônicas foram observadas tanto a resposta Th1 quanto Th2 e os títulos de anticorpos IgG2a e IgG1 foram similares (razão of IgG2a/IgG1 =1.13) (KAUR et al., 2004).

Recentes avanços para aumentar a imunogenicidade da vacina de DNA

A vacina de DNA tem apresentado baixa imunogenicidade em primatas, entretanto duas vacinas foram recentemente licenciadas para animais, uma contra o vírus da febre do Nilo do Ocidente em eqüinos e a outra contra vírus da necrose hematopoiética infecciosa em salmão (ULMER et al.,

2006). Provavelmente, a falha da vacina de DNA em induzir forte resposta imune em seres humanos é a baixa produção de antígenos, a liberação celular do DNA plasmidial e a estimulação ineficiente do sistema imune inato ineficiente. Os esforços para aumentar estes aspectos da vacina de DNA aumentaram sua eficácia em animais (ULMER et al., 2006).

Alterações nos vetores têm sido realizadas para melhorar a potência da vacina como alteração no vetor para aumentar a eficiência do promotor; utilização de seqüência líder alternativa e substituição de códons de mamíferos pelos usados por patógenos. Esta última alteração, a construção de vetores com otimização de códons, é para evitar as limitações do conteúdo celular de tRNA com códons virais e bacterianos, uma vez que os requerimentos para a tradução do mRNA do patógeno são diferentes dos das células de mamíferos. A otimização do códon resultou no aumento da expressão do antígeno gp120 do HIV, contribuindo para uma melhor disponibilidade de tRNA e maior estabilidade do mRNA específico (WANG et al., 2005).

A captação do DNA plasmidial pelas células após a injeção é ineficiente. Somente uma pequena proporção do material injetado é internalizada pelas células que resulta em sucesso na transfecção, isto é, produção de antígeno pelas células do animal vacinado. Entretanto, duas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a potência da vacina: i) liberação física para alcançar altos níveis de antígenos e ii) formulação com micropartículas para células alvo apresentadoras de antígenos (APCs) (ULMER et al., 2006).

Uma efetiva tecnologia de liberação física do plasmídeo usa a eletroporação (EP) *in situ* para a liberação do vetor diretamente dentro das células. Esta tecnologia foi adaptada para uso em animais vivos, pelo qual um campo elétrico é criado nos tecidos perto do sítio de inoculação da vacina. A EP aumenta substancialmente a produção de antígenos e a resposta da célula T em primatas não-humanos, produzindo altos níveis de célula T CD8⁺ como 5% do total de célula T (OTTEN et al., 2006). Este nível de imunogenicidade em primatas é usualmente obtido somente pelo uso de vetores virais vivos, como adenovírus recombinante (ULMER et al., 2006). Outra recente tecnologia de liberação física do plasmídeo usa *tattooing* com o objetivo de administrar o DNA nas células da pele (BINS et al., 2005). Esta técnica, a qual é similar à vacinação efetiva com a varíola, parece diminuir o tempo requerido para

a indução de resposta imune potente e protetora. Isto deve estar relacionado com a rápida produção do antígeno após a vacinação.

Uma segunda estratégia para liberação da vacina de DNA envolve a tecnologia baseada em micropartículas para as APCs alvo. A eficácia das vacinas de DNA aumenta se o material genético for revestido por microesferas biodegradáveis que o protegem e liberam de forma gradual nas células do organismo vacinado. Partículas de 1-3 μm de diâmetro são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos e células dendríticas (DCs). Duas distintas formulações, baseadas em polímeros (ácido láctico e ácido glicólico PLG) e lipídio catiônico foram relatadas recentemente. Estas formulações mostraram-se efetivas para a liberação da vacina de DNA para o HIV em modelos primatas (OTTEN et al., 2005) e antrax em coelhos (HERMANSON et al., 2004). Em ambos os casos, a interação de moléculas de DNA plasmidial carregadas negativamente com a formulação carregada positivamente é crucial para liberação do DNA dentro das APCs, resultando no aumento da apresentação do antígeno para o sistema imune. Os polímeros PLG são biocompatíveis com as membranas celulares, pois são produzidos pelo organismo humano e as microesferas não são tóxicas e liberam o material genético de forma gradual, o que garante a produção contínua de antígenos e anticorpos. A quantidade de cada substância nas microesferas determina o ritmo da liberação do DNA. (RODRIGUES JR et al., 2004).

Uma das razões pela quais as vacinas de DNA são menos potentes que as vacinas vivas atenuadas é que o DNA não se distribui de maneira uniforme entre as células inicialmente transfectadas, enquanto o número das células infectadas pelo microrganismo atenuado aumenta quando este se replica. Esforços têm sido realizados para aumentar o trânsito intracelular do antígeno, explorando a capacidade de espalhamento célula-célula da proteína VP22 do herpesvírus humano tipo 1 ou do BoHV-1. Vários grupos têm demonstrado que construções de DNA, que codificam proteínas de fusão da VP22 ligada a antígenos, aumentam a resposta imune em camundongos (KIM et al., 2004; PERKINS et al., 2005) e bovinos (ZHENG et al., 2005). Contudo, há controvérsia nesses resultados. Alguns grupos mostraram que proteínas fusionadas com VP22 aumentam o espalhamento intracelular quando avaliado *in vitro* (MWANGI et al., 2005), ou pelo número de células dendríticas transfectadas em nódulos linfáticos (KIM et al., 2004). A incorporação do gene da VP22 proteína de fusão do BoHV-1 demonstrou aumento da aquisição do DNA plasmidial pelas células dendríticas e macrófagos,

o qual, melhorou a resposta celular de linfócitos T auxiliar ($CD4^+$) com quantidades menores de DNA plasmidial (MWANGI et al., 2005). Contudo, um estudo não constatou a diferença na distribuição das proteínas de fusão-VP22 e que o antígeno isoladamente, obtido da transfecção do respectivo plasmídeo dentro das células de mamíferos, aumentou a resposta imune *in vivo* (PERKINS et al., 2005). Mais estudos são necessários para elucidar o modo de ação desta estratégia.

Vacina de DNA na medicina humana e veterinária

Vacinas de DNA mostraram serem efetivas para várias doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e também para tumores. Conseqüentemente, esse tipo de vacina contribui para o controle de doenças infecciosas, parasitárias e na terapia oncogênica em medicina humana e veterinária.

As vacinas de DNA que codificam antígenos virais têm sido as mais investigadas e aquelas específicas para o HIV foram as primeiras vacinas contra doenças infecciosas a serem avaliadas em seres humanos (MacGREGOR et al., 1998). O HIV possui uma glicoproteína do envelope altamente variável e a maioria dos anticorpos gerados são muito específicos para essa proteína. Em contraste, a resposta celular pode ser direcionada contra epítomos que são derivados de várias proteínas, incluindo aquelas altamente conservadas entre diferentes estirpes virais. As atuais pesquisas têm focado o uso do DNA na primo-vacinação, seguida de um reforço heterólogo utilizando um vetor viral, pois a primo-vacinação com DNA demonstrou ser mais potente em primatas não-humanos (ULMER et al., 2006).

A vacina de DNA contra o HIV induziu resposta imune mediada por células (CMI) em camundongos, mas estimulou fraca produção de $IFN-\gamma$ pelas células T em primata não-humano e também em seres humanos. A análise de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com uma única dose de vacina de DNA demonstrou duas populações de linfócitos T, o $CD4^+$ e $CD8^+$, que foram específicos para os antígenos do HIV. Os linfócitos $CD8^+$ produtores e não-produtores de $IFN-\gamma$ foram detectados nos estágios inicial e intermediário após a imunização (ARRODE et al., 2007).

Vacinas de DNA para a hepatite B foram analisadas em suínos e primatas não-humano. Três doses da vacina induziram títulos de anticorpos protetores nos animais e a resposta em suínos foi comparável aos títulos induzidos com três doses da vacina comercial com proteínas recombinantes

(FULLER et al., 2006). Em humanos, esta vacina constituída do antígeno sAg induziu resposta celular CD8⁺ e CD4⁺ significativa em 100% dos indivíduos (ROY et al. 2000).

Vacinas de DNA para os vírus da influenza (MACKLIN et al., 1998) e do sarampo também foram analisadas em suínos e macacos por *gene gun*, mas induziram produção de anticorpos duas a dez vezes menor do que as respectivas vacinas virais com vírus inativado. Contudo, estas vacinas de DNA ainda mostraram proteção significativa contra a infecção, demonstrando que, embora a vacina de DNA induza imunogenicidade mais baixa, quando comparado com as vacinas existentes, os níveis são ainda suficientes para proporcionar proteção (FULLER et al., 2006).

A vacina de DNA para a raiva administrada em macacos por *gene gun*, similarmente à vacina para o vírus da influenza, induziu comparável produção de anticorpos e proteção contra infecção letal com vírus da raiva, como na vacina produzida em células diplóides (LODMELL et al., 1998).

Entre as vacinas de DNA para infecções bacterianas, a vacina para o controle da tuberculose humana e bovina foi uma das primeiras vacinas estudadas. O antígeno MPB83 do *Mycobacterium bovis* demonstrou boa proteção em camundongos imunizados quando desafiados com cepas virulentas e estimulou resposta mista de IgG1 e IgG2a. Posteriormente, a imunogenicidade da vacina foi avaliada em bovinos que apresentaram alta taxa de resposta proliferativa ao antígeno MPB83 (CHAMBERS et al., 2000). A utilização do gene da proteína hsp65 do *M. tuberculosis* foi avaliada na imunização genética de camundongos BALB/c pela via intramuscular nas formas “nua” (*naked*) e sistema *gene gun*. A administração do plasmídeo pelo sistema *gene gun* induziu resposta imune com doses 100 vezes menor do que as requeridas pela imunização i.m. Contudo, a imunização i.m. protegeu os camundongos e a imunização pelo sistema *gene gun* induziu a resposta Th2 com altos títulos de IL-4 e IL-10, mas não protegeu os camundongos contra o desafio com cepas virulentas (LIMA et al., 2001).

A associação do gene da hsp65 de *M. tuberculosis* à expressão da IL-12 induzida pelo vírus hemaglutinante do Japão (HVJ) incorporada ao lipossoma (HSP65+IL-12/HVJ) demonstrou melhor eficácia na proteção de camundongos e de cobaias quando comparados com a vacina BCG. Em macacos *Cynomolgus*, esta formulação apresentou eficácia na proteção relacionada à mortalidade, peso corporal, achados radiográficos e imunogenicidade. A combinação da vacina HSP65+IL-12/HVJ e BCG demonstrou efeito sinérgico nos macacos infectados com tuberculose, determinando 100% de

sobrevivência. Estes dados indicam um novo modelo de vacina de DNA contra o *M. tuberculosis* que pode ser utilizado para os ensaios clínicos fase inicial em humanos (OKADA et al., 2007).

A administração inicial do DNA plasmidial contendo o gene da proteína 58 (Ag85B) do *M. tuberculosis* demonstrou proteção contra a infecção pelo *M. tuberculosis* e associou-se a participação de linfócitos CD4⁺ específicos ao Ag58B na produção de IFN- γ e de controle do crescimento intramacrofágico do *M. tuberculosis*. Surpreendentemente, essa proteção foi eliminada após o reforço vacinal com a proteína recombinante (rAg58B). Segundo os autores, a perda da proteção foi relacionada com a excessiva proliferação de linfócitos CD4⁺ e à produção de IFN- γ em resposta à proteína Ag58B. Estudos realizados no Brasil, utilizando a proteína P58 do *Mycobacterium* na construção de uma vacina de DNA, identificaram uma atividade anti-cancerígena importante deste gene em pacientes com melanoma, um dos mais graves tumores de pele. Após o tratamento houve a remissão do tumor em dois pacientes com diagnóstico de melanoma (RODRIGUES JR et al., 2004).

Para o controle da brucelose, uma vacina de DNA contendo o gene da enzima superóxido dismutase (SOD) de *Brucella abortus* foi construída com o objetivo de diminuir os riscos de contaminação dos manipuladores com a utilização da vacina viva atenuada (cepas B19 e RB51) (VELIKOVSKY et al., 2002). Camundongos BALB/c receberam três doses por via i.m. e apresentaram altos títulos de anticorpos com predomínio da IgG2a e proliferação de linfócitos com produção de IFN- γ . O grau de proteção dos camundongos desafiados com 10⁴ UFC da cepa *B. abortus* 2308, após cinco semanas da última imunização, foi similar aos animais vacinados com a cepa vacinal RB51 (OÑATE et al., 2003). Posteriormente, camundongos foram imunizados com esta mesma construção pela via intraesplênica para induzir resposta celular. Até o final do experimento não foram detectados anticorpos específicos para a SOD. Na estimulação de esplenócitos, foi detectada secreção de IFN- γ , mas não de IL-4 e apenas a população de CD8⁺ apresentou atividade citotóxica. Após quatro semanas da imunização, camundongos foram desafiados intraperitonealmente com cepas virulentas de *B. abortus*, mostrando proteção superior à via i.m. (MUÑOZ-MONTESINE et al., 2004).

Para o *Staphylococcus aureus* a vacina de DNA contendo um gene importante da adesina da bactéria (ClfA) induziu a produção de anticorpos específicos e resposta celular em vacas em lactação.

A inclusão de adjuvantes com os plasmídios diminuiu a variabilidade da resposta entre os animais e a resposta de anticorpos foi altamente direcionada para IgG2 no soro e leite, ocorrendo uma fraca resposta de IgG1 específica para ClfA sem adjuvante. A estratégia de se utilizar um reforço com proteínas induziu anticorpos que aumentaram a fagocitose e diminuíram a adesão da bactéria. Os resultados sugerem que a injeção intramuscular do plasmídio codificando ClfA de *S. aureus* gera resposta Th1 em vacas leiteiras e a estratégia de vacinação combinando adjuvantes moleculares e reforço com adesinas será um importante componente da vacina contra a mastite bovina ocasionada pelo *S. aureus* (NOUR EL-DIN, et al., 2006).

A vacina de DNA contra a leptospirose que codifica uma proteína associada à hemólise (Hap1) foi avaliada em gerbil. Após três semanas da imunização os animais foram protegidos contra o desafio com a *Leptospira interrogans* patogênica (BRANGER et al., 2005).

Genes que codificam proteínas do *Plasmodium falciparum*, agente da malária, foram relatados como seguros e imunogênicos para seres humanos (WANG et al., 1998; EPSTEIN et al., 2004; WANG et al., 2005). Estudos com diferentes proteínas do *Plasmodium* spp estão sendo desenvolvidos na tentativa de caracterizar e eleger os antígenos mais imunogênicos e protetores para a doença. Tentativas de utilização de diversos genes para mimetizar os antígenos do protozoário mostraram que alguns genes interferem negativamente, inibindo a expressão de um outro antígeno (SEDEGAH et al., 2004).

A imunização de camundongos com os plasmídios contendo os genes que codificam as proteínas GRA1, GRA7 e ROP2 de *Toxoplasma gondii* induziu imunidade protetora parcial contra desafios letais. Na linhagem de camundongos C3H a razão Ig2a/IgG1 foi maior quando comparada às linhagens BALB/c e C57BL/6 de camundongos. Coincidentemente, a porcentagem de proteção contra desafios letais com cistos de *T. gondii* foi maior em camundongos da linhagem C3H (VERCAMMEN et al., 2000).

Para *Taenia solium* a imunização com DNA plasmidial contendo o gene do antígeno B de *Cisticercus cellulosae* conferiu 92,6% de proteção quando os suínos foram desafiados com ovos de *Taenia solium*. Quatro de cinco animais imunizados com 1000 µg de plasmídio recombinante e

desafiados não apresentaram cistos viáveis de cisticercose. Entretanto, a imunização com 200 µg de plasmídeo recombinante não foi capaz de impedir a formação de cistos viáveis (GUO et al., 2007).

Vacina de DNA contra a anaplasnose bovina tem sido investigada com diferentes proteínas de superfície (MSPs). O gene (*msp1α*) que codifica MSP1a do *Anaplasma marginale* foi inserido no plasmídeo pVCL, vetor de células de mamíferos. A soroconversão, após a inoculação de camundongos e de bovinos com o DNA plasmidial contendo o gene *msp1α*, foi demonstrada após 21 dias e seis a oito semanas, respectivamente. Em bovinos a produção de imunoglobulina foi restrita ao isotipo IgG1, embora a estimulação de linfócito T auxiliar também foi verificada com a produção de IFN-γ (ARULKANTHAN et al., 1999). A imunização de bovinos utilizando apenas o gene que codifica a MSP1b em plasmídeo de expressão para células de mamíferos (pcDNA3.1./*msp1β*), não estimulou satisfatoriamente a produção de anticorpos no período de vacinação, mostrando a necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de uma vacina de DNA para o controle da anaplasnose (ANDRADE et al., 2004). Uma vacina para anaplasnose incorporando a proteína VP22 do BoHV-1 demonstrou a habilidade desta proteína melhorar a expressão da MSP1a de *Anaplasma marginale* pelas células dendríticas e macrófagos, o que sugere uma melhora na propagação da vacina de DNA para as células T CD4⁺ (MWANGI et al., 2005).

Segurança biológica

As pesquisas têm focado na construção funcional das vacinas de DNA, portanto, a ênfase na segurança tem sido limitada. Os elementos genéticos e as características do hospedeiro relacionado à biossegurança das vacinas de DNA foram discutidos por GLENTING & WESSELS (2005). A tendência da construção das vacinas é a utilização de vetores isentos de genes virais, substituição de genes de resistência aos antimicrobianos por genes sintéticos e mutações para seleção de clones.

Os procedimentos associados à construção da vacina, a avaliação pré-clínica e os ensaios clínicos para estas vacinas são similares aos outros produtos biológicos. Em função do limitado conhecimento científico sobre a segurança biológica das vacinas de DNA, os estudos pré-clínicos devem ser enfatizados para a avaliação da segurança destas vacinas antes do uso comercial.

Considerações finais

A vacinação com DNA é uma tecnologia promissora na prevenção e controle de doenças em medicina humana e veterinária. Fatores como o tipo de vetor (promotor) e da localização do plasmídeo, dose e tipo do antígeno, via de administração, formulação da vacina, presença ou ausência de seqüências imunoestimulatórias, presença de plasmídeo adicional ou na forma de vacina de DNA multivalente, influenciam no desenvolvimento do tipo de resposta imune. Estes fatores podem ser otimizados para melhorar a resposta imune no modelo de espécie animal para cada doença.

Referência Bibliográfica

ANDRADE, G.M., R.Z. MACHADO, R.Z., VIDOTTO, M.C., VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1026, p.257-266, 2004.

ANDREW, M.C., MORRISSY, C.J., LENGHAUS, C., OKE, P.G., SPROAT, K.W., HODGSON, A.L.M., JOHNSON, M.A., COUPER, B.E.H. Protection of pigs against classical swine fever with DNA delivered gp55. *Vaccine*, v.18, p.1932-1938, 2000.

ARRODE, G., HEDGE, R., MANI, A., JUN, Y., CHEBLOUNE, Y., NARAYAN, O. Phenotypic and functional analysis of immune CD8+ T cell responses induced by a single injection of a HIV DNA vaccine in mice. *The Journal Immunology*, v.178, n.4, p.2318-2327, 2007.

ARULKANTHAN, A., BROWN, W.C., MCGUIRE, T.C., KNOWLES, D.P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v.67, n.7, p.3481-3487, 1999.

AZEVEDO, V., LEVITUS, G., MIYOSHI, A., CÂNDIDO, A.L., GÓES, A.M., OLIVEIRA, S.C. Main features of DNA-based immunization vectors. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, v.32, n.2, p.147-153, 1999.

BINS, A.D., JORRITSMA, A., WOLKERS, M.C., HUNG, C.F., WU, T.C., SCHUMACHER, T.N., HAANEN, J.B. rapid and potent DNA vaccination strategy defined by in vivo monitoring of antigen expression. *Nature Medicine*, v.11, n.8, p.899-904, 2005.

BLOOM, B.R. New approaches to vaccine development. *Reviews of infectious diseases*, v.11, p.460-466, 1989.

BOYLE, J.S., BRADY, J.L., LEW, A.M. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*, v.392, n., p.408-411, 1998.

BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J.M.; ANDRE-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* Sensus Lato Challenge by DNA

Immunization with the Gene Encoding Haemolysin-Associated Protein 1. *Infection and Immunity*, v.73, n.7, p.4062-4069, 2005.

BRIANE, D., LESAGE, D., CAO, A., COUDERT, R., LIEVRE, N., SALZMANN, J.L., TAILLANDIER, E. Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.50, n.7, 983-991, 2002.

CHAMBERS, M. A., VORDERMEIER, H.M., WHELAN, A., COMMANDER, N., TASCAN, R., LOWRIE, D., HEWINSON, R. G. Vaccination of Mice and Cattle with Plasmid DNA Encoding the *Mycobacterium bovis* Antigen MPB83. *Clinical Infectious Diseases*, v.30, p.S283–S287, 2000.

COBAN, C., ISHII, K.J., GURSEL, M., KLINMAN, D.M., KUMAR, N. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors. *Journal of Leukocyte Biology*, v.78, n.5, p. 647-655, 2005.

CONG, H., GU, Q.M., ZHOU, H.Y., GUO, L., YANG, T.L., HE, S.Y., LI, Y., ZHAO, Q.L. Oral mixed DNA vaccine protects mice from infection of *Toxoplasma gondii*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, v.23, n.3, p.159-162, 2005.

COUTELIER, J.P., VANDER, LOGT, J.T.M., HEENSSEN, F.W.A. IgG subclass distribution of primary and secondary immune responses concomitant with viral infection. *Journal of Immunology*, v.147, n., p.1383-1386, 1991.

DAVIS, H.L., MCCLUSKIE, M.J. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infection*, v.1, n., p.7-21, 1999.

DOOLAN, D.L., HOFFMAN, S.L. Multi-gene Vaccination against Malaria: A Multistage, Multi-immune Response Approach. *Parasitology Today*, v.13, n.5, p.171-178, 1997.

DUFOUR, V. DNA vaccines: new applications for veterinary medicine. *Veterinary Sciences Tomorrow*, v.2, n.1, p.1-25, 2001.

EPSTEIN, J.E., CHAROENVIT, Y., KERSTERB, K.E., WANG, R., NEWCOMER, FITZPATRICK, S., RICHIE, T.L., TORNIEPORTH, N., HEPPNER, D.G., OCKENHOUSE, C., MAJAM, V., HOLLAND, C., ABOT, E., GANESHAN, H., BERZINS, M., JONES, T., FREYDBERG, C.N., NG,

J., NORMAN, J., CARUCCI, D.J., COHEN, J., HOFFMAN, S.L. Safety, tolerability, and antibody responses in humans after sequential immunization with PfCSP DNA vaccine followed by the recombinant protein vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine*, v.22, p.1592-1603, 2004.

FYAN, F.F., WEBSTER, R.G., FULLER, D.H., HAYNES, J.R., SANTORO, J.C., ROBINSON, H.L. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, n.42, p.11478-11482, 1993.

FULLER, D.H., LOUDON, P., SCHMALJOHN, C. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infection diseases. *Methods*, v. 40, p. 86-97, 2006.

GARMONY, H.S., BROWN, K.A., TITBALL, R.W. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy*, v.1, n.2, p. , 2003.

GLENTING, J., WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, v.4, n.26, p.1-5, 2005.

GUO, A., JIN, Z., ZHENG, Y., HAI, G., YUAN, G., LI, H., CAI, X. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine*, v. 25: 170-175, 2007.

GURUNATHAN, S., KLINMAN, D.M., SEDER, R.A. DNA vaccines: Immunology, applications, and optimization. *Annual Review of Immunology*, v.18, n., p.927-974, 2000.

HAN, R., CLADEL, N.M., REED, C.A., PENG, X., CHRISTENSEN, N.D. Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. *Journal of Virology*, v.73, n.8, p.7039–7043, 1999.

HENKE, A. DNA immunization – a new chance in vaccine research? *Medical microbiology and immunology*, v.191, p.187-190, 2002.

HERMANSON, G. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers antibody-mediated protective against aerosolized anthrax spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, n.37, p.13601-13606, 2004.

- JIN, H., LI, Y., MA, Z., ZHANG, F., XIE, Q., GUD, D., WANG, BIN. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine*, v.22, p.2925–2935, 2004.
- KALINNA, B.H. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunology and Cell Biology*, v.75, p.370-375, 1997.
- KAUR R, RAUTHAN M, VRATI S. Immunogenicity in mice of a cationic microparticle-absorbed plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein. *Vaccine*, v.22, p.2776-2782, 2004.
- KIM, T.W., HUNG, C.F., ZHENG, M., BOYD, D.A., HE, L., PAI, S.I., WU, T.C. A DNA vaccine co-expressing antigen and an anti-apoptotic molecule further enhances the antigen specific CD8⁺ T cell immune response. *Journal of Biomedical Science*, v.11, p.493-499, 2004
- KOWALCZYK, D.W., ERTL, H.C. Immune response to DNA vaccine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 55, p.751-701, 1999.
- KUTZLER, M.A., ROBINSON, T.M., CHATTERGOON, M.A., CHOO, D.K., CHOO, A.Y., CHOE, P.Y., RAMANATHAN, M.P., PARKINSON, R., KUDCHODKAR, S., TAMURA, Y., SIDHU, M., ROOPCHAND, V., JOSEPH KIM, J., PAVLAKIS, G.N., FELBER, B.K., WALDMANN, T., BOYER, J.D., WEINER, D.B. Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *The Journal of Immunology*, v.175, p. 112-123, 2005.
- LATOUCHE, J.B., SADELAIN, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nature Biotechnology*, v.18, n.4, p.405-40, 2000.
- LEVY, M.Y., BARRON, L.G., MEYER, K.B., SZOKA, F.C. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into the blood. *Gene Therapy*, v.3, p.201-211, 1996.
- LEWIS, P.J., DRUNEN LITTLE-van den HURK, S., BABIUK, L.A. Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response. *Journal of Virology*, v.73, n.12, p.10214-10223, 1999.

LI, L., FANG, W., LI, J., HUANG, Y., YU, L. Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by the attenuated *Salmonella* elicits protective immune responses in chickens. *Vaccine*, v.24, n.33-34, p.5919-5927, 2006.

LIAO, J.C.F., GREGOR, P., WOLCHOK, J.D., ORLANDI, F., CRAFT, D., LEUNG, C., HOUGHTON, A.N., BERGAMAN, P.J. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibodies responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immunity*, v.6, n.8, p.2-10, 2006.

LIU, M., ACRES, B., BALLOUL, J.M., BIZOUARNE, N., APUL, S., SLOS, SQUIBAN, P. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n.2, p.14567-14571, 2004.

LIMA KM, BONATO VL, FACCIOLI LH, BRANDAO IT, DOS SANTOS SA, COELHO-CASTELO AA. Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *Vaccine*, v.19, p.25–26, 2001.

LIMA, K. M., SANTOS, S.A., RODRIGUES JR., J.M., SILVA, C.L. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, v.22, n., p.2374–2379, 2004.

LIU, M., ACRES, B., BALLOUL, J.M., BIZOUARNE, N., PAUL, S., SLOS, P., et al. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, n.2, p.14567-14571, 2004.

LODMELL, D.L., RAY, N.B., PARNELL, M.J., EWALT, L.C., HANLON, C.A., SHADDOCK, D.S., SANDERLIN, D.S., RUPPRECHT, C.E. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nature Medicine*, v. 4, p.8, p.949-952, 1998.

MACKLIN, M.D., McCABE, D., MCGREGOR, M.W., NEUMANN, V., MEYER, T., CALLAN, R., HINSHAW, V.S. SAWAIN, W.T. Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus. *The Journal of Virology*, v.72, p.1491-1496, 1998.

MacGREGOR, R.R., GINSBERG, R., UGEN, K.E., BAINE, Y., KANG, C.U., TU, X.M., HIGGINS, T., WEINER, D.B., BOYER, J.D. T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. *AIDS*, v. 16, p.2137-2143, 2002.

MOREL, P.A., FALKNER, D., PLOWEY, J., LARREGINA, A.T., FALO JR., L.D. DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. *Vaccine*, v.22, p.447-456, 2004.

MUMPER, R.J., LEDEBUR JR, H.C. Dendritic cell delivery of plasmid DNA. Applications for controlled genetic immunization. *Molecular Biotechnology*, v.19, n.1, p.79-95, 2001.

MUÑOZ-MONTESINE, C., ANDREWS, E., RIVERS, R., GONZÁLEZ-SMITH, A., MORAGACID, G., FOLCH, H., CÉSPEDES, S., OÑATE, A.A. Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4+ and CD8+ T cells. *Infection and Immunity*, v.72, n.4, p.2081-2087, 2004.

MWANGI, W., BROWN, W.C., SPLITTER, G.A., ZHUANG, Y., KEGERREIS, K., PALMER, G.H. Enhancement of antigen acquisition by dendritic cells and MHC class II-restricted epitope presentation to CD4+ T cells using VP22 DNA vaccine vectors that promote intercellular spreading following initial transfection. *Journal of Leukocyte Biology*, v.78, n.2, p.401-411, 2005.

NAFTZGER, C., TAKECHI, Y., KOHDA, H., HARA, I., VIJAYASARADHI, S., HOUGHTON, A.N. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.93, p.14809-14814, 1996.

NAGATA, T., UCHIJIMA, M., YOSHIDA, A., KAWASHIMA, M., KOIDE, Y. Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells; analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.261, p.445-451, 1999.

NAGATA, T., AOSHI, T., UCHUIMA, M., SUZUKI, M., KOIDE, Y. 2004. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T-lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology*, v.23, n.2, p.93-106, 2004.

NORMAN, J.A., HOBART, P., MANTHIRPE, M., FELGNER, P., WHEELER, C. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine*, v.15, n.8, p.801-803, 1997.

NOUR-EL-DIN, A.N., SHKRETA, L., TALBOT, B.G., DIARRA, M.S., LACASSE, P. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, v.15, n.12, p. Epub., 2006.

OKADA, M., KITA, Y., NAKAJIMA, T., KANAMARU, N., HASHIMOTO, S., NAGASAWA, T., KANEDA, Y., YOSHIDA, S., NISHIDA, Y., KUKAMUZU, R., TSUNAI, Y., INOUE, R., NAKATANI, H., NAMIE, Y., YAMADA, J., TAKAO, K., ASAI, R., MATSUMOTO, M., McMURRAY, D.N., DELA CRUZ, E.C., TAN, E.V., ABALOS, R.M., BURGOS, J.A., GELBER, R., SAKATANI, M. Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the *Cynomolgus* monkey model of TB. *Vaccine*, v.22, 2007. Epub ahead of print

OLIVEIRA, S.C., HARMS, J.S., RECH, E.L, RODART, R.S., BOCCA, A.L., GOES, A.M., SPLITTER, G.A. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of an intracellular bacterial infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.32, p.77-84, 1998.

OÑATE, A.A.; CÉSPEDES, S.; CABRERA, A.; RIVERS, R.; GONZÁLES, A.; MUÑOZ, C.; FOLCH, H.; ANDREWS, E. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, v.71, n.9, p.4857-4861, 2003.

OSORIO, J.E., TOMLINSON, C.C., FRANK, R.S., HAANES, E.J., RUSHLOW, K., HAYNES, J.R., STINCHOMB, D.T. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine*, v.17, p.1109-1116, 1999.

OTTEN, G.R., SCHAEFER, M., DOE, B., LIU, H., MEGEDE, J.Z., DONNELLY, J., TABUSSAY, D., BARNETT, S., ULMER, J.B. Potent immunogenicity of ana HIV-1 gag-pol fusion DNA vaccine delivered by *in vivo* eletroporation. *Vaccine*, v.24, n.21, p.4503-4509, 2006.

PASQUINI, S., XIANG, Z., WANG, Y., HE, Z., DENG, H., BLASCZYK-THURIN, M., ERTL, H.C.J. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvant. *Immunology and Cell Biology*, v.75, p.397-401, 1997.

PERKINS, S.D., FLICK-SMITH, H.C., GARMONY, H.S., ESSEX-LOPRESTI, A.E., STEVENSON, F.K., PHILLPOTTS, R.J. Evaluation of the VP22 protein for enhancement of a DNA vaccine against anthrax. *Genetic Vaccines and Therapy*, v.3, n.3, p.1-9, 2005.

RAINCZUK, A., SMOOKER, P.M., KEDZIERSKI, L., BLACK, C.G., COPPEL, R.L., SPITHILL, T.W. The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi adami* challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol. *Vaccine*, v.21, p.3030-3042, 2003.

RAMSHAW, I.A., FORDHAM, S.A., BERNARD, C.A., MAGUIRE, D., COWDEN, W.B., WILLENBORG, D.O. DNA vaccine for the treatment of autoimmune disease. *Immunology and Cell Biology*, v.75, p.409-413, 1997.

RAZ, E., WATANABE, A., BAIRD, S M., EISENBERG, R A., PARR, T B., LOTZ, M., KIPPS, T J., CARSON, D A. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, n.10, p.4523–4527, 1993.

REN, S., LI, M., SMITH, J.M., DETOLLA, L. J., FURTH, P.A. Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC Biotechnology*, v.2, n.10, p.1-6, 2002.

ROBINSON, H.L. Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine*, v.15, n.8, p.785-787, 1997.

RODRIGUES Jr, J.M., LIMA, K.M., CASTELO, A.A.M., MARTINS, L.D.B., SANTOS, S.A.S., FACCIOLI, L.H., SILVA, C.L. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.30, p.468-477, 2004.

SNADEEP, K., TRIPATHY, S.K., SVENSSON, E.C., BLACK, H.B., GOLDWASSER, E., MARGALITH, M., HOBART, P.M., LEIDEN, J.M. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Genetics*, v.93, p.10876-10880, 1996.

SEDEGAH, M., JONES, T.R., KAUR, M., HEDSTROM, R., HOBART, P., TINES, J.A., HOFFMAN, S.L. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, p.7648-7653, 1998.

SEDEGAH, M., CHAROENVIT, L., BELMONTE, M., MAJAN, V.F., ABOT, S., GANESHAN, H., KUMAR, S., BACON, D.J., STOWERS, A., NARUM, D.L., CARUCCI, D.J., ROGERS, W.O. Reduced immunogenicity of DNA vaccine plasmids in mixtures. *Gene Therapy*, v. 1: p.448-456, 2004.

SIEGRIST, C.A. Potential advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization. *Vaccine*, v.15, n.8, p.798-800, 1997.

SIN, J.I., KIM, J.J., ARNOLD, R.L., SHROFF, K.E., MCCALLUS, D., PACHUK, C., MCELHINEY, S.P., WOLF, M.W., POMPA-DE BRUIN, S.J., HIGGINS, T.J., CICCARELLI, R.B. AND WEINER, D.B. IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4(+) T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *Journal Immunology*, v.162, p.2912-2921, 1999.

SINGH M, BRIONES M, OTT G, O'HAGAN D. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p.811-816, 2000.

SINGH, M., O'HAGAN, D.T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, v.19, n.6, p.715-728, 2002.

SNAPPER, C.M., FINKELMAN, F.D., PAUL, W.E. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunological Reviews*, v.102, p.51-75, 1988.

SOMASUNDARAM, C., TAKAMATSU, H., ANDREONI, C., AUDONNET, J.C., FISHER, L., LEFEVRE, F., CHARLEY, B. Enhanced protective response and immune adjuvant effects of porcine CM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.70, p.277-287, 1999.

ULMER, J.B., DONNELLY, J.J., PARKER, S.E., PODES, G.H., FELGNER, P.L., DWARKI, V.J., GROMKOWSKI, S.H., RANDALL DECK, R., DeWITT, C.M. FRIEDMAN, A., HAWE, L.A., LEANDER, K.R., MARTINEZ, D., PERRY, H.C., SHIVER, J.W., MONTGOMERY, D.L., LIU, M.A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, v. 259, p.1745-1749, 1993.

ULMER, J.B., DECK, R.R., DEWITT, C.M., FU, T.M., DONNELLY, J.J., CAULFIELD, M.J., LIU, M.A. Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine*, v.15, n.8, p.839-841, 1997.

ULMER, J.B., WAHREN, B., LIU, M.A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *TRENDS in Molecular Medicine*, v.12, n.5, p.216-222, 2006.

UCHIJIMA, M., YOSHIDA, A., NAGATA, T., KOIDE, Y. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *Journal Immunology*, v.161, p.5594-5599, 1998.

VANROMPAY, D., COX, E., VANDENBUSSCHE, F., VOLCKAERT, G., GODDEERIS, B. Protection of turkeys against *Clamidia psitaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations. *Vaccine*, v.17, p.2628-2635, 1999.

van DRUNEN LITTEL-van den HURCK, S., BRAUN, R.P., KARVONEN, B.C., KING, T., YOO, D., BABIUK, L.A. Immune response and protection induced by DNA vaccines encoding bovine parainfluenza virus type 3 glycoprotein. *Virology*, v.260, p.35-46, 1999.

van TIENHOVEN, E.A.E., TEN BRINK, C.T.B., van BERGEN, J., KONING, F., van EDEN, W., BROEREN, C.P.M. Induction of antigen specific CD4⁺ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. *Vaccine*, v.19, p.1515-1519, 2001.

VELIKOVSKY, C. A., J. CASSATARO, G. H. GIAMBARTOLOMEI, F. A. GOLDBAUM, S., ESTEIN, R. A. BODWEN, L. BRUNO, C. A. FOSSATI, AND M. SPITZ. 2002. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induce protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, v.70, p.2507–2511, 2002.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; HUYGEN, K.; DE BRAEKELEER, J.; DIET, R.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; VERSHUEREN, 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.

XIANG, Z.Q., HE, Z., QANG, Y., ERTL, H. The effect of interferon- γ on genetic immunization. *Vaccine*, v.15, n.8, p.896-898, 1997.

XU, Z.L., MIZUGUCHI, H., ISHII-WATABE, A., UCHIDA, E., MAYUMI, T., HAYAKAWA, T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, v.272, p.149-156, 2001.

ZHANG, X., DIVANGAHI, M., NGAI, P., SANTOSUOSSO, M., MILLAR, J., ZGANIAZ, A., WANG, J., BRAMSON, J., XING, ZHOU. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. *Vaccine*, v.25, n.7, p.1342-1352, 2007.

ZHENG, C., BABIUK, L.A., VAN DRUNEM LITTLE-VAN DEN HURK, S. Bovine Herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of DNA vaccine in cattle. *Journal of Virology*, v.79. n.3, p.1948-1953, 2005.

ZHOU, H., DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.31, p.10846–10851, 2005.

YOSHIDA A, NAGATA T, UCHIJIMA M, HIGASHI T, KOIDE Y. Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine*, v.18, p.1725–1729, 2000.

WAINE, G.J., McMANUS, D.P. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitology Today*, v.11, n.3, p.113-116, 1995.

WANG, R., DOOLAN, D.L., LE, T.P., HEDSTROM, R.C., COONAN, K.M. CHAROENVIT, Y. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine. *Science*, v.282, p.476-480, 1998.

WANG, S., FARFAN-ARRIBAS, D.J., SHEN, S., CHOU, Te-H.W., HIRSCH, A., HE, F., LU, S. Relative contributions of codon usage, promotor efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, v.24, n.21, p.4531-4540, 2005.

WEBER LW, BOWNE WB, WOLCHOK JD, SRINIVASAN R, QIN J, MOROI Y, CLYNES R, SONG P, LEWIS JJ, HOUGHTON AN. Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *The Journal of Clinical Investigation*, v.102, n.6, p.1258-1264, 1998.

WHALEN, R.G. DNA Vaccines for Emerging Infectious Diseases: What If? *Emerging Infectious Diseases*, v.2, n.3, p.168-175, 1996.

WOLFF, J.A., MALONE, R.W., WILLIAMS, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI, A., FELGHER, P.L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, v.247, p.1465-1468, 1990.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Analisar a variabilidade dos genes *msp1 α* de diferentes amostras de *A. marginale* e avaliar a imunogenicidade de plasmídios recombinantes contendo genes que codificam as MSPs em camundongos BALB/c.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a relação filogenética entre as seqüências dos genes *msp1 α* das amostras de *A. marginale* isoladas no Paraná e em outras regiões geográficas.
- Construir vacinas de DNA com os genes *msp1 α* , *msp1 β* e *msp5* em vetor de expressos em célula eucariótica.
- Avaliar a imunogenicidade das vacinas de DNA para MSP1a, MSP1b e MSP5 de *A. marginale* em camundongos BALB/c, utilizando os plasmídios recombinantes individualmente e em associação.

3. ARTIGO PUBLICADO

J. Vet. Med. B 53, 404–411 (2006)
 © 2006 The Authors
 Journal compilation © 2006 Blackwell Verlag, Berlin
 ISSN 0931–1793

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Campus Universitário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

Phylogenetic Analysis of *Anaplasma marginale* Strains from Paraná State, Brazil, Using the *msp1 α* and *msp4* genes

M. C. VIDOTTO^{1,3}, S. F. KANO¹, F. GREGORI², S. A. HEADLEY¹ and O. VIDOTTO¹

Addresses of authors: ¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Campus Universitário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; ²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade, Instituto Biológico de São Paulo, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, São Paulo, SP, Brazil; ³Corresponding author: Tel.: +55 043 3371 4485; fax: +55 043 3371 4485; E-mail: macarlos@uel.br

With 6 figures and 1 table

Received for publication March 14, 2006

Summary

Anaplasma marginale is an obligate intraerythrocytic rickettsial pathogen (order, Rickettsiales; family, Anaplasmataceae) that causes bovine anaplasmosis. This disease is widely distributed in tropical and sub-tropical regions of the world and causes important economic losses to cattle production. Major surface protein (MSP)1a (*msp1 α* gene) is one of the six MSPs identified on *A. marginale* from cattle, whose sequence and size vary according to the number of tandem 28- to 29-amino acid repeats. This study characterized the *msp1 α* and *msp4* genes obtained from three distinct Brazilian herds from the State of Paraná. Three strains of the *msp1 α* and one strain of the *msp4* gene were sequenced. The strains evaluated revealed PCR products of different size, representing three, five and six internal repeats. Sequence analyses confirmed the number of tandem sequence copies and revealed a high degree of sequence identity with strains from other Brazilian States, as well as strains from the USA, Europe and Israel. The *msp1 α* DNA and amino acid sequences from *A. marginale* and DNA sequences of *msp4* strains did not reveal distinct phylogeographical segregation. However, the amino acid sequences of *msp4* demonstrated definite phylogeographical relationship. These results suggest that the amino acid sequences of *msp4* should be used for phylogenetic identification of *A. marginale* strains and may be an important tool for the epidemiology and control of anaplasmosis. Additionally, the close similarity of the Paraná strains of *A. marginale* with strains from USA, Europe and Asia may reflect the introduction of these genes during the development of the Brazilian bovine herd.

Introduction

Anaplasma marginale is an intraerythrocytic *Anaplasmataceae* pathogen transmitted biologically by infected ticks or mechanically by biting flies and contaminated fomites (Rickey, 1981). It causes bovine anaplasmosis, a cattle disease with widespread distribution in tropical and sub-tropical regions of the world that is a significant cause of economic losses (Callow, 1984). Anaplasmosis is characterized clinically by fever, haemolytic anaemia, weight loss, abortion and in some cases death (Alderink and Dietrich, 1981). Persistently infected cattle remain carriers with low parasitaemia, serving as a permanent source of infection for

susceptible cattle (Kuttler, 1984; Zaugg and Kuttler, 1985). Knowledge of the genetic diversity among the various strains of *A. marginale* has importance in epidemiological, virulence and vaccine development studies.

Outer membrane proteins of *A. marginale* have been studied, and variants of the six major surface protein (MSP) genes (*msp1 α* , *msp1*, *msp2*, *msp3*, *msp4* and *msp5*) exist (Allred et al., 1990; Barbet and Allred, 1991; Visser et al., 1992; Oberle et al., 1993; Palmer et al., 1994, 2001; Alleman et al., 1997). Some studies have demonstrated genetic variation among different *A. marginale* strains by means of restriction fragment length polymorphism analysis (Krueger and Buening, 1988), Repetitive Extragenic Palindromic/Enterobacterial Repetitive Inter-genic Consensus (REP/ERIC) PCR patterns (Ferreira et al., 2001), PCR assay based on specific sequences of MSPs (de la Fuente et al., 2001; Lew et al., 2002) and protein sequence (de la Fuente et al., 2001, 2004).

Major surface protein 1 is a dimer of two structurally unrelated polypeptides, MSP1a (*msp1 α*) and MSP1b (*msp1 β*) (Barbet et al., 1987). Major surface protein 1a varies in sequence and size due to the number of tandem 28- to 29-amino acid repeats (Allred et al., 1990; Palmer et al., 2001). Thus the *msp1 α* gene presents an adequate feature for the development of a generic *A. marginale* genotyping assay (Lew et al., 2002), and it was shown to be a stable genetic marker of *A. marginale* geographical strains (de la Fuente et al., 2001; Bowie et al., 2002). However, *msp1 α* sequences or protein sequences of strains from Oklahoma compared with those of Latin America and United States demonstrate no geographical clustering by maximum-parsimony (MP) (de la Fuente et al., 2003). In addition, *msp4* sequences are stable markers for genetic characterization of *A. marginale* strains (de la Fuente et al., 2003, 2004).

Antigenic (Gonçalves Ruiz et al., 2002; Kano et al., 2002; Oliveira et al., 2003) and genetic differences (Ferreira et al., 2001) between Brazilian strains of *A. marginale* were recently reported, but the genetic diversity of the MSP1a sequences were described in strains from only one Brazilian State (de la Fuente et al., 2004). Major surface protein 1a sequences are highly heterogeneous among *A. marginale* strains from Minas Gerais, Brazil, and the *msp1 α* gene of these strains was not a useful marker for phylogeographical characterization of *A. marginale* strains (de la Fuente et al., 2004).

The objective of this study was to investigate the phylogenetic variation of *msp1x* and *msp4* sequences of *A. marginale* strains from infected cattle within the State of Paraná, Brazil.

Materials and Methods

Anaplasma marginale strains

Three *A. marginale* strains were obtained from cattle of different regions of Parana State (PR), Brazil. *Anaplasma centrale* and *A. marginale* from Florida strains were used as controls. *Anaplasma marginale* strains from cattle from different regions of Brazil (Ferreira et al., 2001) were also used in this study. These regions were Central-West/Mato Grosso do Sul (MS-CG), South-east/São Paulo-Jaboticabal (SP), South-east/Minas Gerais (AUFV1), South/Rio Grande do Sul (RS) and South/Paraná. The South Paraná strains were obtained from three different herds: PR1, Veterinary Teaching Hospital, University Estadual de Londrina; PR2, Ireer Municipality, Paraná and PR3, Jaguapitã Municipality, Paraná.

Polymerase chain reaction

The genomic DNA of *A. marginale* strains was prepared using the Puregene Gentra System kit™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). A PCR was designed using the forward primer 1733F – 5'-TGTGCTTATGGCAGACATTCC-3' (nucleotide positions 111 to 90 relative to the transcription start site) and reverse primer (2957R – 5'-AAA-CCTTGTAAGCCCCAACTTATCC-3') (positions 1090–1113) described by Lew et al. (2002). To amplify the *msp4* gene, a set of primers was constructed based on the GenBank sequence of (L01987) F (5'-CACCATGAATTACAGAGAATTG-3') and R (5'-GCTGAACAGGAATCTTGCTCC-3').

The PCR conditions for the *msp1x* and *msp4* genes were identical, and consisted of a PCR reagent mixture of 50 µl, 20 pmol of each primer, 200 mM deoxynucleotide triphosphates, 1.5 mM MgCl₂, one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), 1x PCR buffer (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl) in 0.2 ml PCR tubes was used in a Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600 (Norwalk, CT, USA). The amplification cycles following an initial denaturation at 94°C for 3 min consisted of 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 2 min at 72°C, followed by a final cycle with a 7 min extension step at 72°C. Amplified products were separated in 2% TBE (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8) agarose gels using 100 bp ladders as size markers (100 bp DNA ladder; Life Technologies, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Gels were visualized with ethidium bromide under UV illumination and photographed.

Sequence analysis

Polymerase chain reaction products of *msp1x* and *msp4* genes were cloned in pCR4-TOPO TA cloning Kit for sequencing (Invitrogen™) and sequenced using BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the primers 1733F and 2957R (Lew et al., 2002) for the tandem region, and the M13 forward and reverse primers. The sequences were submitted to BLASTn and BLASTx (Altschul et al., 1990, 1997) through the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

to verify the sequence identity, and subsequently deposited in GenBank.

Sequence alignment and phylogenetic analysis

The percent identity of protein sequences containing tandem amino-acid repeat regions was determined by Vector NTI Advance™ 10 Software (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

The *A. marginale msp1x* gene fragment containing tandem repeat variable regions were used for sequence alignment and phylogenetic analysis. The complete *msp4* genes from *A. marginale* strains were used to confirm the analysis of *msp1x* gene fragments. Multiple sequence alignments, identity tables and phylogenetic trees based on the DNA and amino acid sequences of *A. marginale msp1x* and *msp4* genes were obtained by using Vector NTI Advance™ 10 Software (Invitrogen Corporation), which is based on the neighbour joining method.

The GenBank accession number of the DNA and amino acid sequences of MSP1a and MSP4 of *A. marginale* strains used during this study are shown in Figs 3, 4, 5 and 6.

Results

The three PR *A. marginale* strains showed amplicons of 1030, 964 and 790 bp with the primers for *msp1x*, representing six, five and three internal repeats (Fig. 1; Table 1). Other Brazilian strains from São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais and Rio Grande do Sul States varied in size from 790 to 950 bp, representing three to five internal repeats. The Florida strain used as control amplified eight repeat units as predicted from the product sizes of 1190 bp (Fig. 1, lane 2; Table 1). The *msp1x* of *A. centrale* was not amplified (Fig. 1, lane 10).

The sequences of the MSP1a repeat regions were obtained for PR1, PR2 and PR3 *A. marginale* strains, and these *msp1x* sequences were deposited in the GenBank database with accession numbers AY602768, AY998120 and AY998121 respectively. The analysis of these sequences confirmed the presence of six, five and three copies of tandem repeats, respectively, in the amino terminal portion of the protein.



Fig. 1. Amplification of *msp1x* tandem repeat sequences from different strains of *Anaplasma marginale* by PCR using the 1733 forward and 2956 reverse primers (Lew et al., 2002). Lanes 1 and 11, 100 bp ladder (Invitrogen™); Lane 2 9 *A. marginale* strains: Lane 2, Florida; Lane 3, Parana1; Lane 4, Parana2; Lane 5, Parana3; Lane 6, Rio Grande do Sul (RS18); Lane 7, Minas Gerais (UFV1); Lane 8, Centro Oeste; Lane 9, São Paulo (Jaboticabal); Lane 10, *A. centrale*.

Table 1. Source of *Anaplasma marginale* strains used in this study including molecular size and predicted number of internal repeats of each product amplified

Strains	Origin of strains	Molecular size (bp)	No. repeats
Florida	Florida, USA	1190	8
PR1	Paraná	1030	6
PR2	Paraná	950	5
PR3	Paraná	790	3
RS18	Rio Grande Sul	950	5
UFV1	Minas Gerais	790	3
CO	Centro Oeste	870	4
SP	Jaboticabal, SP	790	3

The repeat units from the three PR strains demonstrated some differences in DNA and amino acid sequences (Fig. 2). These sequences were compared with sequences of other Brazilian strains (originated from Minas Gerais), and to all known MSP1a and MSP4 sequences of *A. marginale*.

By analysis of the amino acid sequences, the three Paraná strains for the MSP1a gene of *A. marginale* demonstrated differences in identity: when PR1 was compared with PR2 and PR3, identities of 85% and 84% were observed respectively. However, the PR1 strain demonstrated a 100% identity with strains from Mexico, and an identity of 97% with other

previously described Brazilian strains (Brazil 5, 9 and 12). The PR2 strain demonstrated a 91% identity with strains from Oklahoma, USA and Italy, and 90% identity with other strains from Oklahoma, USA, Italy and Israel, while the PR3 strain demonstrated an identity of 90% with some strains from Israel. However, when the amino acid sequences of Paraná 1 were compared with all other strains of *A. marginale* for the MSP4 sequences, all strains produced identities that were >97%. The phylogenetic relationships of the amino acid sequences described in this study for the MSP1a and MSP4 of *A. marginale* are shown at Figs 3 and 4 respectively.

The amino acid sequences of MSP1a repeat units from the three PR strains have amino acid substitutions at different positions (Fig. 2). These strains presented six new repeat forms (λ , Ω , ω , ψ , κ and θ) in MSP1a sequences; thus Latin American strains present 14 repeat forms from α to θ (Fig. 3a), which were not present in the sequenced North American strains of *A. marginale* (Fig. 3). The repeat forms (σ , μ , τ , λ , Ω , ω , ψ , κ and θ) were predominant in most Brazilian strains relative to the other strains of MSP1a analysed (Fig. 2B).

Phylogenetic relationships between the three Paraná strains, previously described Brazilian strains and strains of *A. marginale* from other geographical locations (North and South America, Asia, Australia and Europe) were inferred using *mSP1a* and *mSP4* DNA sequences deposited in GenBank. DNA sequences for strains of *mSP1a* of *A. marginale* were obtained for PR1, PR2 and PR3; however, only PR1 strain produced DNA sequences of the *mSP4* gene; all sequences obtained during this study are deposited in GenBank and are given in Figs 3 and 4.

Four definite clusters and various sub-clusters were observed when the DNA sequences of the *mSP1a* gene of *A. marginale* were analysed; however, definite phylogeographical segregation was not observed (Fig. 5). The three strains from the State of Paraná (PR1, PR2 and PR3) were separated into two different sub-clusters: PR1 and PR2 strains were in the same sub-cluster with the first described *mSP1a* strain of *A. marginale* in Brazil along with strains from South, Central and North America; while the PR3 strain was more similar to the strains from Israel. Additionally, the three Paraná strains were different from most American and European strains by polygenetic analysis; but most American and European strains were separated into various sub-clusters (Fig. 5).

The analysis of *mSP4* DNA sequence also indicated that MSP4 is not a good marker for global phylogeographical analysis; four definite clusters and various sub-clusters were observed (Fig. 6). The *mSP4* sequence from PR1 strain was clustered together with Puerto Rico, Argentina, Australia and other Brazilian strain, but was in a separate group from other previously described Brazilian strains, which were within a single cluster (Fig. 6).

Discussion

The repeat regions within *mSP1a* gene vary in number among three *A. marginale* strains from Paraná State, Brazil, when tested by the sensitive and specific *mSP1a* PCR method for *A. marginale* developed by Lew et al. (2002). This PCR test also shows variations within and among *mSP1a* genes from outbreaks of anaplasmosis in different countries. All Australian strains have a common product with only one repeat unit, and no other isolate from any other country evaluated shows

(a)

Repeat form Encoded sequence

A	DDSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG-
B	A*****G*****DQ*****
C	A*****G*****GQ*****
F	T*****GQ*****
M	A*****GQ*****
N	T*****DQ*****
α	A*****L*****GQ*****
β	T*****G*****G*****GQ*****
Γ	T*****G*****G*****GQ*****
π	A*****G*****G*****GQ*****P**
Σ	A*****G*****G*****GQ*****
σ	A*****G*****I*****DH*****
μ	A*****L*****GQ*****
τ	T*****I*****P*****GQ*****
φ	T*****GQ*****
λ	A*****G*****G*****GQ*****
Ω	T*****G*****G*****GQ*****
ω	T*****I*****DQ*****
ψ	T*****L*****DQ*****G*
κ	A*****I*****P*****GQ*****
θ	A*****G*****I*****GQ*****

(b)

<i>A. marginale</i> strains	Structure of MSP1a tandem repeats	No. of repeats
Florida, USA	A B B B B B B B	8
California, USA	B B C	3
Veracruz, Mexico	α β β Γ	4
Brazil 9, Brazil	α β τ M	4
Brazil 12	α β β N	4
Brazil 5	C F N	3
Brazil	B B Q σ μ	5
Virasoro, Argentina	Σ B Q B C	5
Salta, Argentina	B B M	3
PR1, Brazil	α β β β Γ	6
PR2, Brazil	λ F Ω ω ψ	5
PR3, Brazil	τ κ θ	3

Fig. 2. Sequence of MSP1a tandem repeats in New World strains of *Anaplasma marginale*. (a) The one letter amino acid code was used to depict the different sequences found in MSP1a repeats. Repeat forms α to φ were revised by de la Fuente et al. (2004) and λ to θ are the new repeat forms described from Brazilian strains. Asterisks indicate identical amino acids. Gaps indicate deletions/insertions. (b) The structure of the MSP1a repeat regions was represented for New World strains of *A. marginale* using the repeat forms described in (a).

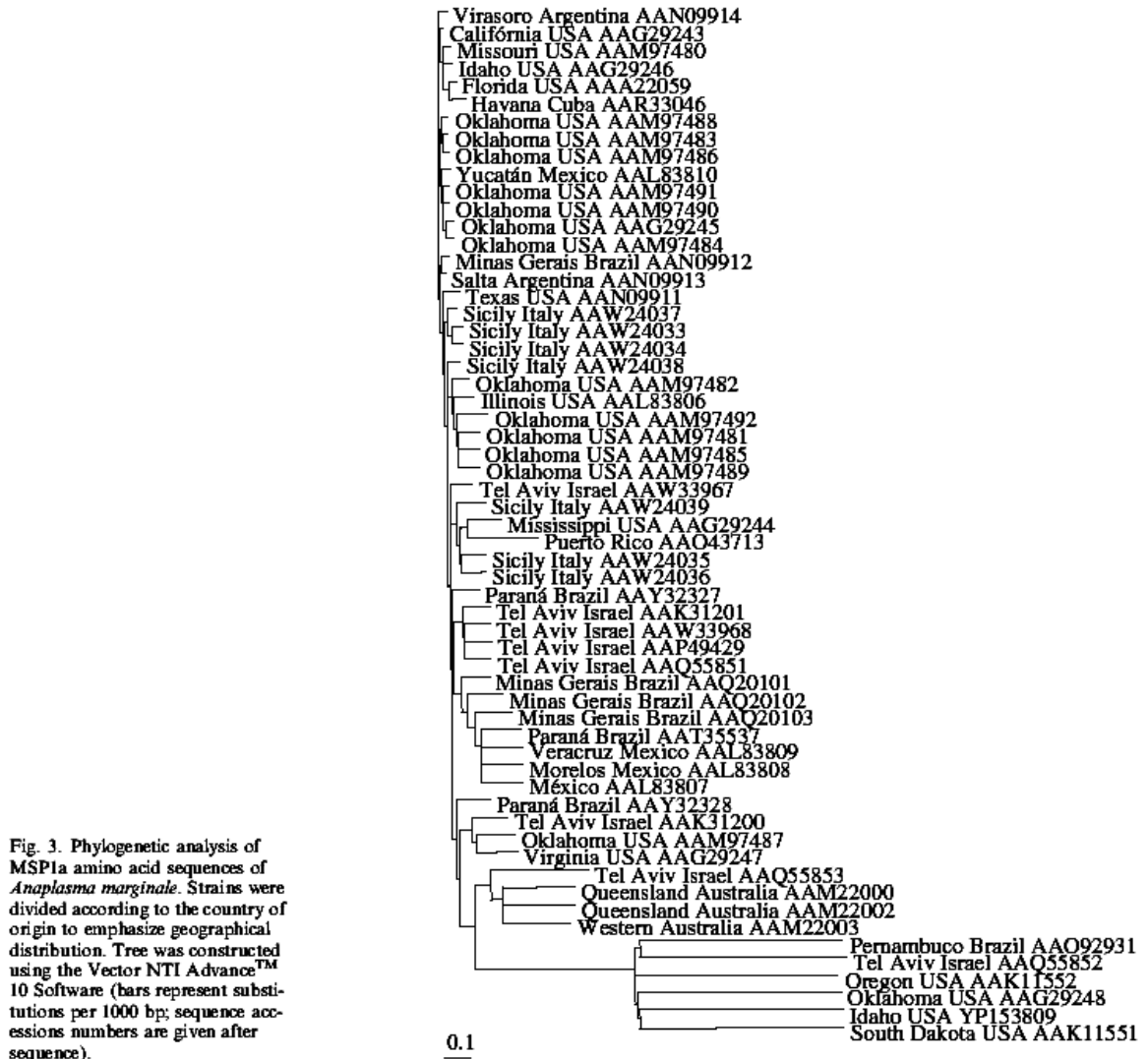


Fig. 3. Phylogenetic analysis of MSP1a amino acid sequences of *Anaplasma marginale*. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accessions numbers are given after sequence).

this pattern. Thus, the *A. marginale* amplicons of many strains from different countries range from 630 to 1190 bp, representing one to eight internal repeats (Lew et al., 2002). The double bands observed in Minas Gerais strain (Fig. 1, lane 7) probably is because of multiple genotypes within the same sample obtained from DNA of low dilution, as the bands were of the same intensity. Similar findings have been reported (Palmer et al., 2004); these authors have indicated that this probably occurs because of superinfection with two different strains of *A. marginale*. However, the occurrence of superinfection in cattle by different genotypes of *A. marginale* was not previously recognized (de la Fuente et al., 2002b). Therefore, studies must be done to elucidate this phenomenon in bovine anaplasmosis.

This PCR based on *msslz* gene has the potential to discriminate *A. marginale* from different outbreak cases in Brazil. It also allows differentiation of *A. marginale* from *A. centrale*, and it is easier to interpret than REP/ERIC PCR

patterns (Ferreira et al., 2001). According to the data obtained by PCR, the sequence of the tandem-repeat units of MSP1a repeats present genetic heterogeneity.

Anaplasma marginale strains from Paraná, Brazil, demonstrate high genetic similarity with MSP1a of *A. marginale* strains from Mexico (100%) and Minas Gerais, Brazil (90–97%), all other strains were different and phylogeographical differentiation was not definite. While with the MSP4 amino acid sequences the PR1 strain was more than 97% similar with all other amino acid sequences, and phylogeographical segregation was more distinct.

The repeat units from the three Paraná strains present amino acid substitutions at different positions, identifying six new repeat forms (λ , Ω , ω , ψ , κ and θ) and 14 repeat forms (α to θ) were present only in Latin American strains of *A. marginale* (Fig. 2). These repeat forms observed in the three Paraná strains have not been previously described in strains from other countries, and may suggest a unique feature within this

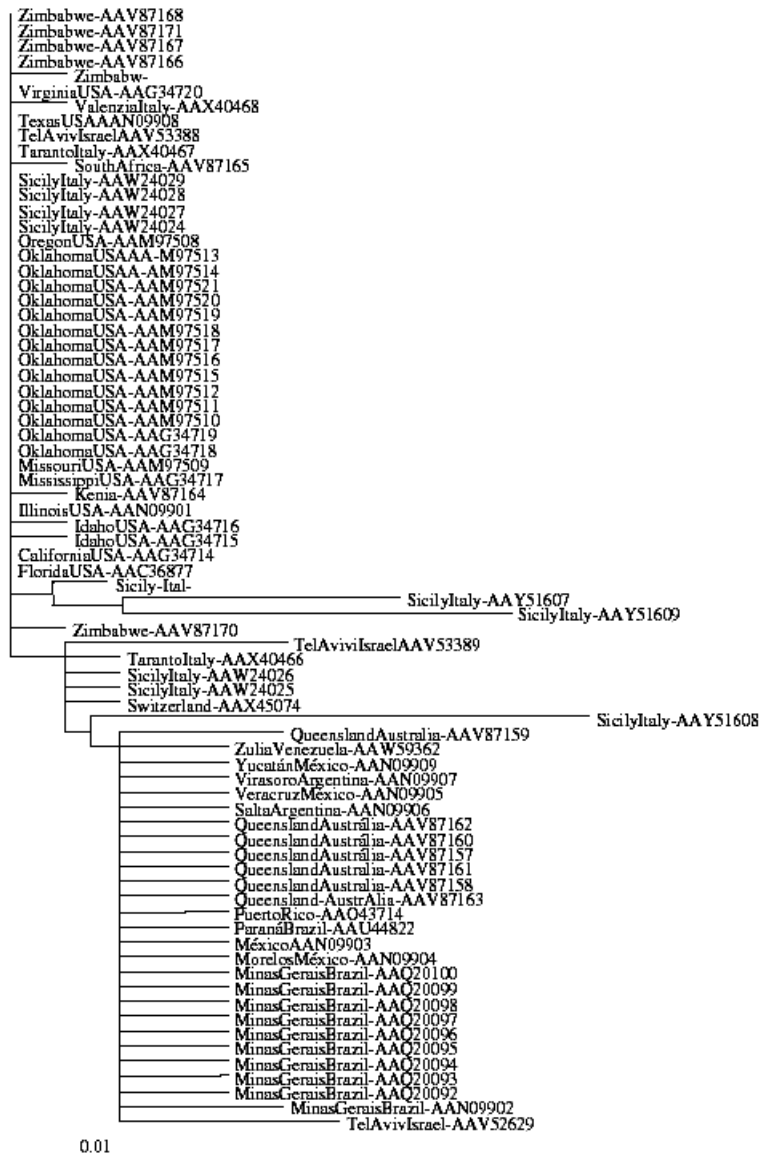


Fig. 4. Phylogenetic analysis of MSP4 amino acid sequences of *Anaplasma marginale*. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accessions numbers are given after sequence).

geographical region. Recently, a study of *A. marginale* strains from Minas Gerais, Brazil, also demonstrated genetic heterogeneity among MSP1a sequences from Brazilian strains of *A. marginale* (de la Fuente et al., 2004), and these strains included the repeat forms σ , μ and τ , confirming the presence of specific forms of tandem repeats only in Brazilian strains (Fig. 2b).

The sequence SSAGGQQQESS that is located in the N-terminal repeats of MSP1a is the linear B-cell epitope (Garcia-Garcia et al., 2004), which presents high variability by amino acid substitution, contributing to the new repeat forms. Moreover, CD4⁺ T-lymphocyte epitopes have been identified in the hydrophilic N-terminal region of MSP1a that contains the repeated peptides (Brown et al., 2002). Thus, this region contains the T- and B-cell epitopes necessary for developing a protective immune response, and its high-level variability may

be an important factor in the lack of control of anaplasmosis in endemic areas.

The presence of different MSP1a genotypes in different countries (Palmer et al., 2001; de la Fuente et al., 2002a,b, 2004; Ferreira et al., 2001; Lew et al., 2002) suggests that MSP1a sequences, although conserved during multiplication of the parasite in the bovine host and after transmission by ticks (Palmer et al., 2001; Bowie et al., 2002), are rapidly changing, resulting in genotype variations within *A. marginale* populations. This heterogeneity between MSP1a sequences can probably be explained as a result of the position of the tandem repeats of *A. marginale* within the region with higher mutability, and this is supported by the frequency of variable amino acid positions within geographical strains that are higher in this region than in the rest of the protein (Bowie et al., 2002).

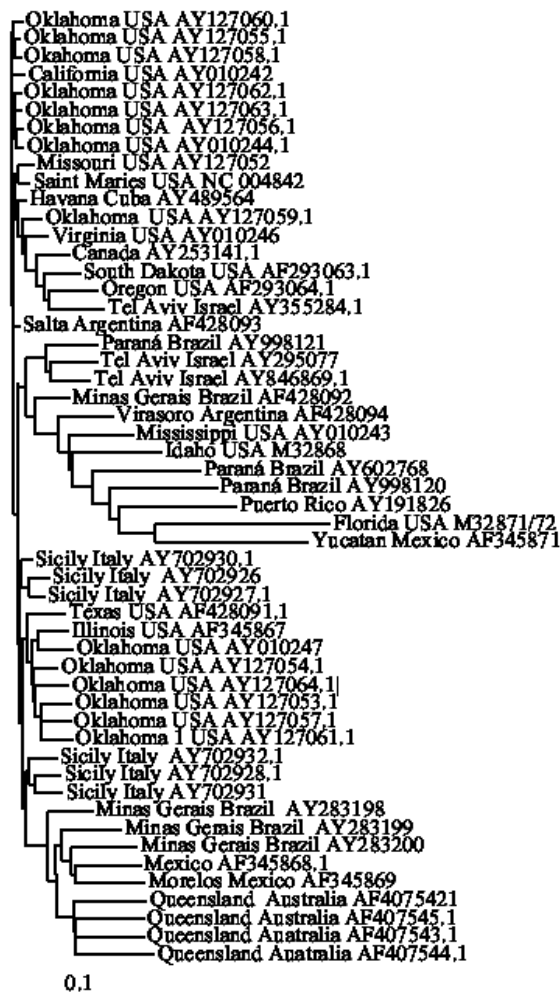


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the relationship of *Anaplasma marginale* strains from different geographical locations based on the DNA *msp1x* gene sequences deposited in GenBank. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accessions numbers are given after sequence).

This study has demonstrated that the DNA sequences of the *msp1x* gene did not provide a distinct phylogeographical resolution, because of its high variability; similar results have been described (de la Fuente et al., 2002a, 2003, 2004). In contrast, *msp4* sequences may provide useful phylogeographical information as they show patterns for *A. marginale* strains on a broad geographical scale, where the Latin American strains cluster into a separate clade (de la Fuente et al., 2004).

The analysis of *msp1x* gene distribution after inclusion of PR1, PR2 and PR3 *A. marginale* strains did not provide a definite phylogeographical resolution; similar results were described (de la Fuente et al., 2005b). These strains were grouped with other Brazilian and American strains, while previously described Brazilian strains were grouped with

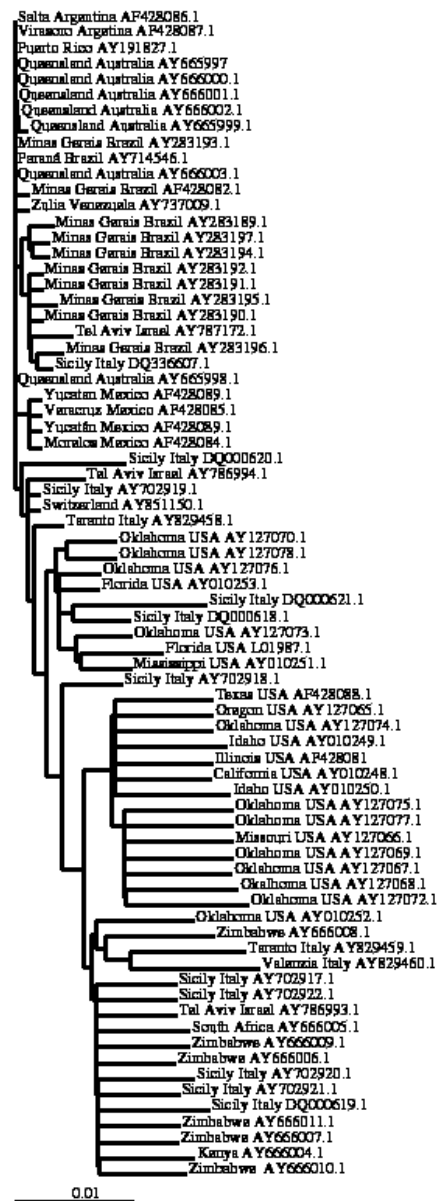


Fig. 6. Phylogenetic tree showing the relationship of *Anaplasma marginale* strains from different geographical locations based on the DNA *msp4* gene sequences deposited in GenBank. Strains were divided according to the country of origin to emphasize geographical distribution. Tree was constructed using the Vector NTI Advance™ 10 Software (bars represent substitutions per 1000 bp; sequence accessions numbers are given after sequence).

Australian strains. This pattern may represent multiple introductions of *A. marginale* strains from different geographical locations, as during the development of the Brazilian cattle industry, animals were imported principally from the USA, Europe and Asia.

Although previous results have indicated that MSP4 is considered as a highly conserved protein and that the analysis

of *msp4* sequences may provide useful phylogenetic and phylogeographic information for New World strains of *A. marginale* (de la Fuente et al., 2001, 2002a, 2003, 2004), a distinct phylogeographical distribution was not observed when *msp4* sequences from PR1 and other regions of the world were analysed (Fig. 6). Similar results were obtained with the analysis of *msp4* sequences, after inclusion of European strains (de la Fuente et al., 2005a). However, the phylogeographical distribution of *A. marginale* strains was better demonstrated and were more uniform by MSP4 gene analysis relative to the MSP1 gene. Additionally, studies have been initiated to obtain more strains of *A. marginale* from diverse regions of Paraná State so that better phylogenetic analyses could be realized across the State.

In conclusion, the analysis of partial *msp1α* DNA sequences, including the tandem 28- to 29-amino acid repeats, did not allow phylogeographical differentiation of Brazilian strains. *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, showed high genetic variability within the tandem repeats of MSP1α, as did strains from other parts of the world. Additionally, phylogeographical segregation of *A. marginale* is better achieved with the MSP4 amino acid sequences than their MSP1α counterparts.

Acknowledgements

We thank Prof. Luiz Carlos J. Gaziri and Prof. J. Stephen Dumler for revising the manuscript, Dr Claudio Roberto Madruga, Dr Joaquim H. Patarroyo, Dr Rosângela Z. Machado and Dr Sergio S. da Silva for providing *A. marginale* strains. This study was supported by CNPq, Fundação Araucária do Paraná and CAPES.

References

- Alderink, F. J., and R. Dietrich, 1981: Anaplasmosis in Texas: epidemiological and economic data from a questionnaire survey. In: Hidalgo, R. J., and E. W. Jones (eds), Proceedings of the Seventh National Anaplasmosis Conference, pp. 27–44. Mississippi State University Press, Starkville, MS.
- Alleman, A. R., G. H. Palmer, T. C. McGuire, T. F. McElwain, L. E. Perryman, and A. F. Barbet, 1997: *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect. Immun.* **65**, 56–163.
- Allred, D. R., T. C. McGuire, G. H. Palmer, S. R. Leib, T. M. Harkins, T. F. McElwain, and A. F. Barbet, 1990: Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3220–3224.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, 1990: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Barbet, A. F., and D. R. Allred, 1991: The *msp1b* multigene family of *Anaplasma marginale* nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect. Immun.* **59**, 971–976.
- Barbet, A. F., G. H. Palmer, P. J. Myler, and T. C. McGuire, 1987: Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* **55**, 2428–2435.
- Bowie, M. V., J. de la Fuente, K. M. Kocan, E. F. Blouin, and A. F. Barbet, 2002: Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cycling transmission between ticks and cattle. *Gene* **282**, 95–102.
- Brown, W. C., T. C. McGuire, W. Mwangi, K. A. Kegerreis, H. Macmillan, H. A. Lewin, and G. H. Palmer, 2002: Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4⁺ T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infect. Immun.* **70**, 5521–5532.
- Callow, L. L., 1984: Animal health in Australia. In: Australian Bureau of Animal Health (ed.), vol. 5, Protozoal and Rickettsial Disease, pp. 121. Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.
- Ferreira, A. M., S. Suzart, O. Vidotto, D. P. Knowles, and M. C. Vidotto, 2001: Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 139–143.
- de la Fuente, J., R. A. van den Bussche, and K. M. Kocan, 2001: Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.* **97**, 65–76.
- de la Fuente, J., R. A. van den Bussche, J. C. Garcia-Garcia, S. D. Rodriguez, M. A. Garci, A. A. Guglielmo, A. J. Mangold, L. M. Passos, M. F. Ribeiro, E. F. Blouin, and K. M. Kocan, 2002a: Phylogeography of new World isolates of *Anaplasma marginale* Rickettsiaceae: Ehrlichieae based on major surface protein sequences. *Vet. Microbiol.* **88**, 275–285.
- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, J. T. Saliki, and K. M. Kocan, 2002b: Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 658–668.
- de la Fuente, J., R. A. van den Bussche, T. M. Prado, and K. M. Kocan, 2003: *Anaplasma marginale msp1α* genotype evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1609–1616.
- de la Fuente, J., L. M. F. Passos, R. A. van den Bussche, M. F. B. Ribeiro, E. J. Facury-Filho, and K. M. Kocan, 2004: Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* **121**, 307–316.
- de la Fuente, J., A. Torina, V. Naranjo, S. Caracappa, J. Vicente, A. J. Mangold, D. Vicari, A. Alongi, S. Scimeca, and K. M. Kocan, 2005a: Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from cattle farms in the province of Palermo, Sicily. *J. Vet. Med.* **52**, 226–229.
- de la Fuente, J., A. Lew, H. Lutz, M. L. Meli, R. Hofmann-Lehmann, V. Shkap, T. Molad, A. J. Mangold, C. Almazán, V. Naranjo, C. Gortázar, A. Torina, S. Caracappa, A. L. García-Pérez, M. Barral, B. Oporto, L. Ceci, G. Carelli, E. F. Blouin, and K. M. Kocan, 2005b: Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* **6**, 75–89.
- Garcia-Garcia, J. C., J. de la Fuente, K. M. Kocan, E. F. Blouin, T. Albur, V. C. Onet, and J. T. Saliki, 2004: 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **98**, 137–151.
- Gonçalves Ruiz, P. M., L. M. F., Passos, M. S. Martins, J. H. Patarroyo, and M. F. B. Ribeiro, 2002: Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. *Vet. Parasitol.* **107**, 169–177.
- Kano, F., O. Vidotto, R. C., Pacheco, and M. C. Vidotto, 2002: Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet. Microbiol.* **87**, 131–138.
- Krueger, C., and G. M. Buening, 1988: Isolation and restriction endonuclease cleavage of *Anaplasma marginale* DNA in situ in agarose. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 906–910.
- Kuttler, K. L., 1984: *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *J. Wildl. Dis.* **20**, 12–20.

- Lew, A. E., R. E. Bock, C. M. Minchin, and S. Masaka, 2002: A *msp1* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.* **86**, 325–335.
- Oberle, S. M., G. H. Palmer, and A. F. Barbet, 1993: Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* **61**, 5245–5251.
- Oliveira, J. B., C. R. Madruga, M. A. M. Schenk, R. H. Kessler, M. Miguita, and F. R. Araújo, 2003: Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**, 395–400.
- Palmer, G. H., G. Eid, A. F. Barbet, T. C. McGuire, and T. F. McElwain, 1994: The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* **62**, 3808–3816.
- Palmer, G. H., F. R. Rurangirwa, and T. F. McElwain, 2001: Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 631–635.
- Palmer, G. H., D. P. Knowles Jr, J. L. Rodriguez, D. P. Gnad, L. C. Hollis, T. Marston, and K. A. Brayton, 2004: Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5381–5384.
- Rickey, E. J., 1981: Bovine anaplasmosis. In: Howard, R. S. (ed.), *Current Veterinary Therapy Food Animal Practice*, pp. 767–772. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Visser, E. S., T. C. McGuire, G. H. Palmer, W. C. Davis, V. Shkap, E. Pipano, and D. P. Knowles, 1992: The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19 kDa protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* **60**, 5139–5144.
- Zaugg, J. L., and K. L. Kuttler, 1985: *Anaplasma marginale* infections in America bison: experimental infection and serologic study. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 438–441.

4. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1. DNA vaccines encoding *Anaplasma marginale* MSPs induced immunogenicity in BALB/c mice

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Research in Veterinary Science*

DNA vaccines encoding *Anaplasma marginale* MSPs induced immunogenicity in BALB/c mice

Abstract

This study evaluated the immunogenicity of DNA vaccines encoding major surface proteins of *Anaplasma marginale* PR1 strain in BALB/c mice. The plasmids pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* and pcDNA-*msp5*, which encode the complete gene of MSP1a, MSP1b, and MSP5 protein under the control of cytomegalovirus enhancer/promoter and intron A, were constructed. The antigens expression and immune response were evaluated by inoculation of these recombinant plasmids in BALB/c mice. Six groups with eight mice each, G1 (100 μ l PBS); G2 (100 μ g *A. marginale* initial bodies + Freund's adjuvants); G3 (100 μ g pcDNA-*msp1 α* + sucrose-phosphate-glutamato-SPG); G4 (100 μ g pcDNA-*msp1 β* + SPG); G5 (100 μ g of pcDNA- *msp1 β* + 2% levamisole) and G6 (100 μ g pcDNA-*msp5* + SPG) were immunized by intramuscular route with three doses each 3 weeks. The immunization of mice with MSP1a and MSP5-DNA vaccine elicited humoral response. ELISA no detected specific IgG against MSP1b in two groups, which received pcDNA-*msp1 β* with SPG or levamisole. However, specific IgG MSP1b were detected in pools of mouse sera by Western blot started after third immunization using rMSP1b. Specific IgG against MSP1a and MSP5 were detected in either by ELISA and Western blot. The results from groups that received pcDNA-*msp1 α* and pcDNA-*msp5* exhibited predominance for IgG2a production, and splenocytes proliferation that suggest that these recombinant plasmids are good candidates for elicited T helper 1 immune response.

Key words: *Anaplasma marginale*, DNA vaccine, BALB/c mice, Immunogenicity, MSPs

Introduction

Anaplasma marginale is an important tick-transmitted rickettsial pathogen of cattle that invades and multiplies within erythrocytes, causing severe hemolytic anemia during acute

infection (Kuttler, 1984). Cattle immunization with outer membrane fraction of *A. marginale* resulted in complete to partial protection after challenging with homologous and heterologous strains (Tebele et al., 1991). Complete protection was associated with development of immunoglobulin G2 (IgG2) responses directed predominantly against antigen specific, and production of interferon gamma (IFN- γ) by antigen specific T cells (Brown et al., 1998; Tuo et al., 2000).

Outer membrane proteins of the erythrocytic stage of *A. marginale* have been the focus of research direct toward an improved vaccine against anaplasmosis (Palmer et al., 1999). Six major outer membrane proteins designed major surface proteins (MSPs) were described in *A. marginale*. MSP1a and MSP1b (MSP1 complex) are important in adhesion and invasion of *A. marginale* in host cells. MSP1a adhere in bovine erythrocytes and tick cells, while MSP1b adhere only in bovine erythrocytes (McGarey et al., 1984; Garcia-Garcia et al., 2004). MSP4 and MSP5 were conserved in different isolates of *A. marginale* in the world (Visser et al, 1992, Oberle et al., 1993, Kano et al., 2002), and MSP5 was useful to diagnostic of bovine anaplasmosis (Knowles et al., 1996, Andrade et al., 2001, Yoshihara et al., 2003). The MSP2 and MSP3 proteins were polymorphic in different isolates and elicited distinct antigens during rickettsemia cycle; the MSP2 showed strong immune response (Eid et al., 1996, Brown et al., 2003).

DNA vaccines were used successfully to raising immune responses humoral and particularly the cell-mediated immunity (CMI), against several pathogens, such as virus, bacteria, parasites, and tumor antigens using diverse animal models (Ulmer et al., 1997; Vercammen et al., 2000; van Drunen Little-van den Hurk et al., 2001, Liao et al., 2006). Furthermore, DNA vaccine demonstrated many advantages over the standard immunization procedure, such as no risk of infection, induction of a long-lived immune response, better stability than live attenuated vaccines, low cost (Donnelly et al., 1997), and specially to

induce strong CMI responses, which can be very effective vaccine against intracellular microorganisms (Doolan & Hoffman, 1997). DNA vaccines can mimic characteristic of live vaccines due to their ability to induce production of microbial antigens in both transiently transfected non-immune cells and antigen-presenting cells in the vaccine inoculation site and nearby draining lymph nodes (Condon et al., 1996, Donnelly et al., 1997, Del Giudice & Rappuoli, 1999).

Mixing adjuvants with DNA vaccines can sometimes enhance their potency. This effect is observed with both conventional adjuvants and experimental immune potentiators that are known to stimulate innate immune responses or facilitate co-stimulation. Chemical adjuvants as levamisole and bupivacaine, and CpG sequence that active cells of innate immune system (Ulmer et al., 2006).

The objective of this work was to evaluate the capacity of the DNA vaccines pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* , and pcDNA-*msp5* induce immunogenicity in BALB/c mice. For pcDNA-*msp1 β* was evaluate two adjuvants, sucrose-phosphate-glutamate (SPG) and levamisole, to elicited immune response.

Materials and Methods

Anaplasma marginale isolate and DNA extract

A. marginale isolate was obtained from infected cattle of Parana State (PR), Brazil, and designed PR1 (Ferreira et al., 2001; Kano et al., 2002). DNA was extracted from stabilate PR1 *A. marginale* using Purigene DNA Extract Kit (Gentra System, Minneapolis, MN, USA) according to manufacture's recommendation.

Construction of the recombinant plasmids

Mammalian expression vector pcDNA3.1/TOPO ((Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to construct DNA vaccines. This vector is designed to promote constitutive expression of cloned DNA inserts in mammalian cells. The three genes encoding the antigens of interest (MSP1a, MSP1b, and MSP5) were amplified by PCR using primers based on complete gene sequence of *A. marginale* obtained of GenBank (accession number AY602768, M59845, and AY714547). At position 5' of the forward primers were included CACC that is complementary sequence of vector pcDNA3.1/TOPO (Invitrogen™ Life Technologies). In the reverse primers were excluded the stop codon. The set of primers for *msp1α* (F: 5'CACCATGTCAGAGTATGTG3' and R: 5'CGCCGCCGCCGCTGCGCC3'), *msp1β* (F: 5'CACCATGACAGAAGACGACAA3' and R: 5'CCTAGACCAACCAGAAGACTGC3'), and for *msp5* (F:5'CACCATGAGAATTTTCAAGATTGTG3' and R:5'AGAATTAAGCATGTGACCGCTG3') were optimizing of the parameters of PCR with the respective targets genes. PCR reagent mixture (50μl) consisting of 20 pmol of each primer, 200 mM deoxynucleotide triphosphates, one unit of *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1.5 mM MgSO₄. The reaction was performed in a Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600 (Norwalk, CT) with the following time and temperature conditions: one step of 5 min/94 °C; followed by 35 cycles of 1 min/94 °C, 1 min/60 °C, 1 min/68 °C, and a final step of 7 min/68 °C for *msp1α* gene, and 5 min/94 °C followed by 35 cycles of 1 min/94 °C, 1 min/58 °C, 1 min/68 °C and a final step of 7 min/68 °C for *msp1β* and *msp5* genes.

The products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), ethidium bromide (0,5 μg/ml) stained, and visualized under UV light. The fragments were purified for cloning by QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

The *msp1 α* , *msp1 β* and *msp5* genes were cloned into pcDNA3.1/TOPO as manufacturer's instructions (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). After, One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli* was transformed with 3 μ l of the cloning reaction. The bacterial culture was spread on Luria Bertani (LB) agar (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl and 1.5% agar, pH 7.0) containing ampicillin (100 μ g/ml). The isolate colony was cultured in LB broth to extract plasmids using Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

The presence of inserts in recombinant plasmids from transformed colonies was confirmed by PCR assay using primers of full-length fragment of the genes. Furthermore, the correct in frame orientation of genes was confirmed by sequencing by Mega Bace 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The quality of each sequence obtained was analysed with Phred/Phrap/Consed Analysis Program (www.phrap.org) and the sequence identity was verified with sequences deposited in the GenBank using BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Production of DNA vaccines

Large scales culture of TOP10 *E. coli* containing recombinant plasmids were growing in LB broth at 37 °C, and the Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used to prepare DNA. The recombinant plasmids were quantified by spectofotometry measuring the optical density at 280 nm.

Production of recombinant MSPs proteins

The recombinant plasmids pET101-*msp1 α* , pET101-*msp1 β* (Tamekuni et al., 2006) and pRSET-*msp5* (Marana et al., 2006) were used to produce recombinants MSP1a, MSP1b

and MSP5 as a fusion product with 6xHis. The rMSP1a, rMSP1b and rMSP5 were purified using Ni-NTA resin according to the supplier's instructions (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Animal and experimental design

Four to six weeks old female BALB/c mice were randomly distributed into six experimental groups with eight animals each. The mice were kept in conventional animal facilities and received water and food *ad libitum*, and used under animal protocols approved by the Institutional Research Committee (process number 26927/05).

Mice were anaesthetized prior following the injected with 100 µg of recombinant plasmids in sucrose-phosphate-glutamate (SPG) buffer (Dong-Ji et al., 2000) or levamisole for pcDNA-*msp1β* in each leg muscle. Six groups were formed: G1- negative control (100 µl phosphate buffered saline (PBS); G2- positive control (100 µg *A. marginale* PR1 strain initial bodies + Freund's adjuvant); G3- (100 µg pcDNA-*msp1α* + SPG); G4- (100 µg pcDNA-*msp1β* + SPG); G5- (100 µg pcDNA-*msp1β* + 2% levamisole); G6 (100 µg pcDNA-*msp5* + SPG). In the positive control group, the BALB/c mice were inoculated with 100 µg PR1 *A. marginale* initial bodies emulsified with complete Freund's adjuvant, and following two immunizations with incomplete Freund's adjuvant. The mice were vaccinated at weeks 0, 3, 6 weeks and blood samples were collected at weeks 0, 3, 6, and 9. The sera samples were stored at – 20 °C until analysis.

Antibody assays and isotypes

Optimal dilutions were established using check board titrations with dilutions of sera and conjugates. ELISA plates (Nunc-Immuno™ Maxisorp, Roskilde, Denmark) were coated with 100 µl of the rMSP1a (5µg/ml) for G3; rMSP1b (5 µg/ml) for G4 and G5; rMSP5 (5µg/ml) for G6; pool of rMSPs (5µg/ml) for G1 and G2. After overnight incubation at 4 °C,

samples of serum from mice immunized groups were diluted 1:50 in PBS-Tween 20 pH 7.4 plus 5% non-fat dry milk. Then, diluted samples were added in duplicate to each well, and the plates were incubated at 37 °C for 45 min. Positive and negative control sera were included in each plate. Conjugates were used. Peroxidase-labeled anti mouse whole anti-IgG (Sigma) (1:10.000), anti-mouse IgG1, and IgG2a horseradish peroxidase conjugate (1:50.000). The substrate for the enzyme was OPD (*ortho*-phenylenediamine) 0.4 mg/ml, in H₂O₂ 0.04% in substrate buffer (0.1M acid citric, 0.2M Na₂HPO₄). The reaction was stopped with 50 µL of 1N HCl. The absorbance values were average and the optic density (OD) values were calculated as previously described (Garcia *et al.*, 2006).

Western blot analysis

rMSP1a (G3), rMSP1b (G4 and G5), rMSP5 (G6), and whole antigens of *E. coli* BL21 (all the groups) were electrophoresed on 7.5-17.5% gradient SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane, 0.45 µm (Hybond-ECL™, Amershan Biosciences UK Limited), as previously described (Towbin and Gordon, 1984). After transfer, the nitrocellulose membrane was blocked (7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl and 5% non-fat dried milk) for 1 h at room temperature. After washing, strips of nitrocellulose membrane were incubated with pre immune and post immune pool sera of mice from each group (G1 to G6) diluted 1:50 in a blocking solution. After washing, strips were incubated with peroxidase-labeled protein G (1:5.000), and incubated for 1 h at room temperature. The peroxidase activity was revealed using enhanced chemiluminescence (ECL) (Amershan International, Amershan, UK). Protein molecular weight markers (BenchMark™ Invitrogen Life Technologies, USA) were used as standard.

Statistical analysis

The OD results from IgG2a and IgG1 were compared by ANOVA test, using GraphPad Prism statistical package, a P-value of ≤ 0.05 was considered as significant.

Lymphocyte proliferation

Female BALB/c mice immunized with recombinant plasmids and mice from control groups were sacrificed three weeks after the last immunization. Single-cell suspension was prepared from spleens for each group (Bonenfant et al., 2001). The splenocytes were culture in microtiter, in triplicate wells at 2×10^5 cells/well, in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2mM glutamine, 0.05 mM 2-mercaptoetanol and 100 U/ml penicillin-streptomycin). The culture was stimulated with one of the following: 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of Con A (positive control) (type IV, Sigma), PBS for negative control and 10 $\mu\text{g/ml}$ of the rMSP1a for G3, rMSP1b for G4 and G5, rMSP5 for G6, and a pool of recombinant proteins for G2. The culture were maintained at 37 °C with 5% CO₂. To quantity cell proliferation, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit, Molecular Probes) was prepared at 12 mM in PBS pH 7.2 and 10 μl of the solution were added to each well in culture after 72 h. The plates with MTT were incubated for 4h at 37 °C. After labbing the cells with MTT, 50 μl of DMSO was added and incubate for 10 min at 37 °C. The plates were read absorbance at 540 nm by plate reader. The Stimulation Index (SI) was calculated as the triplicate of stimulated cells (cells + Ag) divided by the cell control (cell + RPMI). An SI ≥ 2 was considered significant.

Results

A. marginale DNA vaccine construction

The vaccines were constructed with the recombinant plasmids designated pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5*. The expected fragment lengths of the *msp1α*, *msp1β* and *msp5* genes were amplified by PCR assay from recombinant plasmids, pcDNA- *msp1α*, pcDNA- *msp1β*, and pcDNA-*msp5*, using specific set of primers for each gene. The expected fragment lengths amplified were 2.2, 2.0 and 0.6 kb for *msp1α*, *msp1β*, and *msp5* genes, respectively (Fig.1). Sequencing demonstrated the correct insertion of genes into pcDNA vector and demonstrated identity with *msp1α*, *msp1β* and *msp5* sequences using BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Humoral Immune response of mice elicited by DNA vaccination

Serological responses were evaluated through the immunizations by ELISA and Western blot. The whole IgG production in mice is shown in Fig.2. All pre-immune and control group sera (G1) were considered negative (reacted below cut-off). G2 showed seroconversion after second immunization and maintained stable through the experiment. In G3 and G6 groups seroconversion started after second immunization, but only after third immunization all animals were positive for specific rMSP1a and rMSP5 proteins. In contrast, in mice sera from G4 and G5 no seroconversion was observed by ELISA through the experimental weeks.

The IgG1 and IgG2a responses against MSP1a, MSP1b and MSP5 from vaccinated BALB/c mice at 0, 3, 6 and 9 weeks after immunization are shown in figure 3. The IgG isotype humoral response demonstrated IgG2a isotype polarization for G3 and G6 groups that were immunized with pcDNA-*msp1α* and pcDNA-*msp5*, respectively. In contrast, mice immunized with *A. marginale* proteins emulsified in Freund's adjuvants (G2) demonstrated predominance for IgG1 isotype, and the IgG1 polarization at weeks 6 and 9 was significant ($p < 0.05$). The IgG2a isotype was predominant for mice immunized with MSP5-DNA and MSP1a-DNA vaccine after third immunization ($p < 0.05$).

Western blot results using pool of sera are shown in Fig.4. Sera from mice immunized with pcDNA-*msp1* β + SPG (G4) and pcDNA-*msp1* β + 2% levamisole (G5) reacted with 100 kDa (rMSP1b). Moreover, sera from mice immunized with pcDNA-*msp1* α (G3) reacted with 70-105 kDa and pcDNA-*msp5* (G5) reacted at 31 kDa (rMSP5). Mice sera from positive control group (G2) demonstrated reaction with rMSP1a, rMSP1b and rMSP5 (data not showed). All pre-immune sera, and sera post immune of mice from G1 (negative control) did not show any reaction.

Cellular Immune response of mice elicited by DNA vaccination

The lymphoproliferation of spleen cells from mice immunized with pcDNA-*msp1* α and pcDNA-*msp5* was significant (SI \geq 2). In mice immunized with pcDNA-*msp1* β did not show any proliferation (SI < 2) in both G4 and G5, with SPG and levamisole used as adjuvant. No proliferation was verified in assay with spleen cells from G1 and G2 (Fig.5).

Discussion

The protective immune mechanism against bovine anaplasmosis has been associated with both neutralizing and opsonizing IgG antibody and IFN- γ mediated activation of phagocytes (Cantor et al., 1993, Brown et al., 2003). Epitopes from MSP1 complex are important for elicited CD4⁺ T-cell response and humoral responses, and to induce protective immunity against *A. marginale* challenge (Brown et al., 2001). The native MSP1 is naturally processed for T-cell epitope presentation by antigen presentation cells (APC) that initiate IFN- γ -producing CD4⁺ T-cell responses (Brown et al., 2002)

Immunization with DNA plasmids encoding for the antigen of interest represents a novel and promising method in vaccine research and development. Studies have demonstrated

that after naked DNA immunization, the antigen is naturally processed and presented on major histocompatibility complex class I and class II molecules, inducing a broad range of immune responses including antibody production, CD4⁺ T helper cell activation, and CD8⁺ cytotoxic T cells (CTLs) (Donnelly et al., 1997, Ulmer et al., 1993, Nagata et al., 2004).

Few works with *A. marginale* DNA vaccine have been related and the DNA vaccines to MSP1a and MSP1b have induced immune responses both BALB/c mice and calves (Arulkanthan et al., 1999; Andrade et al., 2004).

In the present work, immunization of BALB/c mice with pcDNA-*msp1α* (G3) and pcDNA-*msp5* (G4) elicited specific antibodies for MSP1a and MSP5 of *A. marginale* after third immunization. The mice immunized with pcDNA-*msp1β* (G4 and G5) no elicited response in ELISA using rMSP1b, although, mice sera from these groups strongly reacted with specific rMSP1b (100 kDa) in Western blot. It's need further investigation.

The MSP1b is an important MSP that is associated with MSP1a in the native protein through disulfide bonds (Vidotto et al., 1994). It presents variable regions with variant specific epitopes that bind to different erythrocyte receptors (Camacho-Nuez et al., 2000). After immunization of cattle with complex MSP1, all calves developed high titers of IgG antibodies to both MSP1a and MSP1b polypeptides, although CD4⁺ T-cell responses were reproducibly detected only against MSP1a (Brown et al., 2001). The authors suggested that MSP1a-specific T cells provide cognate help to both MSP1b specific B cells and MSP1a-specific B cells.

In this work, mice immunized with pcDNA-*msp1α* encoding MSP1a and pcDNA-*msp5* encoding MSP5 of *A. marginale* exhibited predominance of IgG2a antibody over IgG1 (p<0.05). The presence of the IgG2a isotype is often considered as evidence of a Th1 immune response (Oñate et al., 2003). Additionally, the protection against infection by an intracellular pathogen, including *Anaplasma*, requires the generation of a Th1 immune response over time

(Brown et al., 1998, Oñate et al., 2003, Nagata et al., 2004). Thus, our results suggest that intramuscular injection of plasmids encoding MSP1a and MSP5 generate a response biased towards a Th1 response in mice, and could be used in the immunization of cattle.

In contrast, the G2 elicited IgG1 production five times higher than IgG2a. This is due the antigens associated with Freund's adjuvant that preferentially stimulate the Th2 immunity and vigorously suppress the Th1 type (Yip et al., 1999).

The route of DNA immunization and the cellular localization of the expressed protein affect the type of immune response generated (Morel et al., 2004). In general, DNA immunization by intramuscular injection induces Th1 responses, whereas gene gun immunization into the skin stimulates Th2 responses. However, it has been demonstrated that gene gun immunization of mice with plasmid encoding cytoplasmic or transmembrane viral antigens resulted strong Th1/CLT responses (Morel et al., 2004). The plasmid synthesizing the Japanese encephalitis virus envelope protein injected as the naked DNA induced distinct Th1 type of immune responses as evidenced by the preponderance of IgG2a antibodies (Kaur et al., 2004).

The failure of DNA vaccine to induce a potent immune response can be attributed by low levels of antigen production and inefficient stimulation of the innate immune system (Ulmer et al., 2006). Different adjuvants with immunomodulatory and carrier properties have been used together with DNA vaccine (Lima et al., 2004). The predominance of Th1 stimulatory activity determined by IgG2a production was reached when levamisole were used as chemical adjuvant on DNA vaccination for foot and mouth diseases virus (Jin et al. 2004). However, in our experiments, the results of use of levamisole and SPG with pcDNA-*msp1β* was not conclusive, because the rMSP1b was not detected by antibodies from sera immunized mice, by ELISA.

In conclusion, the immunization of mice with plasmids encoding MSP1a and MSP5 induced Th1 immune response, predicted by IgG2a production, which stimulates its use in immunization of cattle.

Acknowledgments

We wish to thank Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley for revising the manuscript. This work was financially supported by CNPq, CAPES, and Fundação Araucária do Paraná.

References

- Andrade, G.M., Vidotto, O., Vidotto, M.C., Yoshihara, E., Kano, F.S., Amaral, C.H., 2001. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* **22**, 155-160.
- Andrade, G.M., Machado, R.Z., Vidotto, M.C., Vidotto, O., 2004. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1026**, 257-266.
- Arulkanthan, A., Brown, W., McGuire, T.C., Knowles, D.P., 1999. Biased Immunoglobulin isotype response induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **67**, 3481-3487.
- Bonenfant, C., Dimier-Poisson, I., Velge-Roussel, F., Buzoni-Gatel, D., Rappuoli, R., Bout, D., 2001. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* **69**, 1605-1612.
- Brown, W.C., Shakh, V., Zhu, D., McGuire, T.C., Tuo, W., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 1998. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infection and Immunity* **66**, 5406-5413.
- Brown, W.C., Palmer, G.H., Lewin, H.A., McGuire, T.C., 2001. 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* **69**, 6853-6862.

Brown, W.C., McGuire, T.C., Mwangi, W., Kegerreis, K.A., Macmillan, H., Lewin, H.A., Palmer, G.H., 2002. 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* **70**, 5521–5532.

Brown, W.C., Brayton, K.A., Styer, C.M., Palmer, G.H., 2003. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4⁺ T lymphocytes epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. *The Journal of Immunology* **170**, 3790-37.

Camacho-Nuez, M., Mun'oz, L., Suarez, C.E., McGuire, T.C., Brown, W.C., Palmer, G.H., 2000. Expression of polymorphic *msp1b* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and Immunity* **68**, 1946-1952.

Cantor, G.H., Pontzer, C.H., Palmer, G.H., 1993. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **37**, 343–350.

Condon, C., Watkins, S.C., Celluzzi, C.M., Thompson, K., Falo, D.J., 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Medicine* **2**, 1122-1128.

Del Giudice, G., Rappuoli, R., 1999. Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants. *Vaccine* **17**, S44-S52.

Dong-Ji, Z., Yang, X., Shen, C., Lu, H., Murdin, A., Brunham, R.C., 2000. Priming with *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein (MOMP) DNA followed by MOMP ISCOM boosting enhances protection and is associated with increased immunoglobulin A and Th1 cellular immune responses. *Infection and Immunity* **68**, 3074-3078.

Donnelly, J.J., Ulmer, J.F., Shiver, J.W., Liu, M.A., 1997. DNA vaccines. *Annual Review of Immunology* **15**, 617-648.

Doolan, D.L., Hoffman, S.L., 1997. Multi-gene vaccination against malaria: A multistage, multi-immune response Approach. *Parasitology Today* **13**, 171-178.

Eid, G., French, D.M., Lundgren, A.M., Barbet, A.F., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 1996. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute rickettsemia. *Infection and Immunity* **64**, 836.

- Ferreira, A.M.T., Suzart, S., Knowles, D.P., Vidotto, M.C., 2001. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. FEMS microbiology letters **197**, 139-143.
- Garcia, J.L., Navarro, I.T., Vidotto, O., Gennari, S.M., Machado, R.Z., Sinhorini, I.L., 2006. *Toxoplasma gondii* comparison of rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. Experimental Parasitology **113**, 100- 105.
- Garcia-Garcia, J., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Albur, T., Onet, V.C., Saliki, J.T., 2004. 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 **98**, 137-151.
- Jin, H., Li, Y., Ma, Z., Zhang, F., Xie, Q., Gu, D., Wang, B., 2004. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. Vaccine **22**, 2925-2935.
- Kano, F.S., Vidotto, O., Pacheco, R.C., Vidotto, M.C., 2002 Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. Veterinary Microbiology **87**, 131-138.
- Kaur, R., Rauthan, M., Vрати, S., 2004. Immunogenicity in mice of a cationic microparticle-absorbed plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein. Vaccine **22**, 2776-2782.
- Knowles, D.P., de Echaide, T., Palmer, G., McGuire, T.C., Stiller, D., McElwain, T.F., 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. Journal Clinical Microbiology **34**, 2225-2230.
- Kongkasuriyachai, D., Andrews, L.B., Stowers, A., Collins, W.E., Sullivan, J., Sattabongkot, J., Torii, M., Tsuboi, T., Kumar, N., 2004. Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 – evolution of homologous and heterologous antigen-delivery prime-boost strategy. Vaccine **22**, 3205-3213.
- Kuttler K.L., 1984. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. Journal Wild Disease **20**, 12-20. 334.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680 – 685.

- Liao, J.C.F., Gregor, P., Wolchok, J.D., Orlandi, F., Craft, D., Leung, C., Houghton, A.N., Bergaman, P.J., 2006. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibodies responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immunity* **6**, 2-10.
- Lima, K. M., Santos, S.A., Rodrigues Jr., J.M., Silva, C.L., 2004. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine* **22**, 2374–2379.
- Marana, E.R.M., Kano, F.S., Tamekuni, K., Ataliba, A.C., Vicentini, J.C., Spurio, R.S., Vidotto, M.C., Vidotto, O., 2006. Padronização e avaliação de um teste de ELISA por competição para o diagnóstico da anaplasiose bovina utilizando a proteína recombinante MSP5-PR1. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, *Anais...*, **5**, Ribeirão Preto, SP.
- McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Allred, D.R., 1984. Putative adhesions of *Anaplasma marginale* major surface polypeptides 1a and 1b. *Infection and Immunity* **62**, 4594-4601.
- Morel, P.A., Falkner, D., Plowey, J., Larregina, A.T., Falo Jr, L.D., 2004. DNA immunization altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. *Vaccine* **22**, 447-456.
- Nagata, T., Aoshi, T., Uchima, M., Suzuki, M., Koide, Y., 2004. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper-T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology* **23**, 93-106.
- Oberle, S.M., Palmer, G.H., Barbet, A.F., 1993. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **61**, 5245-5251.
- Oliveira, J.B., Madruga, C.R., Kessler, R.H., Migueta, M., Araújo, F.R., 2003. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 395-400.
- Oñate, A.A, Céspedes, S., Cabrera, A., Rivers, R., González, A., Muñoz, C., Folch, H., Andrews, E.A., 2003. DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **71**, 4857-4861.

Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., Brown, W.C., 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today* **15**, 281-286.

Tamekuni, K., Kano, F.S., Kawasaki, P.M., Igarashi, M., Ataliba, A.C., Coelho, A.L.M., Marana, E.R.M., Vidotto, M.C., Vidotto, O., 2006. Cloning, sequencing and antigenic characterization of Msp1a and Msp1b recombinant proteins of the *Anaplasma marginale* PR1 strain. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, *Anais...*, **5**, Ribeirão Preto, SP.

Tebele, N., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity* **59**, 3199-3204.

Towbin, H., Gordon, H., 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and out look. *Journal of Immunological Methods* **72**, 313-340.

Tuo, W., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Zhu, D., Brown, W., 2000. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type I cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **68**, 270-280.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **253**, 1745-1749.

Ulmer, J.B., Liu, M.A., Montgomery, D.L., Yawman, A.M., Deck, R.R., DeWitt, C.M., 1997. Content J. Expression and immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 by DNA vaccination. *Vaccine* **15**, 792-794.

Ulmer, J.B., Wahren, B., Liu, M.A., 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *TRENDS in Molecular Medicine* **12**, 216-222.

van Drunen Little-van den Hurk, S., Loerh, B.I., Babiuk, L.A., 2001. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine* **19**, 2474-2479.

Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., Verchueren, H., 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and Immunity* **68**, 38-45.

Vidotto, M.C., McGuire, T.C., McElwain, T.F., Palmer, G.H., Knowles Jr, D.P., 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **62**, 2940-2946.

Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Shkap, V., Pipano, E., Knowles, D.P., 1992. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity* **60**, 5139-5144.

Yip, H.C., Karulin, A.Y., Tary-Lehmann, M., Hesse, M.D., Radeke, H., Heeger, P.S., Trezza, R.P., Heinzl, P., Forsthuber, T., Lehmann, P.V., 1999. Adjuvant-Guided type 1 and type 2 immunity: Infections/noninfection dichotomy defines the class of response. *The Journal of Immunology* **162**, 3942-3949.

Yoshihara, E., Vidotto, O., Yamamura, M.H., Marana, E.R.M., Pacheco, R., Silveira, A.P., 2003. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in Nelore cattle in the Umuarama municipality, Parana State. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **12**, 21-26.

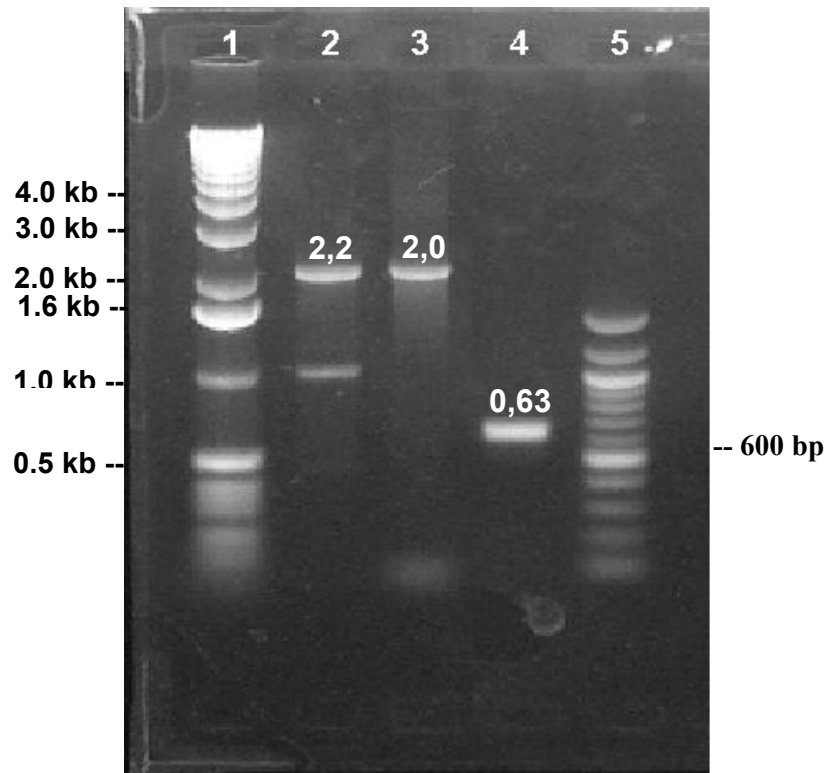


Figure 1. Amplification of *msp1α*, *msp1β* and *msp5* genes of *A. marginale* using pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5* as template by PCR using specific primers for each full length gene. Lane 1: 1 kb leader; Lane 2: *msp1α* amplified from pcDNA-*msp1α*; Lane 3: *msp1β* gene amplified from pcDNA-*msp1β*; Lane 4: *msp5* gene amplified from pcDNA-*msp5*; Lane 5: 100 bp ladder.

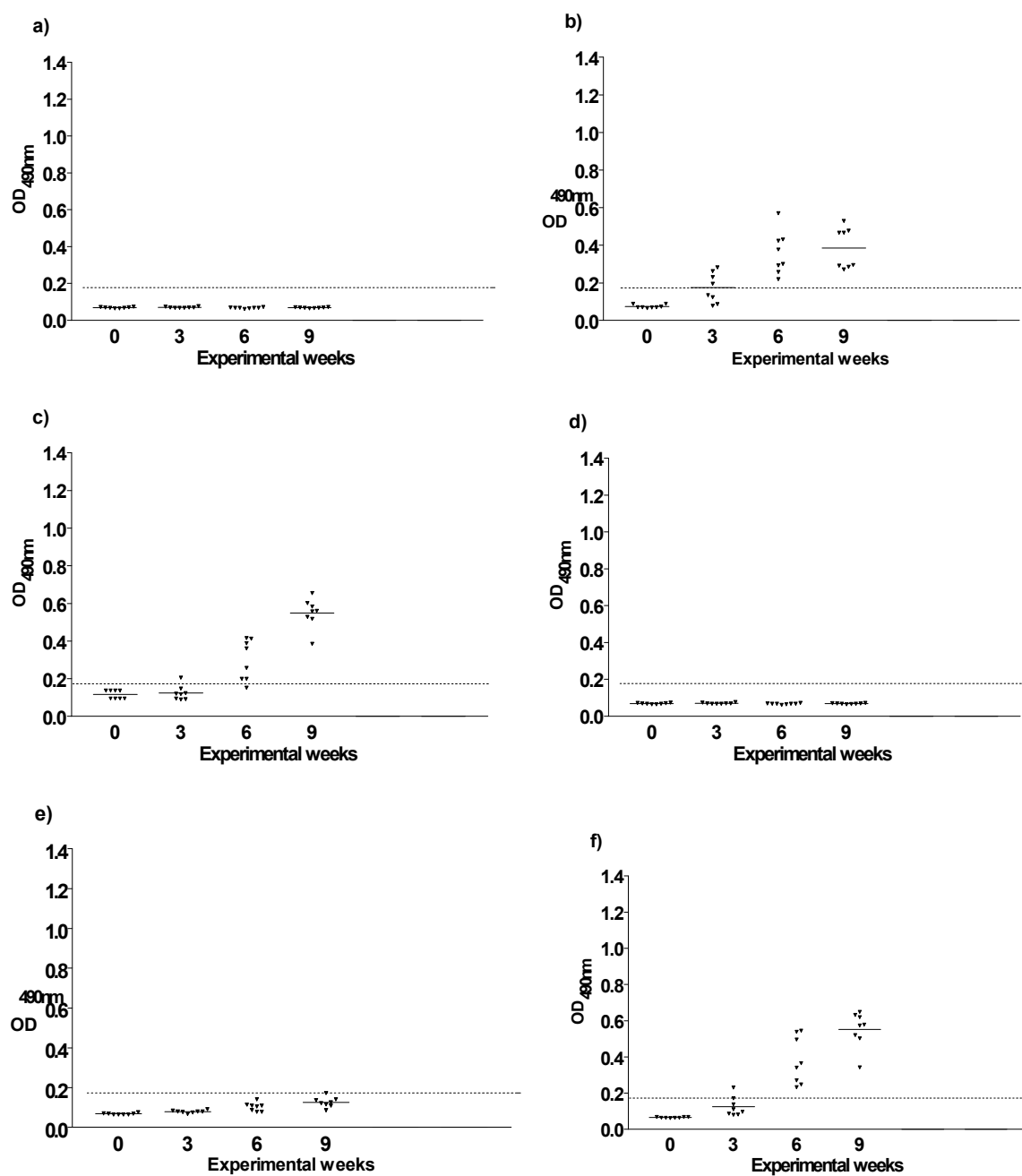


Figure 2. IgG antibody response measured by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in BALB/c mice of the (a) G1 (100 μl phosphate buffered saline-PBS), (b) G2 (100 μg initial bodies *A. marginale*), (c) G3 (100 μg pcDNA-*msp1α*), (d) G4 100 μg pcDNA-*msp1β* + sucrose-phosphate-glutamato-SPG), (e) G4 (100 μg pcDNA-*msp1β* + 2% levamisole), (f) G5 (100 μg pcDNA-*msp5* + SPG). Mice were immunized at weeks 0, 3, and 6; Blood was collect at weeks 0, 3, 6, and 9. Dashed line indicates positive cut-off.

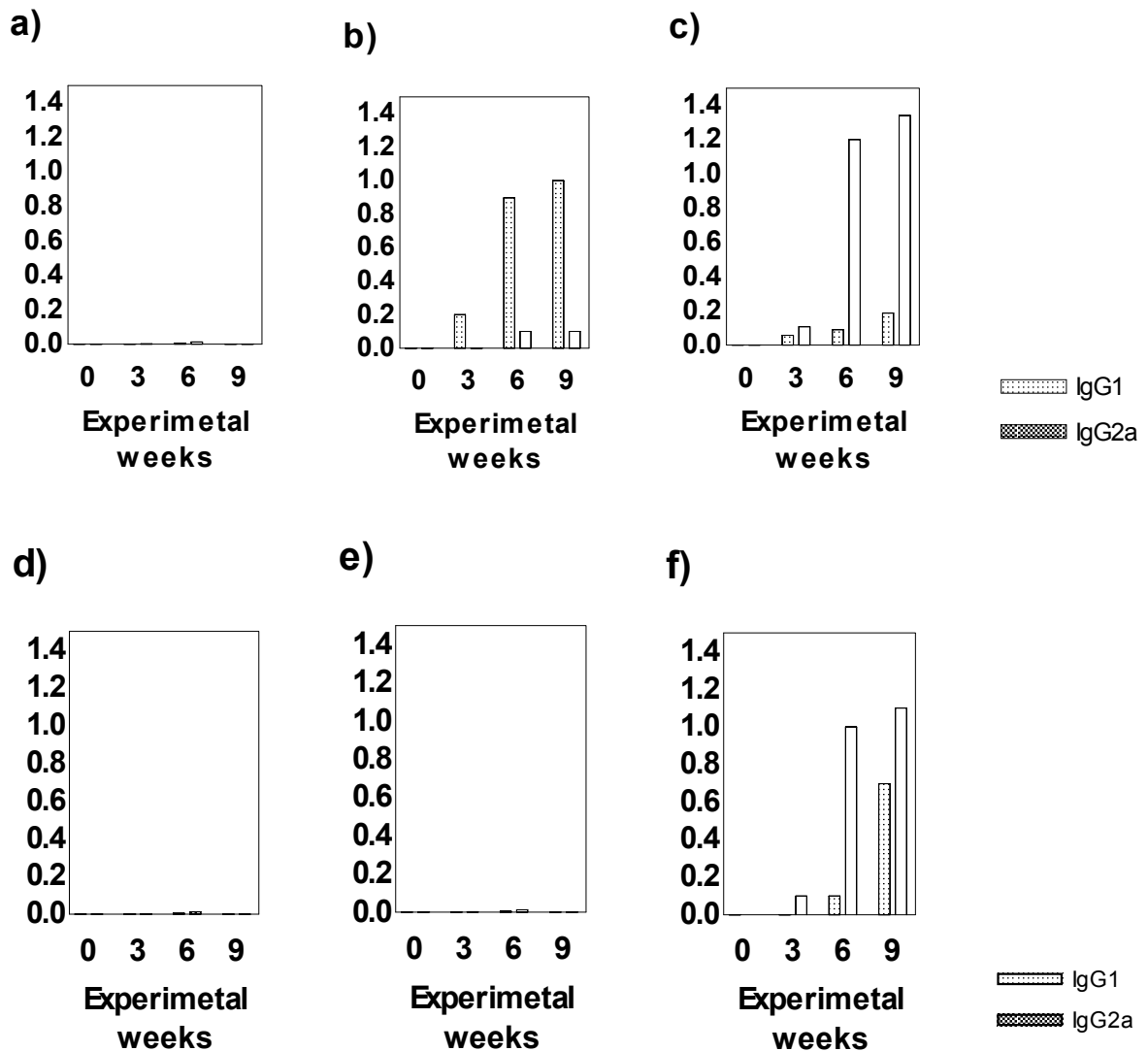


Figure 3. Humoral responses of serum IgG isotype from BALB/c mice immunized with DNA-vaccine encoding *A. marginale* MSP1a, MSP1b, and MSP5 proteins. Pool of serum taken 0, 3, 6 and 9 weeks after initial immunization were analyzed by ELISA. (a) G1 (phosphate buffer saline-PBS), G2 (100 µg initial bodies *A. marginale* + Freund's Adjuvant), (c) G3 (100 µg pcDNA-*msp1a* + sucrose phosphate glutamate-SPG), (d) G4 (100 µg pcDNA-*msp1b* + SPG), (e) G4 (100 µg pcDNA-*msp1b* + 2% levamisole) and (f) G5 (100 µg pcDNA-*msp5* + SPG).

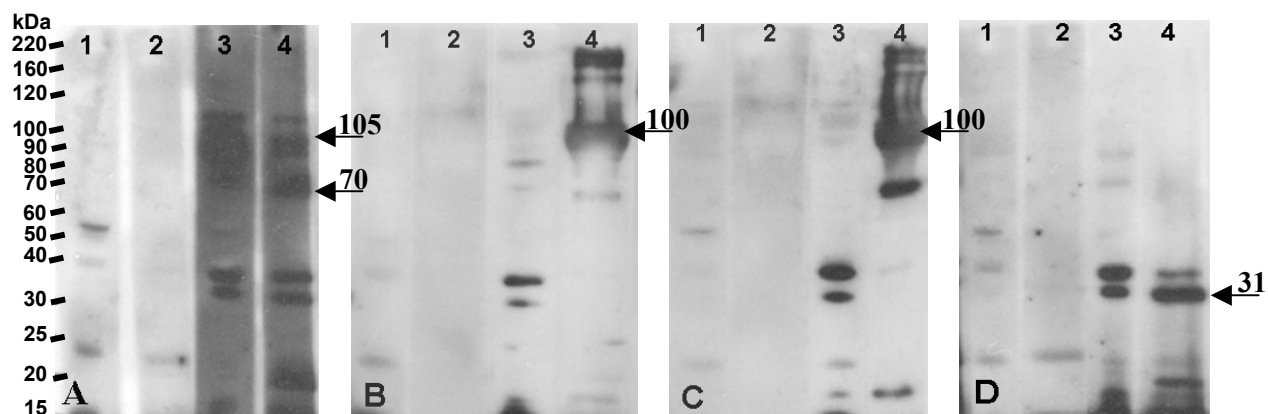


Figure. 4: Reactivity of sera from mice immunized with DNA vaccines encoding MSP1a, MSP1b and MSP5 by Western blot. Serologic analysis was developed with a pool of six groups antisera at weeks 0 and 9 from mice immunized in experimental study. Lanes 1 and 2 represents pre immune sera. Lanes 3 and 4: post immune sera at week 9. (A) G3 - pcDNA-*msp1α* + SPG (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP1a). (B) G4 - pcDNA-*msp1β* + SPG (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP1b). (C) G5 - pcDNA-*msp1β* + levamisole 2% (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP1b). (D) G6 - pcDNA-*msp5* + SPG (lanes 1 and 3: BL21 *E. coli*; lanes 2 and 4: rMSP5). The positions and molecular masses (in kilodaltons) of protein standarts are also shown.

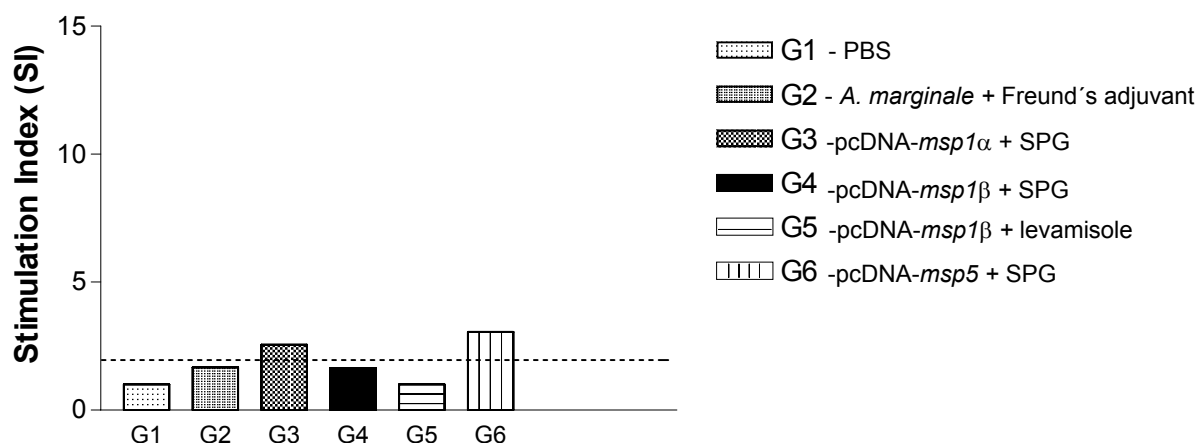


Figure 5. *In vitro* proliferation of splenocytes from DNA-vaccinated BALB/c mice after stimulation of rMSP1b and rMSP5, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added for 4 h. The incorporated MTT cell was then measured. Control splenocytes from mice received the PBS. For comparative purposes, splenocytes from no immunized BALB/c mice were included in the experiment. Stimulation Index (SI) values higher than 2.0 (dashed line) was considered significant.

4.2. Enhanced immunogenicity of DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale* in association

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Research in Veterinary Science*

Enhanced immunogenicity of DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale* in association

Abstract

Immunization with DNA plasmids encoding for the antigen of interest represents a novel and promising method in vaccine research and development. Multiepitope DNA vaccine is a new experience to increase immunogenicity and protection for vaccinated animal as compared in single epitope. This study evaluated the capacity of the recombinant plasmids to express MSP1a, MSP1b, and MSP5 in eukaryotic cells *in vitro*, and the immunogenicity in BALB/c mice immunized with recombinant plasmids individually or in association. Recombinant plasmids used were pcDNA-*mSP1α*, pcDNA-*mSP1β*, and pcDNA-*mSP5*, multiplied in TOP10 *E. coli*, and purified. Expression of MSP1a, MSP1b, and MSP5 *in vitro* was performed into Vero cells using lipofectamine 2000, following Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) using monoclonal antibodies. Seven experimental groups of mice were immunized to evaluate the production of whole IgG and to determinate IgG1 and IgG2a isotype: G1-100 μl PBS; G2-100 μg empty vector + SPG; G3-100 μg *A. marginale* initial bodies + Freund's adjuvant; G4-100 μg pcDNA-*mSP1α* + SPG; G5-100 μg pcDNA-*mSP1β* + SPG; G6-100 μg pcDNA-*mSP5* + SPG; and G7-pool of recombinant plasmids + SPG (33 μg for each). Three weeks after the last immunization, mice were sacrificed to evaluate spleen cells proliferation. Vero cells transfected with recombinant plasmids reacted with specific monoclonal antibodies, demonstrating the expression of *mSP* genes. The G3 (*A. marginale*) showed seroconversion after second immunization and the groups G4 (MSP1a), G6 (MSP5) and G7 (pool) showed seroconversion after third immunization. The G5 (MSP1b) showed the lost seroconversion after fifth immunization. The IgG2a/IgG1 ratios demonstrated IgG2a isotype polarization in all groups immunized with DNA vaccines, and G3 demonstrated predominance for humoral IgG1 isotype. The association of three recombinant plasmids (pcDNA-*mSP1α*, pcDNA-*mSP1β* and pcDNA-*mSP5*) in the immunization of mice showed high antibodies response by ELISA and reacted with all recombinant proteins (rMSP1a, rMSP1b, and rMSP5) of *A. marginale* by Western blot. Also, when the recombinant plasmids were administered in combination, the strong enhancer lymphoproliferation was observed (SI = 12,2), whereas the genes to MSP1a provide significant splenocytes (SI = 2,6) and the genes to MSP1b and MSP5 did not provide significant proliferation (SI < 2). These

results demonstrated that no suppression was observed when these recombinant plasmids were used in association could generate significant T-cell lymphocyte. Thus, the immunization with recombinant plasmids encoding MSPs in association can be an effective strategy for immunoprophylaxis of anaplasmosis.

Key words: *Anaplasma marginale*, DNA vaccine, Vero cells, BALB/c mice, Immunogenicity

Introduction

Outer membrane proteins of *Anaplasma marginale* have been the focus of research direct toward an improved vaccine against bovine anaplasmosis (Palmer et al., 1999). Immunization with purified outer membranes induces protection against acute *A. marginale* infection and disease (Tebele et al., 1991). Various major outer membranes have been described after proteomic and genomic approach and were identified 21 proteins within the outer membrane immunogen (Lopez et al., 2005). Some outer membranes proteins well characterized and designed major surface proteins (MSPs): MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 and MSP5 and evaluated candidates as antigen for vaccine and diagnostic test (McGarey et al., 1984; Visser et al., 1992; Oberle et al., 1994; Alleman and Barbet, 1996; Kano et al., 2002; Garcia-Garcia et al., 2004).

Immunization with DNA plasmids encoding for the antigen of interest represents a novel and promising method in vaccine research and development. Studies have demonstrated that after naked DNA immunization, the antigen is naturally processed and presented on major histocompatibility complex class I and class II molecules, inducing a broad range of immune responses including antibody production, CD4⁺ T helper cell (Th1), and CD8⁺ cytotoxic T cells (CTLs) (Ulmer et al., 1993, Donnelly et al., 1997, Nagata et al., 2004). Incorporation of multiepitope in DNA immunization consisting new experience to increase immunogenicity and protection for vaccinated animal as compared in single epitope (Morris et al., 2000).

Immunization against anaplasmosis with single DNA vaccine (pVCL/*msp1 α*) developed antibodies against MSP1a protein in mice and calves (Arulkanthan et al., 1999). In another experiment, immunization with pcDNA-*msp1 β* elicited antibodies and cattle immunized showed partial protected against a virulent homologous challenge.

The aimed of the present work was to evaluate the capacity of the recombinant plasmids to express MSP1a, MSP1b, MSP5 in eukaryotic cells *in vitro*, and the immunogenicity in BALB/c mice immunized with these recombinant plasmids individually or in combination.

Materials and Methods

Anaplasma marginale isolate and DNA extract

A. marginale isolate was obtained from infected cattle of Paraná State (PR), Brazil, and designed PR1 (Ferreira et al., 2001; Kano et al., 2002). DNA was extracted from stablate PR1 *A. marginale* using Purigene DNA Extract Kit (Gentra System, Minneapolis, MN, USA) according to manufacture's recommendation.

Production of DNA vaccines

The recombinant plasmids (pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* , pcDNA-*msp5*) were construct in previously study for our group (unpublished). Large scales culture of TOP10 *E. coli* containing recombinant plasmids were growing in LB broth at 37 °C, and the Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used to prepare DNA. The recombinant plasmids were quantified using by spectofotometry measuring the optical density at 280 nm.

Production of recombinant MSPs proteins

The recombinant plasmids pET102-*msp1* α , pET101-*msp1* β (Tamekuni et al., 2006), pRSET-*msp5* (Marana et al., 2006) were used to produce recombinant MSP1a, MSP1b, and MSP5 as a fusion product with 6xHis. The rMSPs were purified using Ni-NTA resin according to the supplier's instructions (Qiagen, Valencia, CA, USA).

In vitro transfection and expression

The recombinant plasmids were examined for antigen expression by transfection into Vero cells using lipofectamine 2000 (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

After 72 hrs for transient transfection, cells were fixed in coverslips with cold methanol for 10 min, acetone for 1 min, following Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). Non-transfected Vero cells and pcDNA/*LacZ* transfected Vero cells were used as negative and positive controls, respectively. Prior to use in IFA, positive control cells were evaluated for the transfection efficiency by X-gal staining (1 mg/ml X-gal, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂) as described by Briane et al. (2002). The IFA was performed with anti-histidine diluted 1:5.000 (for MSP1b), anti-MSP1a monoclonal antibody ANA22B1 diluted 2 μ g/ml (MSP1a), and anti-MSP5 monoclonal antibody ANAF16C1 2 μ g/ml (MSP5) diluted in PBS containing 2% BSA, and incubated for 45 min at 37 °C. After three times washes in PBS-Tween 20, the coverslips were incubated for 45 min with FITC-anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich Co, USA) diluted 1:900 in PBS containing 2% BSA. The IFA was examined using a fluorescence microscope with appropriate filters.

Animal and experimental design

Seven to eight weeks old female BALB/c mice were randomly distributed into seven experimental groups with eight animals each. Mice were kept in conventional animal facilities and received water and food *ad libitum*, and used under animal protocols approved by the Institutional Research Committee (process number 26927/05).

Mice were anaesthetized prior following injection with 100 µg of recombinant plasmids in sucrose-phosphate-glutamate buffer (SPG) (Dong-Ji et al., 2000) in each leg muscle. G1-negative control (100 µl PBS); G2-empty vector (100 µg pcDNA); G3-positive control (100 µg PR1 strain *A. marginale* initial bodies + Freund's adjuvant); G4-pcDNA-*msp1α*; G5-pcDNA-*msp1β*; G6-pcDNA-*msp5*; and G7-pool of recombinant plasmids (33 µg for each pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β*, and pcDNA-*msp5*). In the positive control group, the BALB/c mice were inoculated with 100 µg PR1 *A. marginale* initial bodies emulsified with complete Freund's adjuvant, and following two immunizations with incomplete Freund's adjuvant. Mice were vaccinated at 0, 2, 5, 8 and 12 weeks. Blood samples were collected at – 1, 1, 4, 7, 11 and 15 weeks, and the sera samples stored at – 20 °C until analysis.

Antibody assays and isotypes

Optimal dilutions were established using check board titrations with dilutions of sera and conjugates. ELISA plates (Nunc-ImmunoTM Maxisorp, Roskilde, Denmark) were coated with 100 µl of the rMSP1a (5 µg/ml) for G4; rMSP1b (5 µg/ml) for G5; rMSP5 (5 µg/ml) for G6; and pool of rMSP1a, rMSP1b, rMSP5 (5 µg/ml) for G7 and *A. marginale* initial bodies (10 µg/ml) for G3, G1 and G2. After overnight incubation at 4 °C, samples of serum from groups of immunized mice were diluted 1:50 in PBS-Tween 20 pH 7.4 plus 5% non-fat dry milk. Then, diluted samples were added in duplicate to each well, and the plates were incubated at 37 °C for 45 min. The positive and negative control sera were included in each

plate. Three second antibodies were used, horseradish peroxidase-labeled anti mouse whole anti-IgG (Sigma) (1:10.000), and anti-mouse IgG1, and anti-mouse IgG2a peroxidase conjugate (1:50.000), each incubated for 45 min at 37 °C. The substrate for the enzyme was OPD (*ortho*-phenylenediamine) 0.4 mg/ml, in H₂O₂ 0.04% in substrate buffer (0.1 M acid citric, 0.2 M Na₂HPO₄). The reaction was stopped with 50 µl of 1N HCl. The absorbance values were average and the optic density (OD) values were calculated as previously described (Garcia *et al.*, 2006).

Western blot analysis

rMSP1a (G4), rMSP1b (G5), rMSP5 (G6), a pool of rMSPs (G7), and *A. marginale* initial bodies (G3) were electrophoresed on 7.5-17.5% gradient SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane, 0.45 µm (Hybond-ECLTM, Amershan Biosciences, Sunnyvale, CA, USA), as previously described (Towbin and Gordon, 1984). After blocking, strips of nitrocellulose membrane were incubated with pre immune and post immune pool of serum from mice of the each group (G1 to G7) diluted 1:50 in blocking solution. Peroxidase-labeled protein G (1:5.000) was used as second antibody, and incubated for 1 h at room temperature. The peroxidase activity was revealed using enhanced chemiluminescence (ECL) (Amershan Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). Protein molecular weight markers (BenchMarkTM Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were used as standard.

Statistical analysis.

The student's *t* test was performed for statistical evaluation of data from IgG2a and IgG1 production.

Proliferation Assay

Spleen from mice immunized with recombinant plasmids, control group and normal mice were removed aseptically and teased. The erythrocytes were lysed with tris-ammonium chloride, and the cell suspension was washed three times in RPMI 1640 medium. For proliferative assays, 100 μ l of the cells were cultured in triplicate wells at a concentration of 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum in 96-well flat-bottom culture plates. Homogenate *A. marginale* was then added to each well at concentrations of 5 μ g/ml. The cells were cultured for 5 days at 37°C with 5% CO₂, and were pulsed with 1 μ Ci of [³H] thymidine 18 h before harvesting on glass filter strips. The radioactivity was determined by cintilator (Beckman LS 6.800). The Stimulation Index was calculated as the triplicate of stimulated cells (cells + Ag) divided by the cell control (cell + RPMI 1640). An SI of ≥ 2 was considered significant

Results

Eukaryotic expression of MSPs antigens of A. marginale

Cells transfected with recombinant plasmids (pcDNA-*mSP1 α* , pcDNA-*mSP1 β* , and pcDNA-*mSP5*) revealed the expression of specific proteins by IFA (Fig.1). Non-transfected Vero cells did not express any immunoreactive protein with anti-histidine, ANA22B1, ANAF16C1 monoclonal antibodies by IFA (Fig 1a). The immunoreaction was verified in Vero cells transfected with pcDNA-*mSP1 α* using ANA22B1 monoclonal antibody against MSP1a (Fig.1c). Also, anti-histidine monoclonal antibody was used to detected six histidine aminoacid that express fused with recombinant MSP1b (Fig.1d) and ANAF16C1 bound to cells transfected with pcDNA-*mSP5* (Fig.1e).

Humoral immune response of mice elicited by DNA vaccination

Serological responses were evaluated throughout of the immunizations by ELISA and Western blot analysis. The whole IgG production in mice was showed in Fig.2. All pre-immune and control group sera (G1 and G2) reacted below cut-off and were considered negative. Mice sera from group immunized with *A. marginale* (G3) showed seroconversion after second immunization that maintained stable throughout of the experiment. In G4 (pcDNA-*msp1* α), G6 (pcDNA-*msp5*), and G7 (pool of plasmids) the seroconversion started after second immunization, but only after third immunization all animals were positives for specific proteins. In contrast, mice sera from G5 (pcDNA-*msp1* β) showed lower seroconversion and few animals had OD above cut-off after fifth immunization.

The IgG1 and IgG2a responses against MSP1a, MSP1b, and MSP5 were analysed from pool sera from DNA-vaccinated BALB/c mice at -1, 4, 11, and 15 weeks after initial immunization (Fig.3). The OD values for IgG1 and IgG2a demonstrated IgG2a isotype polarization at all groups immunized with DNA vaccines. Significant IgG2a production over IgG1 production were detected after fourth immunization with DNA vaccine, and G4, G6 and G7 had strong polarization for IgG2a at week 4 ($p < 0.01$). Mice immunized with *A. marginale* (G3) demonstrated predominance for humoral IgG1 isotype and the significant IgG1 levels was verify at week 4 ($p < 0.01$). The predominance of IgG2a over IgG1 isotype suggests that in the DNA vaccinated BALB/c mice elicited a pronounced Th1 response.

Western blot results using pool of sera are shown in Fig.4. All pre-immune sera, and sera post immune of mice from G1 (PBS) (data not showed) and G2 (vector alone) did not show any reaction. Sera from mice immunized with pcDNA-*msp1* α (G4) showed reactivity approximately in 105-70 kDa and approximately 20 kDa (rMSP1a), and mice immunized with pcDNA-*msp1* β (G5) reacted poorly with 100 kDa (rMSP1b). Moreover, sera from mice immunized with pcDNA-*msp5* (G6) reacted at 31 kDa (rMSP5). Mice sera from G7 that

received recombinant plasmids in mixture reacted with all recombinant proteins (rMSP1a, rMSP1b, and rMSP5) of *A. marginale*. This result demonstrated that no suppression was observed when these recombinant plasmids had taken in association.

T cell-mediated immune responses

Splenocytes proliferation from mice immunized using *A. marginale* homogenate presented in Fig. 5. Significant proliferation was observed only in mice spleen cells from G4 that received pcDNA-*msp1a* (SI = 2,6). In others groups no significant proliferation was observed (SI < 2). Although poorly lymphoproliferation was observed in spleen cells from mice immunized with recombinant plasmids individually, when they were administrated in combination, the strong enhancer lymphoproliferation was observed (SI = 12,2).

Discussion

In this work, the MSP1a, MSP1b, and MSP5 of *A. marginale* were successful detected in Vero cells transfected with pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β*, and pcDNA-*msp5*, respectively, as demonstrated by IFA using monoclonal antibodies, and the injection of the recombinant plasmids (pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5*) elicited specific antibodies against MSP1a, MSP1b and MSP5 in BALB/c mice. Previous works also related that DNA vaccines to *A. marginale* induced immune responses in BALB/c mice immunized with DNA vaccine encoding MSP1a (Arulkanthan et al., 1999). These authors immunized calves with pVCL/ *msp1α* and detected only IgG1 antibodies in sera of animals following DNA vaccination, differently of positive-control bovine serum that contained both IgG1 and IgG2 antibodies with specificity for MSP1a. The few studies about control of anaplasmosis using DNA vaccination are based in either genes *msp1α* or *msp1β* genes, and they showed

partial protection for virulent challenge with *A. marginale* strain (Arulkanthan et al., 1999, Andrade et al., 2004).

The mice immunized with pcDNA-*msp1β* elicited a small response compared with the response from mice immunized with cDNA-*msp1α* and pcDNA-*msp5*, evaluated by ELISA. Only two of eight animals produced titer of specific antibodies with OD above cut-off, after fifth immunization. However, the sera from mice immunized with pcDNA-*msp1β* reacted specifically with r-MSP1b by Western blot. The MSP1a and MSP1b are associated in the native membrane through disulfide bonds (Vidotto et al., 1994), and the IgG titers specific for MSP1a and MSP1b were comparable in complex MSP1-immunized cattle. Moreover, CD4⁺ T-cell responses were detected only against MSP1a (Brown et al., 2001), suggesting that MSP1a-specific T cells provide cognate help to both MSP1a and MSP1b specific B cells.

The mice immunized with DNA vaccines to *A. marginale* (pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β*, and pcDNA-*msp5*) exhibited predominance of IgG2a antibody over IgG1 (ratio of IgG2a/IgG1 \geq 2.0). The presence of the IgG2 isotype is often considered as evidence of a Th1 immune response (Oñate et al., 2003). Thus, our results suggest that intramuscular injection with plasmids encoding MSPs generate a response biased towards a Th1 response in mice. In contrast, the group that received initial bodies of *A. marginale* elicited predominance IgG1 production. This result is explained since antigens associated with Freund's adjuvant preferentially stimulate the Th2 immunity, and vigorously suppress the Th1 type (Yip et al., 1999). It is well established that protection against infection by an intracellular pathogen, including *A. marginale*, requires the generation of a Th1-type immune response over time (Brown et al., 1998; Oñate et al., 2003; Nagata et al., 2004).

In this study, only the mice immunized with pcDNA/*msp1α* provided significant splenocytes proliferation. MSP1a contain variant and conserved amino acid in the carboxy terminal region that response specifically, which stimulate high levels of IFN- γ production by

CD4⁺ cells (Brown et al., 1998, 2001, 2002). Peripheral blood mononuclear cells and CD4⁺ T-cell lines from MSP1-immunized calves proliferated vigorously in response to the immunization with Florida strain and heterologous strains of *A. marginale*. In contrast, there was either weak or no recognition of MSP1b proteins (Brown et al., 2001).

Mice immunized with the recombinant plasmids (pcDNA-*msp1* α , pcDNA-*msp1* β and pcDNA-*msp5*) showed high antibodies response by ELISA and were able to react with all recombinant proteins (rMSP1a, rMSP1b, and rMSP5) in Western blot. Additionally, a strong lymphoproliferation was observed, whereas the genes to MSP1a provide significant splenocytes and the genes to MSP1b and MSP5 did not. These results can demonstrate both immune response and T-cell lymphocyte were generated. Thus, the immunization with recombinant plasmids encoding MSPs in association can be an effective strategy for immunoprophylaxis of anaplasmosis. In contrast, the administration of nine different plasmids encoding antigens from *Plasmodium falciparum*, pooled in cocktail and injected in a single site shown significant suppression or complete abrogation of responses (Sedegah et al., 2004).

Additionally, the combination of four DNA vaccines increased protection for pulmonary tuberculosis in the mouse model (Morris et al., 2000). The association of three DNA vaccine constructions against schistosomiasis showed higher protection for BALB/c mice than immunization with double or individually (Nascimento et al., 2002). Rabbits immunized with single papillomavirus early genes or with a combination of the four genes provided strong and complete protection against viral challenge (Han et al., 1999). Similar results were observed in DNA vaccines against simian immunodeficiency virus (SIV), *Plasmodium chabaudi adami*, and *Plasmodium yoelii* (Subbramanian et al., 2003; Wang et al., 2004; Scorza et al., 2005).

In conclusion, administration of plasmids encoding *A. marginale* MSPs in association in BALB/c mice induced better induction of Th1 immune response than individually

plasmids. For the future multiepitope DNA vaccine should be evaluated in bovine protection for challenge of anaplasmosis.

Acknowledgments

We wish to thank Kerlei Cristina Médici from Virology Laboratory for preparing Vero cells, Profa. Dra. Eiko N. Itano and Mari Sumigawa for help in performing splenocyte proliferation, Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley for revising the manuscript. This work was financially supported by CNPq, CAPES and Fundação Araucária do Paraná.

References

- Andrade, G.M., R.Z. Machado, R.Z., Vidotto, M.C., Vidotto, O., 2004. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1026**, 257-266.
- Alleman, A.R., Barbet, A.F., 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 270-276.
- Arulkanthan A, Brown W, McGuire TC, Knowles, DP., 1999. Biased Immunoglobulin isotype response induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **67**, 3481-87.
- Briane D, Lesage D, Cao A, Coudert R, Lievre N, Salzmann JL., 2002. Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **50**, 983-991.
- Brown WC, Shakh V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH., 1998. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infection and Immunity* **66** , 5406-5413.
- Brown WC, Palmer GH, Lewin HA, McGuire TC., 2001. 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* **69**, 6853-6862.
- Brown WC, McGuire TC, Mwangi W, Kegerreis, KA, Macmillan, H, Lewin HA, Palmer GH., 2002. 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* **70**, 5521-5532.
- Dong-Ji Z, Yang X, Shen C, Lu H, Murdin A, Brunham RC., 2000. Priming with *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein (MOMP) DNA followed by MOMP ISCOM boosting enhances protection and is associated with increased immunoglobulin A and Th1 cellular immune responses. *Infection and Immunity* **68**, 3074-3078.
- Donnelly JJ, Ulmer JF, Shiver JW, Liu MA., 1997. DNA vaccines. *Annual Review of Immunology* **15**, 617-648.

Ferreira AMT, Suzart S, Knowles DP, Vidotto MC., 2001. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. FEMS Microbiology Letters **197**, 139-143.

Garcia J.L., Navarro I.T., Vidotto O., Gennari S.M., Machado R.Z., Sinhorini I.L., 2006. *Toxoplasma gondii*: comparison of rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. Experimental Parasitology **113**, 100-105.

Garcia-Garcia J, de la Fuente J, Kocan KM, Blouin E F, Albur T, Onet VC, Saliki JT., 2004. 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 **98**, 137-151.

Han, R., Cladel, N.M., Reed, C.A., Peng, X., Christensen, N.D., 1999. Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. Journal of Virology **73**, 7039-7043.

Kano FS, Vidotto O, Pacheco RC, Vidotto MC., 2002. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. Veterinary Microbiology **87**, 131-138.

Laemmli UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680 – 685.

Lopez, J.E., Siems, W.F., Palmer, G.H., Brayton, K.A., McGuire, T.C., Norimine, J., Brown, W.C., 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. Infection and Immunity **73**, 8109-8119.

Marana E.R.M., Kano F.S., Tamekuni K., Ataliba A.C., Vicentini J.C., Spurio, R.S., Vidotto M.C., Vidotto O., 2006. Padronização e avaliação de um teste de ELISA por competição para o diagnóstico da anaplasmoze bovina utilizando a proteína recombinante MSP5-PR1. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, *Anais . . .*, **5**, Ribeirão Preto, SP.

- McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR., 1984. Putative adhesions of *Anaplasma marginale* major surface polypeptides 1a and 1b. *Infection and Immunity* **62**, 4594-4601.
- Morris, S., Kelley, C., Howard, A., Li, Z., Collins, F., 2000. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* **18**, 2155-2163.
- Nagata T, Aoshi T, Uchima M, Suzuki M, Koide Y., 2004. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper-T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology* **23**, 93-106.
- Nascimento, E., Leão, I.C., Pereira, V.R.A., Gomes, Y.M., Chikhlikar, P., August, T., Marques, e., Lucena-Silva, N., 2002. Protective immunity of single and multi-antigen DNA vaccine against shistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 105-109.
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF., 1993. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **61**, 5245-5251.
- Oñate AA, Céspedes S, Cabrera A, Rivers R, González A, Muñoz C, Folch H, Andrews E., 2003. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **71**, 4857-4861.
- Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., Brown, W.C., 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today* **15**, 281-286.
- Scorza, t., Grubb, K., Smooker, P., Rainckuk, A., Proll, D., Spithill, T.W., 2005. Induction of strain-transcending immunity against *Plasmodium chabaudi adami* malaria with a multiepitope DNA vaccine. *Infection and Immunity* **73**, 2974-2985.
- Sedegah, M., Charoenvit, L., Belmonte, M., Majan, V.F., Abot, S., Ganeshan, H., Kumar, S., Bacon, D.J., Stowers, A., Narum, D.L., Carucci, D.J., Rogers, W.O., 2004. Reduced immunogenicity of DNA vaccine plasmids in mixtures. *Gene Therapy* **11**, 448-456.
- Subbramanian, R., Kuroda, M.J., Charini, W.A., Barouch, D.H., Costantino, C., Santra, S., Schmitz, J.E., Martin, K.L., Lifton, M.A., Gorgone, D.A., Shiver, J.W., Letvin, N.L., 2003. Magnitude and diversity of cytotoxic-T-lymphocyte responses elicited by multiepitope DNA vaccination in Rhesus monkeys. *Journal of Virology* **77**, 10113-10118.
- Tamekuni K., Kano F.S., Kawasaki P.M., Igarashi M., Ataliba A.C., Coelho, A.L.M., Marana E.R.M., Vidotto M.C., Vidotto O., 2006. Cloning,

sequencing and antigenic characterization of Msp1a and Msp1b recombinant proteins of the *Anaplasma marginale* PR1 strain. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, *Anais...*, **5**, Ribeirão Preto, SP.

Tebele N, McGuire TC, Palmer GH., 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity* **59**, 3199-3204.

Towbin H, Gordon H., 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and outlook. *Journal of Immunological Methods* **72**, 313-340.

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE., 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **253**, 1745-1749.

Vidotto MC, McGuire TC, McElwain TF, Palmer GH, Knowles Jr DP., 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* **62**, 2940-2946.

Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Shkap, V., Pipano, E., Knowles, D.P., 1992. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity* **60**, 5139-5144.

Wang, R., Epstein, J., Charoenvit, Y., Baraceros, F.M., Rahardjo, N., Gay, T., Banania, J.G., Chattopadhyay, R., de la Vega, P., Richie, T.L., Tornieporth, N., Doolan, D.L., Kester, K.E., Heppner, D.G., Norman, J., Carucci, D.J., Cohen, J.D., Hoffman, S.L., 2004. Induction in humans of CD8+ and CD4+ T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein. *The Journal of Immunology* **172**, 5561-5569.

Yip HC, Karulin AY, Tary-Lehmann M, Hesse MD, Radeke H, Heeger PS, Trezza RP, Heinzl P, Forsthuber T, Lehmann PV., 1999. Adjuvant-Guided type 1 and type 2 immunity: Infections/noninfection dichotomy defines the class of response. *The journal of Immunology* **162**, 3942-3949.

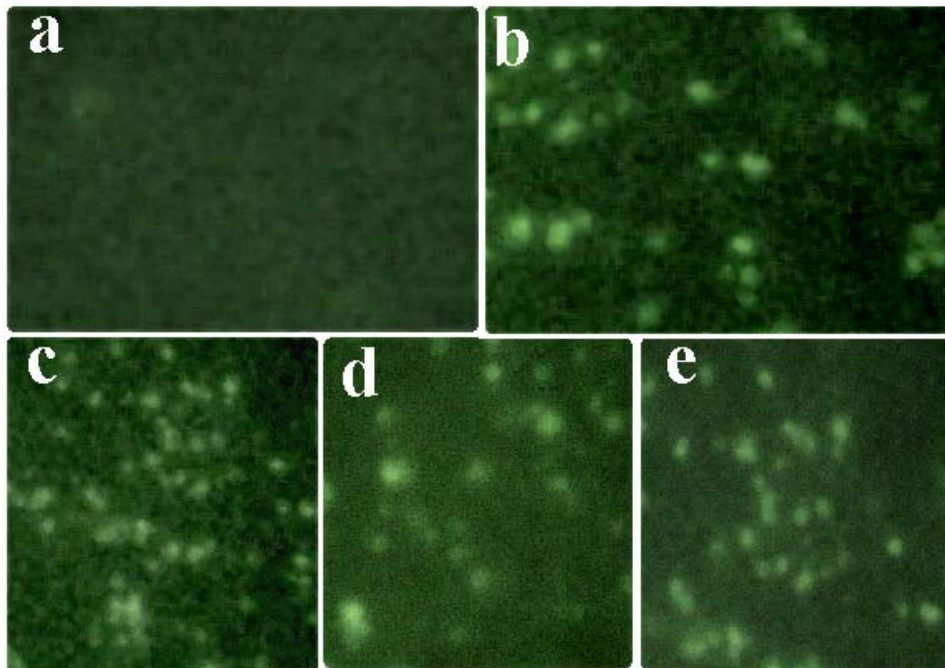


Fig.1. Immunofluorescence of Vero cells transfected with DNA vaccine encoding *A. marginale* MSP1a, MSP1b and MSP5 antigens, using monoclonal antibodies (400x) a. non-transfected Vero cells; b. pcDNA-*lacZ* Vero cells transfected using anti-histidine monoclonal antibody (positive control); c. pcDNA-*msp1α* using ANA22B1 monoclonal antibody; d. pcDNA-*msp1β* using anti-histidine monoclonal antibody; e. pcDNA-*msp5* using ANAF16C1 monoclonal antibody

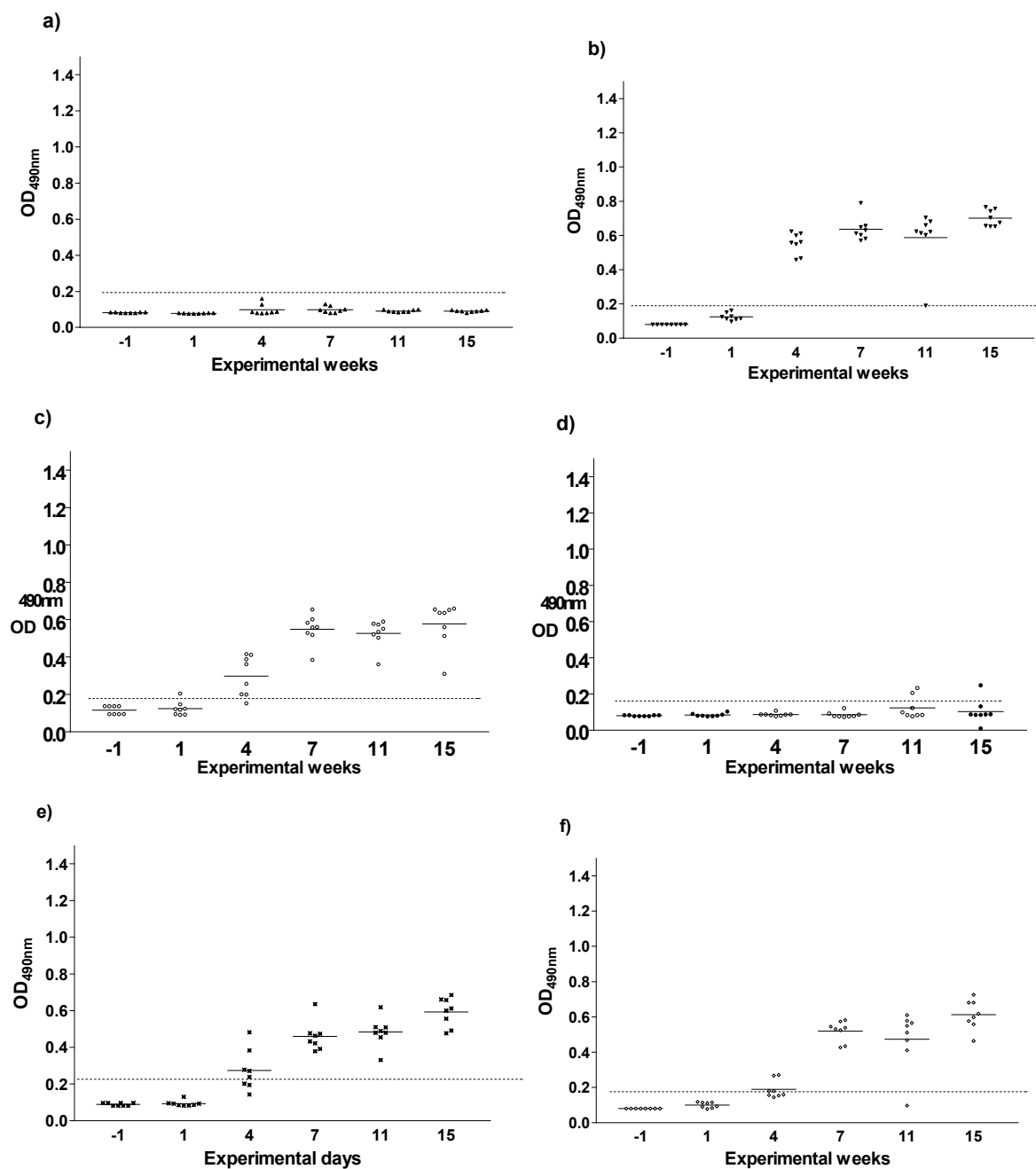


Fig.2. Whole IgG antibody response measured by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in immunized BALB/c mice. (a) G2 (only vector); (b) G3 (100 μg initial bodies of *A. marginale*); (c) G4 (100 μg pcDNA-*msp1α*); (d) G5 (100 μg pcDNA-*msp1β*); (e) G6 (100 μg pcDNA-*msp5*); (f) G7 (33 μg for each pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5*). Mice were immunized at weeks 0, 2, 5, 8, and 11 and the blood collect were at weeks -1, 1, 4, 7, 11 and 15 (back arrows). Dashed line indicates positive cut-off.

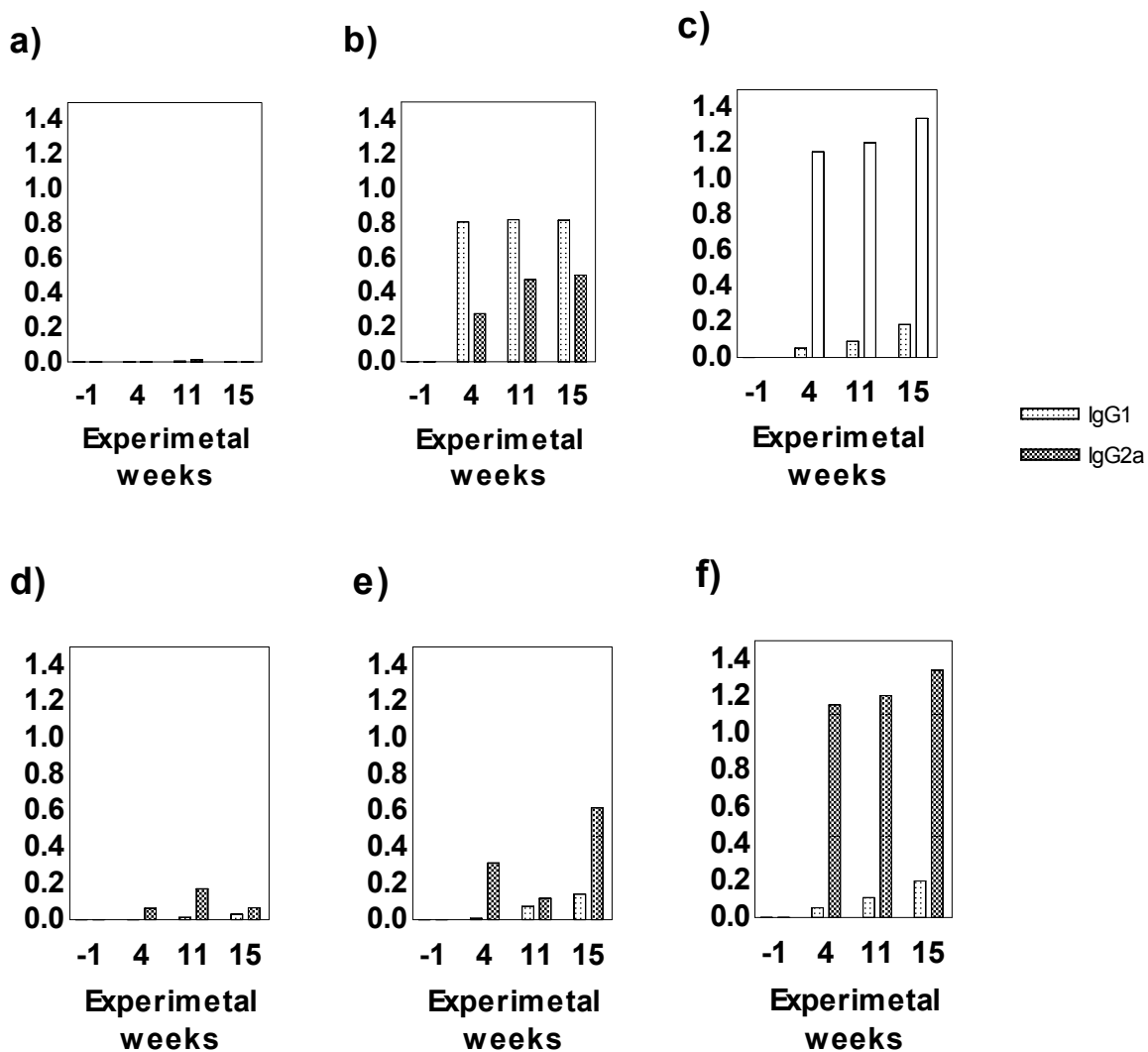


Fig.3. IgG isotype humoral responses of serum from BALB/c mice immunized with DNA-vaccine encoding *A. marginale* MSP1a, MSP1b, and MSP5 proteins. (a) The result of G2 (only vector); (b) G3 (100 μ g initial bodies *A. marginale*); (c) G4 (100 μ g pcDNA-*msp1 α*); (d) G5 (100 μ g pcDNA-*msp1 β*); (e) G6 (100 μ g pcDNA-*msp5*); (f) G7 pool of plasmids (33 μ g each pcDNA-*msp1 α* , pcDNA-*msp1 β* , and pcDNA-*msp5*). Measured IgG1 and IgG2a responses were taken of pool of serum at -1, 4, 11 and 15 weeks after initial immunization by ELISA.

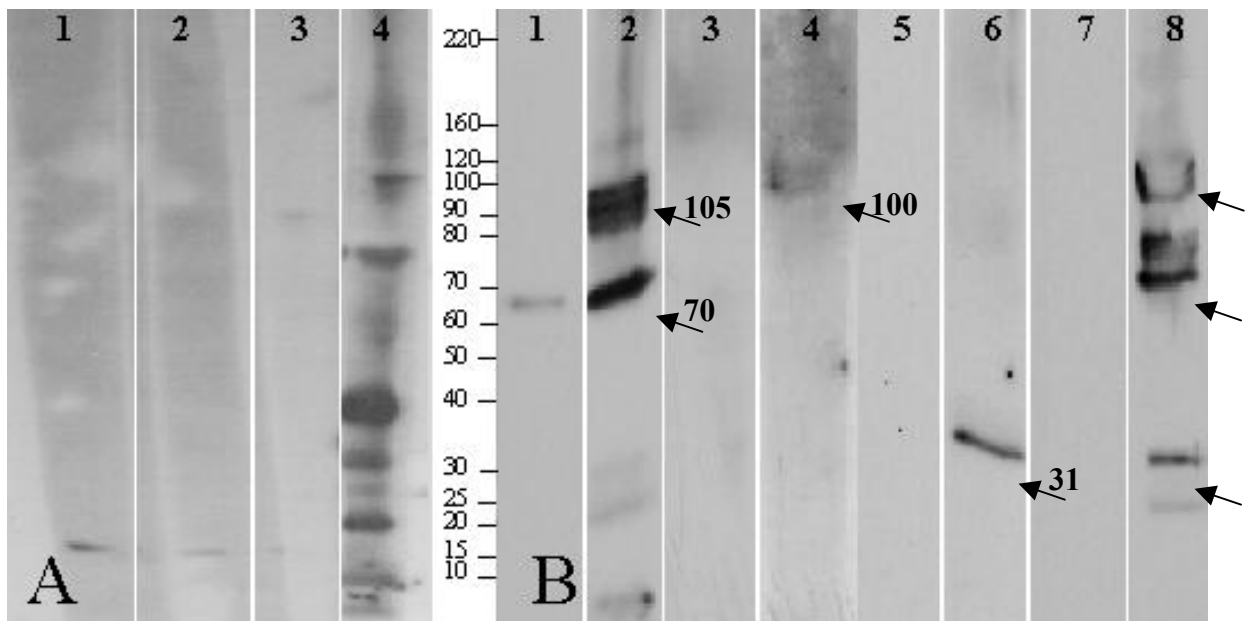


Fig. 4. Reactivity of sera from mice immunized with *A. marginale*, and DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b, and MSP5 of *A. marginale* by Western blot. A: *A. marginale* PR1 strain initial bodies. B: lane 1 and 2, rMSP1a; lane 3 and 4, rMSP1b; lane 5 and 6, rMSP5; lanes 7 and 8, pool of rMSPs. In A: pre and post immune sera of mice immunized with empty vector (G2: lane 1 and 2); with *A. marginale* initial bodies (G3: lane 3 and 4); In B: pool of mice sera (at week 15) diluted 1:50 immunized with pcDNA-*mSP1α* (G4: lane 1 and 2); with pcDNA-*mSP1β* (G5: lane 3 and 4); with pcDNA-*mSP5* (G6: lane 5 and 6); with pool of plasmid (pDNA-*mSP1α*, pcDNA-*mSP1β* and pcDNA-*mSP5*) (G7: lane 7 and 8). The positions and molecular masses (kDa) of protein standards are also shown.

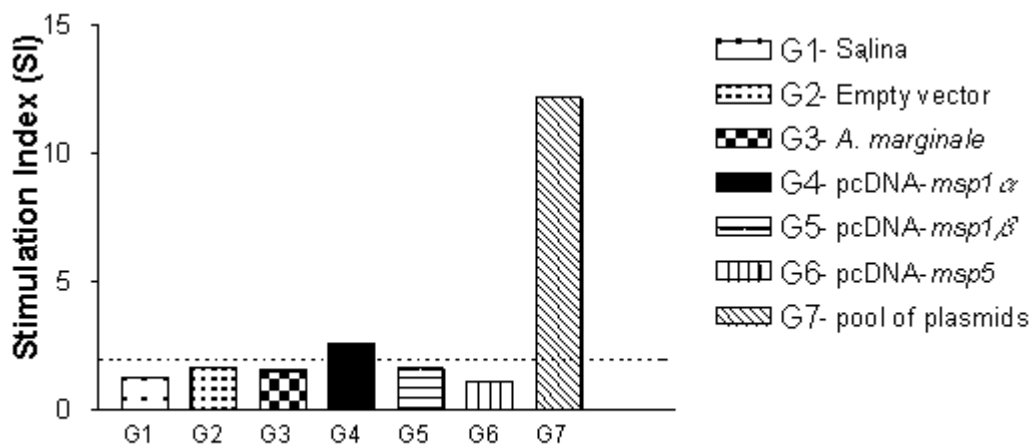


Fig. 5. Proliferation of splenocytes cells from mice immunized with single DNA vaccine encoding MSP1a, MSP1b and MSP5 and in association. The data are presented for splenocytes proliferation cultured for 5 days with 5 μg of *A. marginale* homogenate/ml. Results are presented as means count per minute of triplicate cultures in Stimulation Index values (SI). SI values ≥ 2.0 (dashed line) were considered significant. Experimental groups were: G1 (PBS); G2 (empty vector); G3 (100 μg *A. marginale* initial bodies); G4 (100 μg pcDNA-*msp1α*); G5 (100 μg pcDNA-*msp1β*); G6 (100 μg pcDNA-*msp5*) and G7 (33 μg for each pcDNA-*msp1α*, pcDNA-*msp1β* and pcDNA-*msp5*).

5. CONCLUSÕES

- As amostras de *A. marginale* isoladas no Paraná diferiram quanto ao número de seqüências repetitivas *in tandem* da proteína MSP1a e apresentaram seis novas seqüências não descritas na literatura. A análise filogenética utilizando as seqüências das proteínas MSP1a e MSP4 não permite a diferenciação filogeográfica dos isolados brasileiros.
- As vacinas de DNA contendo os genes *msp1 α* , *msp1 β* e *msp5* expressaram as proteínas MSP1a, MSP1b e MSP5 *in vitro* e *in vivo*.
- Os plasmídios recombinantes induziram resposta imune humoral em camundongos BALB/c, com predomínio do isotipo IG2a, indicativo de resposta Th1.
- A resposta celular obtida com a associação dos plasmídios recombinantes foi maior do que a induzida pelos plasmídios individuais.

APÊNDICE A: Lista de Reagentes

- **Reação em Cadeia pela Polimerase gel de agarose**

1. 100 mM dNTP, 4 x 250 µl; 25µmol cada (solução de 100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP) (Invitrogen Life Technologies™)
2. Tampão PCR 10 x (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
3. Padrão de tamanho molecular 100 bp DNA Ladder e 1 kb DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies™)
4. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83
5. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
6. Agarose (Invitrogen Life Technologies™)
7. Azul de bromofenol (Sigma®)
8. Brometo de etídio (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®)
9. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Invitrogen Life Techonologies®)
10. *Platinum Pfx* DNA Polymerase recombinante 100 unidades (Invitrogen Life Technologies®)

- **Transformação da *E. coli* TOP10**

1. Ampicilina
2. Cloreto de magnésio, MgCl₂ 10mM
3. Cloreto de potássio, PM: 74,55.
4. Cloreto de sódio, NaCl, PM: 58,45
5. Extrato de levedura
6. Glicose 20mM
7. Sulfato de magnésio, MgSO₄ 10mM.
8. Triptona

- **Gel de poliacrilamida, tampão de corrida e transferência**

1. Ácido acético, CH₃COOH, PM: 60,05
2. Acrilamida, C₃H₅NO, PM: 71,08.
3. Azul brilhante R-250, C₄₅H₄₄N₃O₇S₂Na, PM: 826,0.
4. Mercaptoetanol, C₂H₆O₅, PM: 79,13.
5. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), C₁₂H₂₅NaO₄SPM: 288,38.
6. Glicerol, C₃H₈O₃, PM: 92,09.
7. Glicina, C₂H₅O₂N, PM: 75,07.
8. Metanol, CH₃OH, PM: 32,04
9. N, N' Metileno-bis-acrilamida, C₇H₁₀N₂O₂, PM: 154,2
10. Persulfato de amônio P.A., (NH₄)₂S₂O₈, PM: 288,2
11. Temed, N, N, N', N' – Tetramethylenediamine, C₆H₁₆N₂, PM: 116,21.
12. Tris-base, NH₂C(CH₂OH)₃, PM: 121,14

- **Western-blotting**

1. Cloreto de sódio, NaCl, PM: 58,45.
2. Fosfato de sódio dibásico, Na₂HPO₄, PM: 141,96.
3. Fosfato de sódio monobásico, NaH₂PO₄.H₂O, PM: 137,99.
4. Glicina, C₂H₅O₂N, PM: 75,07

5. Metanol, CH_3OH , PM: 32,04
6. Leite em pó desnatado (Molico®)
7. Tris-base, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, PM: 121,14
8. Tween 20, número de hidroxila: 96-108.

APÊNDICE B: Soluções e Tampões

- **LB caldo pH 7,0**

Tryptona	10g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio	5g
H ₂ O destilada	1000mL

- **Meio SOC (Invitrogen™ Life Technologies)**

Tryptona 2%	
Extrato de Levedura 0,5%	
NaCl 10mM	
KCl 2,5mM	
MgCl ₂ 10mM	
MgSO ₄ 10mM	
Glicose 20mM	

- **Tampão de transformação**

KCl	0,74g
CaCl ₂	0,75g

Dissolver em 80 mL de água destilada e autoclavar
 Diluir 0,2g de MÊS [2(N-morpholino) ethane sulfonic acid] em 15 mL e filtrar na solução anterior.
 OBS: utilizar gelada

- **Acrilamida 30%**

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

- **Lower Tris/SDS 1,5M pH 8,8**

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

- **Upper Tris/SDS 0,5M pH 6,8**

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

- **Persulfato de amônio (10%)**

Persulfato de amônio	0,1g
Água bidestilada	10mL

- **Tampão da amostra 1X Concentrado**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH: 6,8	1,25mL
Glicerol (100%)	1,00mL
β Mercaptoetanol	0,2mL
Azul de Bromofenol	0,01g

SDS	0,2g
Água ultrapura estéril q.s.p	10mL
• Tampão de corrida SDS-PAGE pH 8,8	
Glicina	14,4g
Tris-base	3g
SDS	1,0g
Água bidestilada q.s.p	1000mL
• Salina Tamponada (PBS) pH 7,2	
Fosfato de sódio dibásico	1,05g
Fosfato de sódio monobásico	0,36g
Cloreto de sódio	8,17g
H2O destilada q.s.p.	1000mL
• Tampão de Bloqueio (100ml)	
PBS	100mL
Tween 20	100µL
Leite em pó molico	5 g
• Tampão de lavagem (500ml)	
PBS	500mL
Tween 20	500 µL
• Tampão de transferência (2000ml)	
Tris base	6,82g
Glicina	32,4g
Metanol	450mL
H2O destilada q.s.p.	2000mL
• Tampão de sensibilização (0,05M Carbonato/Bicarbonato pH 9,6)	
Na ₂ CO ₃	1,59g
NaHCO ₃	2,93g
H2O destilada q.s.p.	1000mL
• Tampão de bloqueio	
Tampão de sensibilização + 8% de leite em pó desnatado	
• PBS-Tween 20 pH 7,2-7,4	
NaCl	8,0g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9g
KCl	0,2g
Tween 20	0,5mL
H2O destilada q.s.p.	1000mL
• Tampão de substrato cromógeno	
0,1M Ácido Cítrico (21g/litro)	24,3mL
0,2M Fosfato (28g Na ₂ HPO ₄ /1litro)	25,7mL

água destilada	50mL
• Substrato cromógeno	
Tampão substrato	100mL
OPD	40mg
H ₂ O ₂ PA 30%	40μL
• RPMI completo	
2 mM glutamina	
50 μM 2-mercaptoetanol	
100 U/mL penicilina/estreptomicina	
10% soro fetal bovino inativado	
• Azul de Tripán 0,1%	
Azul de tripan	1 mg
Água destilada	10 mL

APÊNDICE C: Protocolo de Técnicas

- **Extração de DNA de sangue (KIT PUREGENE)**

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

- **Gel de agarose 1%**

1. 0,5 g de agarose
2. 50 mL de TEB 1 x []
3. 25 µl ethidium bromide

- **Purificação DNA em gel agarose (Kit QUIAGEN)**

1. Corte a banda do gene no gel de agarose
2. Acrescente Buffer QG (3x Buffer: 1x peso gel)
3. Incube 30°C por 10 minutos até dissolver completamente o gel, vortex 1-2 minutos durante a incubação
4. Depois do gel dissolvido checar a cor (deve ser amarelo da cor do buffer QG)
- * Caso seja alaranjado ou violeta adicione 10µL de acetato de sódio 3M, pH 5 e misture a cor voltará a ser amarelo (adsorção de DNA eficiente só pH ≤ 7,5)
5. Adicione 1x volume do gel de isopropanol e misture seis. Despeje na coluna centrifugue o restante e centrifugue
7. Se for + 800µL acrescente o restante e centrifugue oito. Descarte o centrifugado
9. (opcional) Adicione 0,5mL de Buffer QG e centrifugue 1 min.
10. Para lavar 0,75mL de Buffer QG e centrifugue por 1 minuto (deixar em repouso de 2-5 minutos após adição de buffer PE)

11. Descarte o centrifugado e centrifugue novamente por 1 minuto para remover o excesso
12. Passe a coluna em tubo de 1,5mL
13. Para eluir o DNA adicione 50 μ L de Buffer EB ou água destilada no centro da membrana e centrifugue por 1 minuto, após aguardar 1 minuto

- **Transformação da *E. coli* TOP10**

1. Descongele no gelo, a *E. coli* TOP10 competente para transformação
2. Adicione 5-10 ng do DNA em um volume de 1 a 5 μ L em TOP10 e misture delicadamente com o pipetador
3. Incubar no gelo por 30 min.
4. Aqueça por 30 segundos 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 minutos sob agitação (2000rpm)
8. Espalhe 200 μ L da reação de transformação em uma placa com LB ágar contendo antibiótico apropriado (ampicilina 100 μ g/mL)
9. Crescer “overnight” em estufa 37 °C.

- **Purificação de plasmídios pelo kit Mega plasmidio Quiagen**

1. Escolha uma colônia isolada de uma cultura fresca da placa de cultura e a inocule o pré-inóculo em 5 a 10 mL de meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina. Incube por 8 h a 37 °C sob agitação (300 rpm).
2. Dilua o pré-inóculo em 1:500 a 1:1000 em LB com o respectivo antibiótico. Para altas cópias inocule em 500 mL ou 2,5 litros de meio. Para baixas cópias semear em 2,5 litros ou 5 litros de meio com o respectivo antibiótico. Cresça a 37 °C por 12-16 h sob agitação (300 rpm).
3. Centrifugue a cultura a 6.000 x g at 4 °C por 10 minutos
4. Ressuspenda o precipitado bacteriano em 50 mL ou 125 mL de tampão P1.
5. Adicione 50 mL ou 125 mL de tampão P2, misture gentilmente pelo inversão 4 a 6 vezes, e incube a temperatura ambiente por 5 min.
6. Adicione 50 mL ou 125 mL de tampão P3, mix immediately by inverting 4-6 times, and incubate on ice for 30 min.
7. Centrifugue a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Remova o sobrenadante contendo o DNA plasmidial
8. Centrifugue o sobrenadante novamente a 20.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Remova o sobrenadante contendo o DNA plasmidial.
9. Equilibrar uma QIAGEN tip-2500 ou QIAGEN tip-10000 com 35 mL ou 75 mL de tampão QBT e, permitir o esvaziamento por gravidade.
10. Aplicar o sobrenadante do passo 8 para a QIAGEN tip e permitir a entrada na coluna pela gravidade.
11. Lavar a QIAGEN-tip com 200 mL ou 600 mL de tampão QC.
12. Eluir o DNA com 35 mL ou 100 mL de tampão QF.
13. Precipitar o DNA pela adição de 24,5 mL ou 70 mL (0,7 volumes) de isopropanol em temperatura ambiente para eluir o DNA plasmidial. Misture e centrifugue imediatamente a 15.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Cuidadosamente decante o sobrenadante.

14. Lavar o precipitado de DNA com 7 mL ou 10 mL de etanol 70% a temperatura ambiente e, centrifugar a 15.000 x g por 10 minutos. Cuidadosamente decante o sobrenadante sem desfazer o precipitado.
15. Secar o precipitado por 10-20 minutos e, hidratar o DNA com o tampão num volume apropriado (e.x., TE Buffer, pH 8,0 ou 10 mM Tris-HCl, pH 8,5)

- **Transfecção de células eucarióticas *in vitro***

1. Um dia anterior ao procedimento de preparar as células na concentração de 0,5 – 2x 10⁵ células em 500 µL de meio de crescimento sem antibiótico. (placa de 24 orifícios). Utilizar as células quando o tapete celular estiver com 90-95% de confluência;
2. Dilua separadamente o DNA em meio livre de soro fetal e antibiótico (Opti-MEM®) na concentração de 0,8 µg de DNA em 50 µL de meio. Misture gentilmente.
4. Misture a lipofectamine 2000™ com 50 µL de Opti-MEM, misture gentilmente e incube por 5 min em temperatura ambiente.
5. Adicione a lipofectamine + Opti-MEM ao DNA. Misture gentilmente e incube por 20 minutos.
6. Paralelamente, retire o meio de crescimento e lave duas vezes o tapete celular com PBS estéril gelado. Adicione 500 µL de meio Opti-MEM.
7. Após 20 minutos, adicione 100 µL do complexo DNA + Lipofectamine em cada orifício. Misture gentilmente.
8. Incube por 4-6 horas em estufa a 37 °C com 5% CO₂.
9. Retire o meio e recoloque o meio de crescimento contendo 10% de soro fetal bovino.
10. Incube por 48-72 horas.

- **Avaliação da eficácia da transfecção pelo teste X-Gal (Briane et al., 2002)**

1. Após 48 horas do início da transfecção, lavar as células 2 vezes com PBS gelado e estéril;
2. Fixar as células por 3 minutos com solução com 1% paraformaldeído e 0,02% glutaraldeído;
3. Adicionar o reagente X-gal (1 mg/mL X-gal; 5 mM ferrocianeto de potássio; 5 mM de ferricianeto de potássio; 2 mM MgCl₂);
4. Observar as células após 6 horas.

- **Imunofluorescência Indireta para cultura de células**

1. Crescer a cultura de células transfectadas que expressa a proteína fusionada à histidina sobre uma lamínula estéril à 37 °C.
2. Lave as células cuidadosamente em PBS
3. Fixe as células com metanol (-20 °C) durante 10 minutos e então, com acetona (-20 °C) durante 1 minuto.
4. Lave as lamínulas 2 vezes em PBS durante 5 minutos (cada lavagem)
OBS: bloqueie com PBS contendo 1% BSA durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois seque para incubar com o anticorpo primário.
5. Incube com o anticorpo primário diluído em PBS com 1% BSA durante 60 minutos
6. Lave 3 vezes em PBS
7. Incube com o anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído em - PBS com 1% BSA, durante 30 minutos.
8. Lave 3 vezes em PBS

- Seque e adicione glicerina e lamínula para fazer a leitura em microscópio epifluorescente.

- **ELISA Indireto**

- Sensibilizar as placas com 100 μ L de solução de antígeno + tampão de sensibilização (Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6). Concentração do antígeno 5 μ g/mL (proteína recombinante) ou 10 μ g/mL (antígeno bruto /*Anaplasma*). Deixar “overnight” a 4 °C.
- Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20;
- Cobrir os orifícios com 200 μ L de tampão de bloqueio (Tampão carbonato 0,1 M + 8% de leite em pó desnatado);
- Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20;
- Adicionar em duplicata 100 μ L do soro diluído (1:50). O soro deve ser diluído em PBS-Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado. Incubar a placa a 37 °C por 45 minutos em câmara úmida.
- Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20;
- Adicionar 100 μ L de conjugado peroxidase espécie específica diluído 1:_____ (whole IgG anti-mouse sigma – 1:10.000; anti-mouse IgG1 1:50.000; anti-mouse IgG2a 1:50.000) em PBS-Tween 20. Incubar a 37 °C durante 45 minutos em câmara úmida;
- Lavar 3 vezes com 200 μ L de PBS-Tween 20;
- Adicionar 100 μ L de Tampão substrato cromógeno. Manter em agitação
- Parar a reação com 10 minutos adicionando 50 μ L de 1M HCl. Fazer a leitura com filtro de 490 nm.

- **Gel De Poliacrilamida 7,5 – 17,5%**

Lower gel	7,5%	17,5%
H2O Destilada	1,98 mL	0,66 mL
1,5M Tris/SDS pH 8,8	1,0 mL	1,0 mL
Bis/Acrilamida 30%	1,0 mL	1,0 mL
P.A. 10%	15 μ L	15 μ L
TEMED	1,5 μ L	1,5 μ L

Stacking gel	
H2O Destilada	1,68mL
0,5M Tris/SDS pH 6,8	0,75mL
Bis/Acrilamida 30%	0,54mL
P.A. 10%	15 μ L
TEMED	1,5 μ L

- **Western Blotting**

- Retirar a membrana de nitrocelulose do tampão de transferência;
- Enquanto seca a membrana de nitrocelulose, marcar com um lápis, os respectivos pesos moleculares do padrão;
- Rehidratar a membrana em água destilada;
- Bloquear a membrana com o tampão de bloqueio (PBS + 0.1% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado) por, pelo menos, 1 hora;
- Lavar a membrana em PBS-T (PBS + 0,1% Tween 20) 3 x de 5 minutos;

6. Incubar com o anticorpo (anti-histidina – HRP) diluída 1:5000 em tampão de bloqueio por 1 hora;
7. Lavar a membrana em PBS-T 3 x 5 minutos
8. Revelar a reação com o kit de ECL (quimioluminescência), seguindo as recomendações do fabricante (diluição em partes iguais).
9. Tempo de exposição do filme de Rx: 5 minutos a 20 minutos (dependendo do anticorpo)

• **Preparação de células esplênicas de camundongo**

1. Retirar o baço um recipiente estéril com RPMI 1640 e lavar o baço 2 vezes
2. Gentilmente liberar as células esplênicas pela ruptura da cápsula esplênica utilizando agulhas 21 G + 5 mL RPMI
3. “Puxar” os esplenócitos com uma seringa de 5 mL utilizando uma agulha 21 G para cima e para baixo uma vez e duas vezes com uma agulha 26,5 G com pressão moderada
4. Centrifugar a 500 x g por 5 min.
5. Lavar duas vezes com RPMI incompleto
6. Adicionar cloreto de amônio pra lisar os eritrócitos
7. Lavar duas vezes (centrifugar duas vezes a 500 x g por 5 min)
8. Ressuspender as células em 5 mL de RPMI 1640 completo

ANEXO A: Normas de Publicação do periódico *Semina Ciências Agrárias*

SEMINA

Busca

 • Agrárias • Biológicas/Saúde • Sociais/Humanas • Exatas/Tecnológicas • Ed. Anteriores • Normas Publica

• Agrárias • Biológicas/Saúde • Sociais/Humanas

Normas Editoriais para Publicação

Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

- a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;
- b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;
- c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPES.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde deverão ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT)

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/200 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "Ad hoc" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.
6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.
7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.
8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Edição da SEMINA
Campus Universitário - Caixa Postal 6001
86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.

Contatos com a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação:

Nome - Área - Ramal:	e-mail:
Prof. Dr. Édison Miglioranza - PROPPG/DP - 4513	emiglior@uel.br
Everson Antonio Moro Cazarim - PROPPG/DCA - 4105	cpgever@uel.br
Égle Maria de Souza - PROPPG/DCA - 4449	eglema@uel.br

ANEXO A: Normas de Publicação do periódico *Research in Veterinary Science*



Products

Research in Veterinary Science

Journal information

Product description
Editorial board
Audience
Abstracting/indexing

Subscription information

Bibliographic and ordering information
Conditions of sale
Dispatch dates

Journal related information

Impact factor
Most downloaded articles
Other journals in same subject area

Support & contact

About Elsevier

Select your view

RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

The Official Journal of the Association of Veterinary Teaching and Research Work

Guide for Authors

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Short Communications

Short communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review Articles Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Submission of manuscripts

Submission to *Research in Veterinary Science* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Language Editing: [Elsevier's Author Gateway](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Ethics

Before papers describing animal studies are accepted for publication in *Research in Veterinary Science*, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project

underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Title

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

Form of Papers

- a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.
- b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper.
- c) Introduction.
- d) Materials and methods employed.
- e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.
- f) Discussion and conclusions.
- g) Acknowledgements.
- h) References.
- i) Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Abbreviation and symbols: Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

Reference Format

Only papers closely related to the author's work should be mentioned; exhaustive lists should be avoided. References should be cited in the text thus: Brown and Smith (1985), Jones (1987a), Jones (1987b), or Smith *et al* (1988). The list of references at the end of the paper should be given in alphabetical order and should appear in the form:- Torgerson, P.R., Budke, C.M., 2003 *Echinococcosis* - an international public health challenge. *Research in Veterinary Science* **74**, 191-202. References to books and monographs should include: (1) author(s) or editor(s); (2) year of publication; (3) title; (4) edition; (5) place of publication and publisher; (6) beginning and final page numbers.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without

- becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
 6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
 7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
 8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
 9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
 10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.authors.elsevier.com/artwork>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit the [journal's home page](#) and click on the right-hand side link to the Author Gateway.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/locate/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use

file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

2. Additional paper offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.

3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra paper offprints. A total of 25 free offprints of each paper will be made available to its author(s). Additional copies can be ordered at proof stage when a scale of costs will be supplied.

Research in Veterinary Science has no page charges



[Printer-friendly version](#)