

Indução de Resposta Imune Contra Novas Proteínas de Membrana de *Anaplasma marginale* em Camundongos BALB/c

Lenita Ramires dos Santos¹

Carina Elisei²

Aline Silva³

Nádía Gaúna⁴

Carlos Alberto do Nascimento Ramos⁵

Grácia Maria Soares Rosinha⁶

Cleber Oliveira Soares⁷

Flávio Ribeiro Araújo⁸

Introdução

A anaplasmosose bovina é uma enfermidade causada pela riquetsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*, pertencente à família Anaplasmataceae (KOCAN et al., 2003). Esse agente patogênico ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo (RIDING et al., 2003) e é transmitido principalmente por carrapatos ixodídeos (KOCAN et al., 2003; RIKIHISA, 2003), dos quais, no Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o único vetor biológico identificado (KESSLER; SCHENK, 1998).

A fase aguda da anaplasmosose bovina é caracterizada por altas riquetsemias ($> 10^9$ eritrócitos infectados por mililitro de sangue) (FRENCH et al., 1998). Alguns dos sinais clínicos da doença, tais como anemia e perda de peso, afetam diretamente

a produção de carne e leite, causando consideráveis perdas econômicas para esse setor.

As vacinas atualmente em uso apresentam uma série de limitações, como efeitos adversos em algumas categorias de animais (vacas prenhes e animais adultos), possibilidade de veiculação de agentes patogênicos (no caso da premunicação), sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e consequente risco de isoeritrolise neonatal em bezerros (BRIZUELA et al., 1998; KESSLER; SCHENK, 1998). Por isso, é necessário o desenvolvimento de novas vacinas e, desse modo, a busca por novos imunógenos em organismos derivados de cultivo celular.

As primeiras proteínas de membrana de *A. marginale* purificadas e avaliadas como imunógenos, as proteínas principais de superfície (MSPs), não foram

¹ Bióloga, Ph.D., Bolsista DCR CNPq/Fundect, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, lenitasantos@hotmail.com

² Bióloga, Ph.D., Bolsista DTI CNPq, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, elisei@cnpqg.embrapa.br

³ Estudante de Graduação em Ciências Biológicas/Universidade Anhanguera-Uniderp, Bolsista, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, aline.ariano@yahoo.com

⁴ Estudante de Graduação em Ciências Biológicas/Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Bolsista Iniciação Científica CNPq, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, nadiasobrinho@yahoo.com.br

⁵ Médico Veterinário, M.Sc., Estudante de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, carlosanramos@yahoo.com.br

⁶ Engenheira Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosinha@cnpqg.embrapa.br

⁷ Médico Veterinário, Ph.D., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, cleber@cnpqg.embrapa.br

⁸ Médico Veterinário, Ph.D., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flavio@cnpqg.embrapa.br

capazes de promover proteção similar àquela obtida com o uso de corpúsculos de inclusão e tampouco com o uso de preparações de membrana externa de *A. marginale* (BROWN et al., 1998; BRAYTON et al., 2006). Trabalhos recentes, utilizando avaliação genômica e proteômica, têm sugerido um conjunto de novas proteínas identificadas na superfície da membrana de *A. marginale* como potenciais candidatas à vacina contra anaplasmoose bovina (LOPEZ et al., 2005).

Neste trabalho duas dessas novas proteínas, produzidas em suas formas recombinantes (ARAÚJO et al., 2008), VirB9 e Ef-Tu, foram avaliadas quanto à capacidade de induzir resposta imune humoral em camundongos como uma etapa que antecede sua avaliação no animal alvo da vacinação, o bovino. Essas duas proteínas são capazes de induzir uma resposta imune com perfil protetor contra anaplasmoose em bovinos quando injetadas em sua forma natural, presente nas preparações de proteínas da fração externa de *A. marginale* (LOPEZ et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008).

Metodologia

A produção das proteínas recombinantes VirB9 e Ef-Tu foi realizada em *Escherichia coli*, a partir da inserção de um plasmídeo recombinante contendo um fragmento de DNA correspondente aos genes *virb9* e *ef-tu*. A clonagem dos fragmentos de interesse e, posteriormente, a subclonagem em plasmídeo apropriado para expressão em células procarióticas, pET47b, seguida da expressão do gene recombinante, foram realizadas conforme descrito por Araújo et al. (2008).

Para o estudo foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram mantidos no biotério da Embrapa Gado de Corte. O uso de animais experimentais neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Católica Dom Bosco (035/2009). Foram formados quatro grupos experimentais: Salina, Montanide, rVirB9/Montanide e rEf-Tu/Montanide, sendo duas caixas por grupo, cada uma contendo quatro animais. O grupo Salina e Montanide constituíram os grupos de controle que foram injetados, isoladamente, com solução salina 0,9% e adjuvante Montanide ISA70M VG (Seppic), respectivamente. No grupo rVirB9/Montanide e

rEf-Tu/Montanide foram injetados aproximadamente 30 µg de cada proteína recombinante emulsionada ao adjuvante em cada animal, em três doses com intervalos de 21 dias entre cada uma. As injeções foram via subcutânea, no dorso dos animais, em dois sítios, aplicando-se 100 µL em cada sítio.

A produção de anticorpos anti-rVirB9 e anti-rEf-Tu, classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2a, foi avaliada por meio de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto utilizando os soros obtidos. Para o ELISA, realizou-se a sensibilização de placas de 96 poços com a proteína rVirB9 ou com rEf-Tu, inicialmente tratadas com SDS 2% (LECHTZIER et al., 2002) para completa solubilização. Amostras de soro dos camundongos, diluídas a 1:200 em solução-tampão fosfato-salina (PBS) acrescida de leite desnatado 10% e Tween 20, 0,05% (PBS-T/leite), foram aplicadas em volume de 100 µL/poço em duplicata e incubadas a 37 °C. O conjugado anti-IgG de camundongo (Sigma) diluído 1:10.000 em PBS-T/leite foi aplicado em volume de 100 µL/poço. A interação antígeno/anticorpo foi revelada pela adição de uma solução preparada em tampão citrato-fosfato 0,05M contendo uma pastilha TMB (tetrametilbenzidina – Sigma T-5525) dissolvida em 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e 2 µL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Foram aplicados 100 µL/poço dessa solução. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2M. A leitura das densidades ópticas (DO) dos poços das placas foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

Na avaliação das subclasses de IgG, o procedimento foi semelhante, exceto para os anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2a (BDPharmigham), que foram adicionados aos poços em diluição de 1:500 logo após a incubação das amostras de soro dos camundongos. Como esses anticorpos são biotinizados, foram adicionados 100 µL/poço de avidina-peroxidase (R&D Systems) diluída a 1:200, seguido de incubação a 37 °C, por 45 minutos. A revelação e a leitura ocorreram como descritas no parágrafo anterior. Para análise das subclasses, as amostras foram também avaliadas a partir de diluições seriadas para determinação do título-final de anticorpos.

Resultados e discussão

O uso das proteínas recombinantes de *A. marginale* emulsionadas em Montanide, rVirB9/Mtn e rEf-Tu/

Mtn, para imunização de camundongos resultou na produção de anticorpos específicos em todos os animais injetados, como demonstrado pelos valores de DO obtidos nos ELISAs (Figura 1).

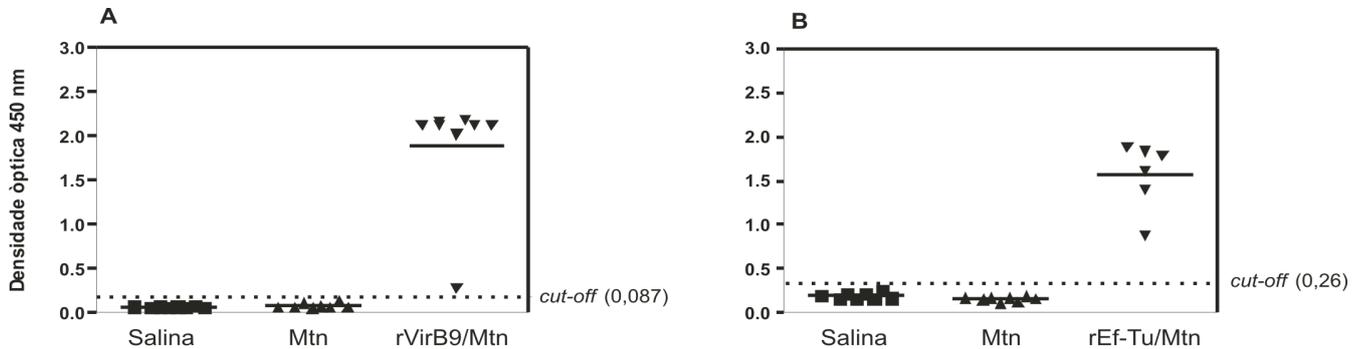


Figura 1. Detecção de anticorpos isotipo IgG em soros de camundongos BALB/c injetados com as proteínas recombinantes. Para a detecção de anticorpos contra rVirB9 (A) e rEf-Tu (B) foi utilizado ELISA indireto com amostras diluídas a 1:200. Os valores estão representados como leituras de densidade óptica (450 nm) para cada animal individual (símbolos ■, ▼, ▲). As barras em cada grupo correspondem à média aritmética. Os valores de ponto de corte (*cut-off*) estão indicados à direita de cada gráfico (linha tracejada).

Os valores dos pontos de corte (*cut-off*), obtidos das leituras de DO dos grupos de controle, foram semelhantes tanto para as amostras do grupo Salina como para as do grupo Montanide. Dessa maneira, todos os valores de DO obtidos das amostras dos animais injetados com rVirB9/Mtn e rEf-Tu/Mtn estavam acima dos valores de ponto de corte, demonstrando a produção de anticorpos específicos do tipo IgG contra rVirB9 e rEf-Tu. Além disso, a comparação das médias obtidas para esses dois grupos em relação aos grupos de controle mostrou que houve uma diferença estatisticamente significativa referente à produção de anticorpos ($p < 0,05$).

Em análise subsequente, observou-se que altos títulos de anticorpos específicos anti-rVirB9 e anti-rEf-Tu foram produzidos após as injeções com as preparações de proteínas recombinantes e adjuvante Montanide (recíproca da média geométrica dos títulos-finais: anti-rVirB9 = 487.099 e anti-rEf-Tu = 23.774).

A participação de resposta imune humoral na proteção contra anaplasmoze bovina é de fundamental importância (TEBELE et al., 1991). Anticorpos específicos podem interagir com o micro-organismo impedindo a infecção de eritrócitos e/ou levando à fagocitose mediada por opsonização, ou seja, a captura do agente causador da doença por células apropriadas desde que este esteja envolvido por anticorpos. O uso de rVirB9 e rEf-Tu emulsionadas em Montanide foi capaz de induzir uma resposta

imune humoral de forte intensidade em camundongos, o que provavelmente pode contribuir com os mecanismos de proteção nos animais alvo da vacinação. Tanto VirB9 como Ef-Tu foram localizadas/identificadas na membrana de *A. marginale* e podem mediar funções importantes para a sobrevivência da riquetsia (LOPEZ et al., 2005). Dessa forma, anticorpos específicos podem interagir e comprometer a sobrevivência e a capacidade de virulência da riquetsia.

A produção de anticorpos específicos, tanto da subclasse IgG1 como da subclasse IgG2a, foi induzida em todos os animais injetados com rVirB9/Montanide ou com rEf-Tu/Montanide (Figura 2), como demonstrado pelos valores de densidades ópticas (DO) obtidos acima do ponto de corte para cada ELISA.

Os valores de títulos-finais obtidos para IgG1 e para IgG2a nos soros dos animais pós-imune (rVirB9/Montanide e rEf-Tu/Montanide), embora elevados, ocorreram em níveis semelhantes, caracterizando um perfil misto de resposta imune humoral (dados não mostrados).

Preparações de membrana de *A. marginale* têm sido utilizadas com sucesso para indução de imunidade protetora em bovinos (TEBELE et al., 1991; BROWN et al., 1998; PALMER et al., 1999). Nesses animais, a imunidade protetora caracteriza-se por um predomínio da indução de anticorpos do isotipo IgG2a. Estes e colaboradores (1994) demonstraram

que a citocina IFN-gama, produzida por linfócitos T, é responsável por aumentar a síntese de IgG2a em bovinos. Desse modo, a produção de anticorpos específicos desse isotipo está diretamente associada à presença de células e mediadores celulares importantes para o controle da infecção.

As proteínas recombinantes VirB9 e Ef-Tu, emulsionadas em Montanide, quando utilizada em camundongos, induzem a produção de anticorpos IgG2a específicos, o que sugere que uma resposta imune mediada por células também possa ter sido induzida por esse processo de imunização. Além disso, nos

camundongos injetados com as proteínas recombinantes houve também a produção de anticorpos IgG1, na mesma intensidade gerada para IgG2a. Em bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale*, quando ocorreu a presença de anticorpos específicos pertencentes aos dois isotipos citados, observou-se proteção parcial com controle da riquetsemia, como demonstrado por BROWN et al. (1998). Assim, o perfil de resposta imune humoral induzido em camundongos pelo uso das proteínas recombinantes VirB9 e Ef-Tu assemelha-se àquele encontrado em bovinos que apresentam proteção parcial contra anaplasnose.

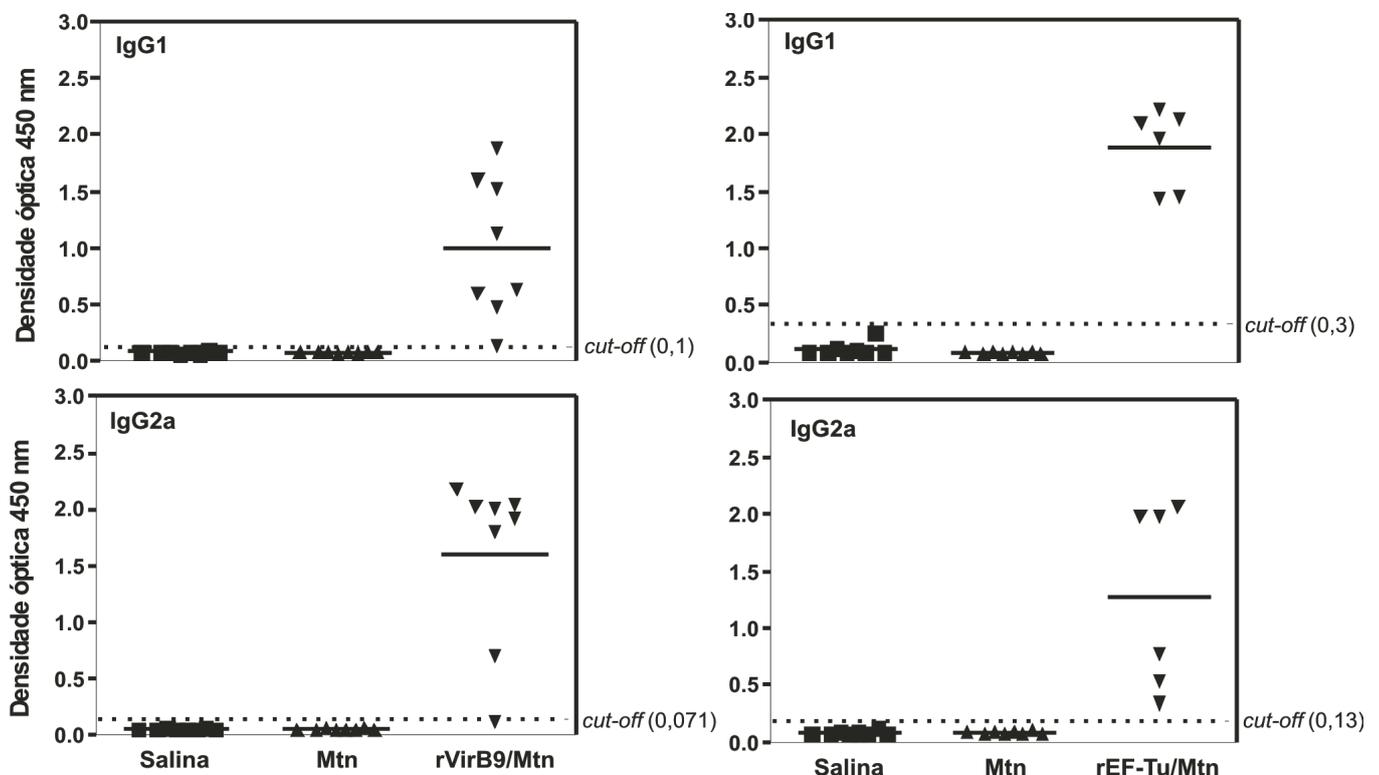


Figura 2. Detecção de anticorpos anti-rVirB9 e anti-rEf-Tu subtipos IgG1 e IgG2a em soros de camundongos BALB/c injetados com as proteínas recombinantes. Para a detecção de anticorpos contra rVirB9 (A) foi utilizado um ELISA indireto com amostras diluídas a 1:5.000 e para anticorpos contra Ef-Tu (B), amostras diluídas a 1:1.000. Os valores estão representados como leituras de densidade óptica (450 nm) para cada animal individual (símbolos ■, ▼, ▲). As barras em cada grupo correspondem à média aritmética. Os valores de ponto de corte (*cut-off*) estão indicados à direita de cada gráfico (linha tracejada).

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), processo número 23/200.062/2008 e uma bolsa de iniciação científica da Embrapa Gado de Corte. Os agradecimentos ao auxílio técnico de Ana Beatriz Castelão (Embrapa Gado de Corte) e Elivani Sacramento (Instituto Oswaldo Cruz, Salvador, BA).

Referências

ARAÚJO, F. R.; COSTA, C. M.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; SOUZA, I. I. F.; MELO, E. S. P.; ELISEI, C.; ROSINHA, G. M. S.; SOARES, C. O.; FRAGOSO, S. P.; FONSECA, A. H. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 186-190, Mar. 2008.

BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 5, n. 1, p. 95-101, 2006.

BRIZUELA, C. M.; ORTELLADO, C. A.; SANABRIA, A.; TORRES, A.; ORTIGOSA, D. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 27-41, Mar. 1998. Issues 1-2.

BROWN, W. C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T. C.; TUO, W.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection and Immunity**, v. 66, n.11, p. 5406-5413, Nov. 1998.

ESTES, D. M., CLOSSER, N. M; ALLEN, G. H. IFN- γ stimulation of IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. **Cellular Immunology**, v. 154, p. 287-295, Apr. 1994. Issue 2.

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, p. 1200-1207, Mar.1998. Issue 3.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. (Ed.). **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 157 p.

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

LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 270, p.19-26, Dec. 2002. Issue 1.

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, Dec. 2005. Issue 12.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K. M.; BROWN, W. C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, p. 281-286, July 1999. Issue 7.

RIDING, G.; HOPE, M.; WALTISBUHL, D.; WILLADSEN, P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, v. 21, p. 1874-1883, May 2003. Issues 17-18.

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

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

CGPE 8275

Comunicado Técnico, 116

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2083
Fax: (67) 3368-2083
E-mail: publicacoes@cnpdc.embrapa.br

1ª edição
 Versão online (2009)

**Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento**



Comitê de publicações

Presidente: Cleber Oliveira Soares
Secretário-Executivo: Grácia Maria S. Rosinha
Membros: Fabiane Siqueira, Ecila Carolina N. Z. Lima, Elane de Souza Salles, Grácia Maria S. Rosinha, Jaqueline Rosemeire Verzignassi, Lucimara Chiari, Paulo Henrique Nogueira Biscola, Roberto Giolo de Almeida, Rodrigo Amorim Barbosa

Expediente

Supervisão editorial: Ecila Carolina N. Zampieri Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Canto
Editoração eletrônica: Ecila Carolina N. Zampieri Lima