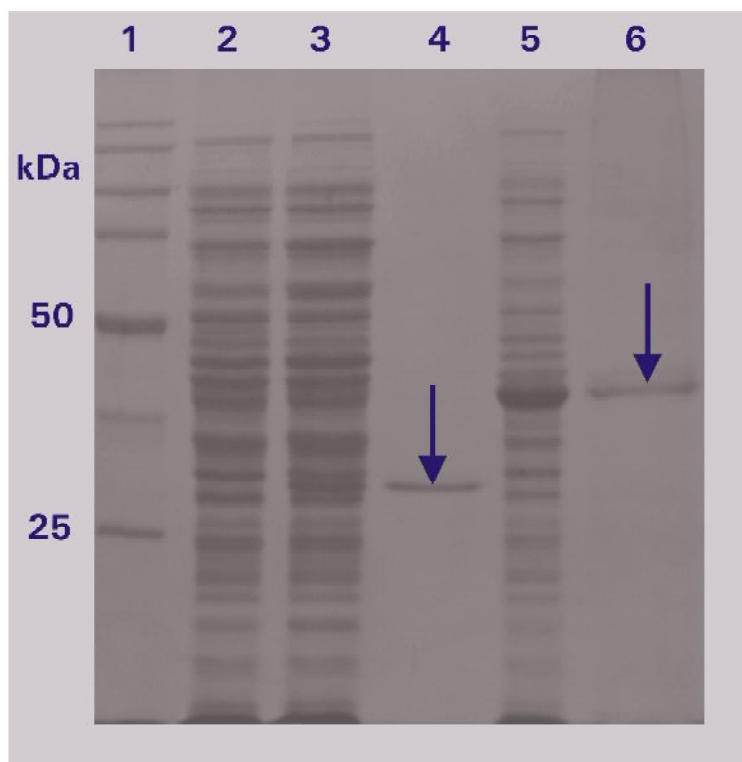


**Imunização de Bovinos com
MSP1a e MSP2 Recombinantes
de *Anaplasma marginale* com
CpG ODN 2006 como
Adjuvante, e Desafio com
Isolado Heterólogo**



ISSN 1679-0790

Maio, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Gado de Corte

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 19

Imunização de Bovinos com MSP1a e MSP2 Recombinantes de *Anaplasma marginale* com CpG ODN 2006 como Adjuvante, e Desafio com Isolado Heterólogo

Flávio Ribeiro Araújo

Cláudio Roberto Madruga

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Elaine Silva de Pádua Melo

Michelle Carmo de Almeida

Stênio Perdigão Fragoso

Raul Henrique Kessler

Cleber Oliveira Soares

Maristeli Barbosa Oliveira

Valter Joost van Onselen

Embrapa Gado de Corte

Campo Grande, MS

2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Ténisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Arquivo Embrapa Gado de Corte*

1ª edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte.

Imunização de bovinos com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* com CpG ODN 2006 como adjuvante, e desafio com isolado heterólogo / Flávio Ribeiro Araújo... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2006.

25 p. ; 21 cm. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1679-0790 ; 19).

Autores: Flávio Ribeiro Araújo, Cláudio Roberto Madruga, Carlos Alberto do Nascimento Ramos, Elaine Silva de Pádua Melo, Michelle Carmo de Almeida, Stênio Perdigão Fragoso, Raul Henrique Kessler, Cleber Oliveira Soares, Maristeli Barbosa Oliveira, Valter Joost van Onselen

ISBN 85-297-0211-5

1. Imunologia. 2. Bovino - Doença. 3. *Anaplasma marginale*. 4. Vacina. I. Araújo, Flávio Ribeiro. II. Madruga, Cláudio Roberto. III. Ramos, Carlos Alberto do Nascimento. IV. Melo, Elaine Silva de Pádua. V. Almeida, Michelle Carmo de. VI. Fragoso, Stênio Perdigão. VII. Kessler, Raul Henrique. VIII. Soares, Cleber Oliveira. IX. Oliveira, Maristeli Barbosa. X. Onselen, Valter Joost van. XI. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). XII. Título. XIII. Série.

CDD 636.0896079 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2006

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução	8
Metodologia	10
Resultados	13
Discussão	19
Conclusão	21
Agradecimentos	21
Referências bibliográficas	22

Imunização de Bovinos com MSP1a e MSP2 Recombinantes de *Anaplasma marginale* com CpG ODN 2006 como Adjuvante, e Desafio com Isolado Heterólogo

*Flábio Ribeiro Araújo*¹
*Cláudio Roberto Madruga*²
*Carlos Alberto do Nascimento Ramos*³
*Elaine Silva de Pádua Melo*⁴
*Michelle Carmo de Almeida*⁵
*Stênio Perdigão Fragoso*⁶
*Raul Henrique Kessler*⁷
*Cleber Oliveira Soares*⁸
*Maristeli Barbosa Oliveira*⁹
*Valter Joost van Onselen*¹⁰

Resumo

A anaplasmosose é uma importante enfermidade de bovinos de áreas tropicais e subtropicais do mundo, causada pela riquetsia intra-eritrocítica *Anaplasma marginale*. A vacinação tem sido a forma mais econômica e eficiente de controlar a anaplasmosose bovina. Nos últimos anos, esses estudos têm se concentrado nas proteínas de membrana da riquetsia, sobretudo MSP1a e MSP2. Este trabalho teve como objetivos avaliar o grau de proteção induzido pelas proteínas de membrana MSP1a e MSP2 recombinantes de *A. marginale*, associadas com adjuvante CpG ODN

¹ Médico-Veterinário, M.Sc. em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flabio@cnpqg.embrapa.br

² Médico-Veterinário, Ph.D. em Parasitologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Bolsista do CNPq, madruga@cnpqg.embrapa.br

³ Médico-Veterinário, Bolsista de Mestrado Fundect-CNPq.

⁴ Bióloga, Bolsista de Mestrado Fundect-CNPq.

⁵ Médico-Veterinário, Bolsista de Apoio Técnico Fundect-CNPq.

⁶ Biólogo, Ph.D., Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, sfragoso@tecpar.br

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

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

⁹ Acadêmica de graduação em Biologia. Bolsista de Iniciação Científica Embrapa.

¹⁰ Médico-Veterinário, Ph.D., Professor Adjunto do Departamento de Produção Animal da UFMS, Campo Grande, MS, onselen@zipmail.com.br

2006, perante desafio heterólogo e avaliar a resposta imune gerada. Novilhos da raça Aberdeen Angus foram imunizados três vezes com 200 µg de MSP1a e/ou MSP2 recombinantes, associadas com CpG ODN 2006 e alúmen. Posteriormente, foram desafiados com 3×10^7 eritrócitos infectados com isolado heterólogo de *A. marginale*. Os animais experimentais apresentaram quadro clínico de anaplasmoses (redução do volume globular, febre e riquetsemias detectáveis por distensões sangüíneas coradas). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos imunizados e os controles quanto ao percentual de redução do volume globular, riquetsemias máximas e temperaturas retais máximas, indicando que as imunizações não foram protetoras. Apesar da significativa produção de IgG total contra MSP1a e MSP2, detectada no dia do desafio, os animais imunizados apresentaram produção significativa de IgG₂ apenas contra MSP1a. As razões para as possíveis falhas de proteção são discutidas.

Termos para indexação: proteínas recombinantes, vacinação, proteínas majoritárias de superfície, imunologia.

Immunization of Cattle with Recombinant MSP1a and MSP2 from *Anaplasma marginale* with CpG ODN 2006 as Adjuvant, followed by Heterologous Challenge

Abstract

*Anaplasmosis is an important disease of cattle of tropical and subtropical areas of the world, caused by the intra-erythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale*. Vaccination has been the most economical and efficient method to control anaplasmosis. In the last years, studies regarding the development of new immunogens have focused on the membrane proteins of the rickettsia, specially MSP1a and MSP2. The objectives of this study were to evaluate the level of protection afforded by recombinant MSP1a and MSP2 of *A. marginale*, associated with CpG ODN 2006, against heterologous challenge, and evaluate the immune response elicited. Aberdeen Angus steers were immunized three times with 200 µg of recombinant MSP1a and/or MSP2, associated with CpG ODN 2006 and alum. Then, cattle were challenged with 3×10^7 erythrocytes infected with a heterologous isolate of *A. marginale*. Animals showed typical signs of anaplasmosis (reduction of packed cell volume, fever and detectable rickettsemias). No differences were detected between immunized and control groups with regards to the degree of reduction of packed cell volume, maximum rickettsemias, or maximum rectal temperatures, indicating that the immunizations were not protective. Despite the significant production of total IgG to MSP1a and MSP2 at the challenge,*

cattle produced significant levels of IgG₂ only against MSP1a. Possibly reasons for the lack of protection were discussed.

Index terms: *recombinant proteins, vaccination, major surface proteins, immunology.*

Introdução

A anaplasmosse bovina é causada pela riquetsia intra-eritrocítica *Anaplasma marginale* (DUMLER et al., 2001). A doença provoca importante impacto em países de clima tropical e subtropical, principalmente por causa de perda de peso, redução da produção de leite, abortos, custos com tratamento de animais enfermos e mortalidade. Outro aspecto importante é a limitação de raças européias *Bos taurus* em programas de melhoramento genético, uma vez que animais dessas raças, oriundos de áreas de clima temperado, são altamente suscetíveis a doenças transmitidas por carrapato, como a anaplasmosse (KOCAN et al., 2003).

Os métodos de imunização atuais incluem a inoculação de sangue de bovinos portadores de *A. marginale* em animais suscetíveis (premunização) ou imunização com *Anaplasma centrale*, espécie menos patogênica (KOCAN et al., 2003). Tais imunógenos são derivados de sangue infectado, resultando em alto custo de produção e risco de disseminação de patógenos desconhecidos ou emergentes (PALMER et al., 1999). Conseqüentemente, as pesquisas atuais enfatizam a identificação dos mecanismos efetores da imunidade protetora contra anaplasmosse e os antígenos-alvo de *A. marginale* (PALMER et al., 1999).

Bovinos imunizados com corpúsculos iniciais de *A. marginale* ou membrana desses apresentaram menores reduções do volume globular e menores riquetsemias após o desafio com isolado virulento da riquetsia, quando comparados com os animais não imunizados (MONTENEGRO-JAMES et al., 1991; TEBELE et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2000).

Na membrana de *A. marginale*, foram identificadas inicialmente seis proteínas majoritárias de superfície (*major surface proteins* - MSPs): MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5. Recentemente, novas proteínas foram descobertas, por fracionamento protéico (RIDING et al., 2003) e análise genômica (BRAYTON et al., 2005).

Destas proteínas, MSP1a e MSP2 têm sido mais intensamente estudadas. Bovinos imunizados com MSP1 (heterodímero MSP1a-MSP1b) ou MSP2 nativas apresentaram proteção, pelo menos parcial, contra desafios com isolados homólogo e heterólogo de *A. marginale* (PALMER et al., 1986; PALMER et al., 1988; PALMER et al., 1989). Os perfis das respostas imunes contra MSP1a e MSP2 também têm sido intensamente estudados (PALMER et al., 1988; BROWN et al., 2001a, 2001b). No entanto, não há estudos avaliando a associação dessas duas proteínas como imunógeno.

A proteção de bovinos imunizados com proteínas de membrana ou corpúsculos iniciais está associada à produção de interferon-gama (IFN- γ) e de altos títulos de imunoglobulina G (IgG), especialmente IgG2 (PALMER et al., 1986; TEBELE et al., 1991; BROWN et al., 1998). Dessa forma, os esforços para o desenvolvimento de vacinas de subunidade contra a anaplasmoose incluem a modulação das respostas imunes para o padrão Th1, com diferentes adjuvantes.

Seqüências imunoestimuladoras de DNA de invertebrados, conhecidas como motivos CpG, consistem de dinucleotídeos CG flanqueados por certas bases que ativam diferencialmente leucócitos de distintas espécies de vertebrados e, também, diferentes populações celulares em uma mesma espécie. Essa estimulação ocorre via receptor *toll-like 9* (TLR9), a qual resulta em uma ativação de genes associados com respostas inflamatórias (ZHANG et al., 2003).

Bovinos imunizados com MSP2 combinada com alúmen e CpG ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT) desenvolveram altos títulos de IgG1 específicos. Além disso, a proliferação específica de linfócito e a frequência de células produtoras de IFN- γ também aumentaram significativamente

nos animais tratados com antígeno e CpG ODN 2006, indicando que esse último é um adjuvante eficiente para estimulação tanto de respostas humorais quanto celulares em bovinos (ZHANG et al., 2003).

Neste trabalho, é relatada a imunização de bovinos com MSP1a e MSP2 recombinantes de *A. marginale*, associadas com alúmen e CpG ODN 2006, e posterior desafio com isolado heterólogo, bem como a avaliação da resposta imune gerada.

Metodologia

Sangue infectado foi obtido mediante a inoculação de um bezerro nelore com isolado Pernambuco-Zona da Mata de *Anaplasma marginale*. O sangue foi coletado em tubos a vácuo com heparina quando a riquetsemia atingiu 87%.

Para obtenção de DNA de *A. marginale*, utilizou-se o *kit Easy DNA* (Invitrogen).

Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos fragmentos de DNA foram delineados pelo programa Primer Select (DNASar). No caso de *mSP1a*, os oligonucleotídeos *mSP1aF* (5' GGGTACGCCACCTATCTCGC 3') e *mSP1aR* (5' AACAAAGCTGTGTAGTAGTGCCGAAGG 3') foram desenhados para amplificar um fragmento que codifica a porção hidrofílica da região carboxi (C)-terminal da proteína MSP1a.

No caso de *mSP2*, os oligonucleotídeos iniciadores *mSP2F* (5' GCAGGCGGCGAGGGTCTATTTTCA 3') e *mSP2R* (5' AGAATCCCCCTAAGCGTTGCCGAACCTCAA 3') foram desenhados para amplificar um fragmento que codifica parte da região amino (N)-terminal conservada, a região central hipervariável (RCH) e toda a região C-terminal da proteína MSP2.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram preparadas em volume de 50 µL, contendo 10 mM de tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM

de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 100 ng de DNA, e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (CenBiot). A amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research), no seguinte esquema: 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por um minuto; anelamento a 61 °C por um minuto para *msh1a* e a 60 °C por um minuto para *msh2*, e extensão a 72 °C por um minuto para *msh1a* e um minuto e meio para *msh2*. Adicionalmente, foi realizada extensão final a 72 °C por sete minutos para ambos os genes.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), e visualizados em transiluminador UV.

Os produtos das reações de amplificação de ambos os genes de *A. marginale* foram clonados e expressos por meio do *kit pTrcHis-TOPO* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade usando resina de agarose-níquel (*ProBond Purification Kit*, Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

Amostras das culturas para as proteínas MSP1a e MSP2 recombinantes, bem como das frações protéicas purificadas, foram suspensas em 200 µL de tampão da amostra 1x e submetidas à eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida a 12 %, seguido de coloração com azul de Coomassie ou transferência para membrana de nitrocelulose.

As proteínas transferidas para membrana nitrocelulose foram incubadas com anticorpo monoclonal (AcMo) anti-histidina (ref. 27-4710-01, Amersham Pharmacia) e, no caso de MSP2, também com AcMo ANAO66A2, específico para aquela proteína (McGUIRE et al., 1984). Os AcMo anti-histidina e anti-MSP2 foram diluídos, respectivamente, a 1:6.000 e 1:2.000, em salina fosfatada com 0,1 % de *tween* (PBST) e 10% de leite desnatado. O anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (ref. A-9044, Sigma) foi diluído a 1:2.000 em PBST. As

reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB, Sigma)/H₂O₂.

Treze bovinos Aberdeen-Angus, de ambos os sexos, com idades ao início do experimento variando de 11 meses a 1 ano, negativos para anticorpos contra *A. marginale* por ELISA indireto com MSP1a e MSP2 recombinantes, e negativos na PCR para *msp5*, foram alocados em baias individuais em área de isolamento telada da Embrapa Gado de Corte. A alimentação dos animais durante o experimento consistiu de feno de *Brachiaria decumbens*, concentrado (milho, calcário e farelo de soja), sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram inicialmente adaptados às baias por três meses, para diminuir o estresse durante o manejo.

As proteínas MSP1a e MSP2 recombinantes, com o adjuvante CpG ODN 2006 (Alpha DNA), foram emulsificadas em alúmen estéril (40%, v/v) (Serva). As proteínas recombinantes foram empregadas na dosagem de 200 µg e o CpG ODN 2006, a 250 µg.

Os bovinos foram alocados nos seguintes grupos de tratamento: Grupo 1 - MSP2 + MSP1a + CpG ODN 2006 + alúmen (quatro animais); Grupo 2 - MSP2 + CpG ODN 2006 + alúmen (três animais); Grupo 3 - CpG ODN 2006 + alúmen (três animais); Grupo 4 - alúmen + salina estéril (três animais).

Os tratamentos descritos foram feitos três vezes, com intervalo de um mês.

Três semanas após a última imunização, os animais foram desafiados, por via subcutânea, com cerca de $3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados com *A. marginale*, isolado heterólogo de Mossoró, RN.

Os animais foram monitorados clínico e laboratorialmente para aferição da temperatura retal, determinação do volume globular (VG), presença de IgG e IgG₂ contra MSP1a e MSP2 por ELISA indireto, PCR para amplificação do gene *msp5* de *A. marginale*, e determinação da ricketsemia, por meio da análise de distensões sangüíneas coradas com panótico rápido.

As avaliações foram realizadas nas três imunizações, no dia do desafio e nos dias 7, 14, 21, 28 e 37 pós-desafio (DPD), exceto as determinações de VG e ricketsemias, as quais foram feitas três vezes por semana.

Os ELISAs indiretos para detecção de anticorpos IgG contra MSP1a e MSP2 foram realizados conforme metodologia descrita por ARAÚJO et al. (2004).

Para os ELISAs visando a detectar IgG₂ contra MSP1a e MSP2, utilizou o AcMo MCA626 (Serotec) e anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (ref. A-9044, Sigma). As reações foram reveladas com *o*-fenildiamino-OPD (Sigma)/ H₂O₂ e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek) com filtro de 490 nm.

Os pontos de corte para os ensaios foram determinados segundo metodologia descrita por FREY et al. (1998), com intervalo de confiança de 99%, com 12 soros negativos para anticorpos contra *A. marginale*.

Resultados

As amplificações de *msp1a* e *msp2* por PCR, como esperado, resultaram em fragmentos de cerca de 626 e 1.211 pares de bases (pb), respectivamente. A expressão dos genes resultou em proteínas de 33 e 42,2 kDa, respectivamente (Fig. 1). Essas proteínas reagiram com AcMo anti-histidina e a MSP2 recombinante também reagiu com AcMo ANA66A2 (Fig. 2).

No início do experimento, todos os animais foram negativos para *A. marginale* pela análise de distensões sanguíneas coradas, por PCR para *msp5* e ELISA para MSP1a e MSP2.

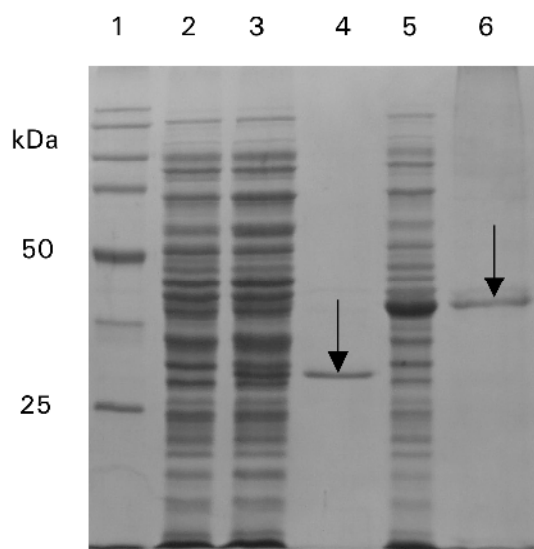
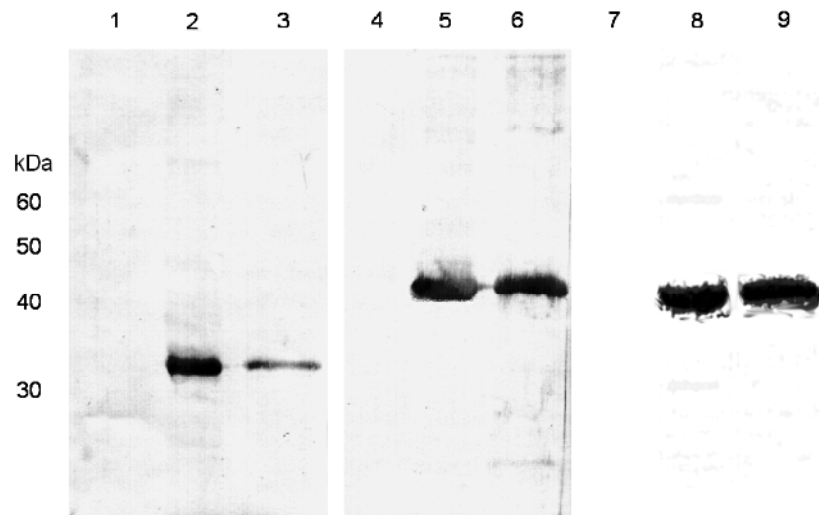


Fig. 1. Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida de extratos de *Escherichia coli* expressando *msp1a* e *msp2* de um isolado brasileiro de *Anaplasma marginale*. Linhas - 1: marcador de massa molecular (ref. V8491, Promega); 2: extrato de *E. coli* TOP10; 3: indução por 6 horas de *msp1a* com IPTG; 4: MSP1a purificada recombinante (seta); 5: indução por 6 horas de *msp2* com IPTG; 6: MSP2 purificada recombinante (seta).

As detecções iniciais de *A. marginale* por distensões sangüíneas coradas ocorreram no nono dia pós-desafio (DPD) e, no 19º DPD, todos os animais apresentaram riquetsemias detectáveis pela análise de distensões sangüíneas coradas. Por PCR, as detecções iniciais ocorreram no 7º DPD, mas no 9º DPD, todos os animais já estavam positivos. Sem exceção, os animais estavam positivos no final do experimento (37º DPD) por PCR e 76,9% deles ainda apresentavam riquetsemias detectáveis pelo exame de distensões sangüíneas coradas, embora em baixos níveis.



Linhas 1-6: anticorpo monoclonal anti-histidina e (1) extrato de *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp1a* sem indução com IPTG; (2) extrato de *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp1a* induzida com IPTG; (3) MSP1a recombinante purificada; (4) extrato de *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp2* sem indução com IPTG; (5) extrato de *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp2* induzida com IPTG; (6) MSP2 recombinante purificada; Linhas 7-9: anticorpo monoclonal anti-MSP2 ANAO66A2 e (7) extrato de *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp2* sem indução com IPTG; (8) extrato de *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp2* induzida com IPTG; (9) MSP2 recombinante purificada.

Fig. 2. Western blot com MSP1a e MSP2 recombinantes de um isolado brasileiro de *Anaplasma marginale* e anticorpos monoclonais anti-histidina e anti-MSP2 ANAO66A2.

Os volumes globulares (VGs) e temperaturas retais dos animais estavam normais e não diferiram entre grupos da primeira imunização até o desafio. ($P > 0,05$). Após o desafio, os VGs declinaram significativamente em todos os grupos ($P < 0,01$), assim como houve aumento significativo das temperaturas retais ($P < 0,05$), confirmando a virulência do isolado utilizado para o desafio.

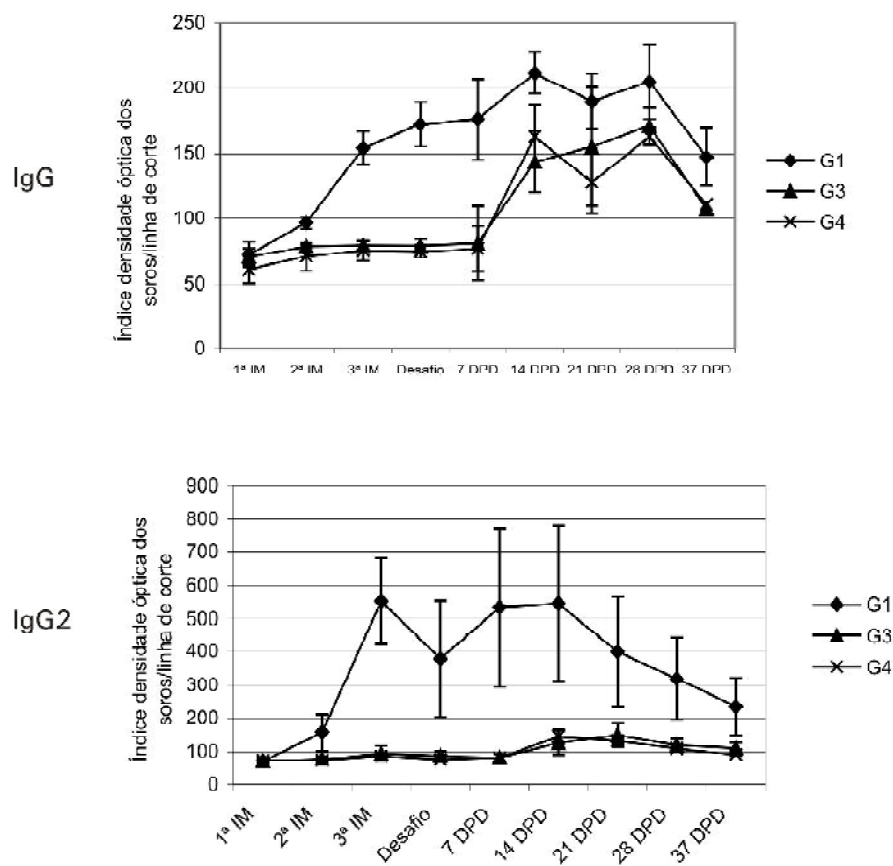
No entanto, não houve diferenças significativas entre grupos, com relação aos percentuais de redução de VG e de aumento de temperatura retal; nem com relação às riquetsemias máximas ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros clínicos e hematológicos de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, após desafio com isolado heterólogo da riquetsia.

Grupo	Tratamento	N° de animais	Riquetsemia máxima (%)	Declínio máximo de volume globular (%)	Aumento de temperatura (%)
1	MSP1a/MSP2/CpG 2006/alúmen	4	7,5	68,1	4,6
2	MSP2/CpG 2006/alúmen	3	9,6	69,1	4,4
3	CpG 2006/ alúmen	3	5,8	69,3	3,7
4	Alúmen	3	8,7	69,0	3,5

Com relação à produção de anticorpos, no dia do desafio, os níveis de IgG e IgG₂ contra MSP1a foram significativamente superiores nos animais imunizados (grupo 1) quando comparados aos níveis dos animais-controle (grupos 3 e 4). Após o desafio, os níveis máximos de IgG e IgG₂ contra MSP1a ocorreram simultaneamente com os picos de riquetsemia, e em seguida caíram, permanecendo ao final do experimento em níveis superiores aos do desafio (Fig. 3).

No dia do desafio, os níveis de IgG contra MSP2 também foram significativamente superiores nos animais imunizados (grupos 1 e 2), comparados com os animais-controle (grupos 3 e 4). Após o desafio, os níveis máximos de IgG contra MSP2 ocorreram simultaneamente com os picos de riquetsemia, e em seguida caíram, permanecendo ao final do experimento em níveis semelhantes aos do desafio (Fig. 4). No entanto, não houve diferenças significativas entre grupos com relação aos níveis de IgG₂ contra MSP2 no dia do desafio (Fig. 4).



Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alumínio

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alumínio

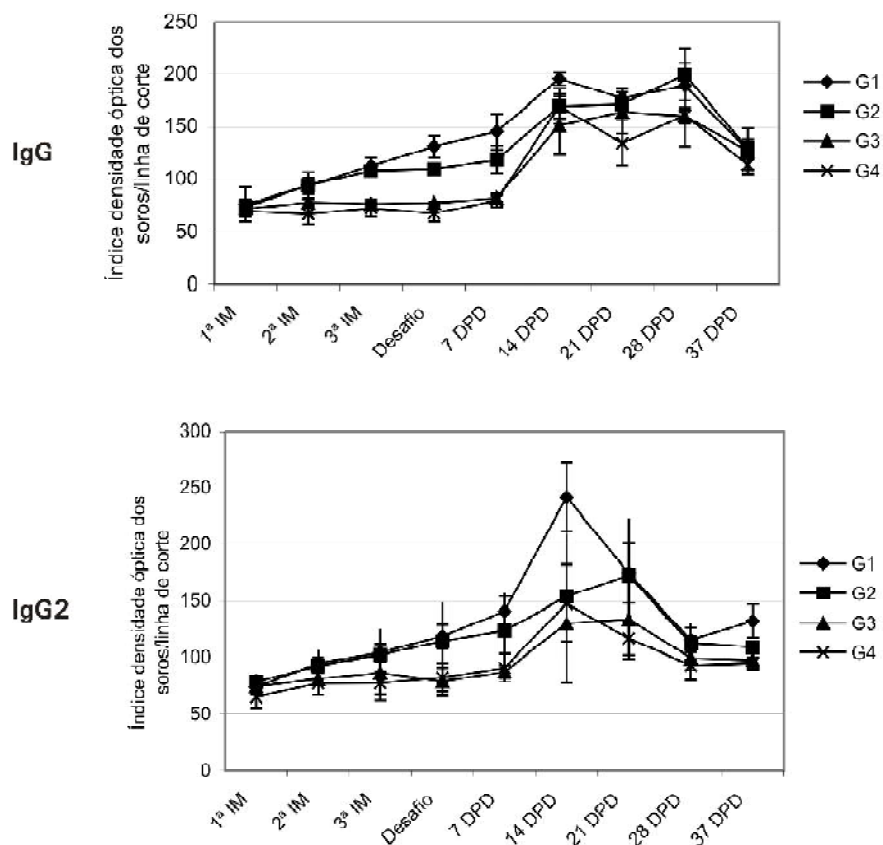
Grupo 4: Alumínio

*Resultados expressos como índice da densidade óptica (DO) dos soros testados e a linha de corte da respectiva placa de ELISA.

IM = imunização

DPD = dia pós-desafio

Fig. 3. Produção de IgG e IgG₂ contra MSP1a em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.



Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

*Resultados expressos como índice da densidade óptica (DO) dos soros testados e a linha de corte da respectiva placa de ELISA.

IM = imunização

DPD = dia pós-desafio

Fig. 4. Produção de IgG e IgG₂ contra MSP2 em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.

Discussão

A vacinação tem sido a forma mais eficiente e econômica de controle da anaplasmoze, uma dos importantes objetivos da indústria pecuária mundial (PALMER, 1989).

As pesquisas recentes visando ao desenvolvimento de novas vacinas para controle da anaplasmoze estão focadas nas proteínas majoritárias de superfície (MSPs) de *A. marginale*. Das seis proteínas identificadas inicialmente (PALMER e McGUIRE, 1984; BARBET et al. 1987; OBERLE et al., 1988; TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993), MSP1a e MSP2 têm sido mais estudadas e parecem ser as mais promissoras para o desenvolvimento de vacinas de subunidade.

MSP1a é uma proteína cujas funções estão ligadas à aderência às células dos hospedeiros vertebrado e invertebrado; infecção e transmissão de *A. marginale*, assim como contribui para imunidade protetora em bovinos contra a anaplasmoze (McGAREY e ALLRED, 1994; BROWN et al., 2001b; FUENTE et al., 2001).

MSP2 é uma proteína imunodominante, composta de um fragmento central hipervariável, flanqueada por regiões altamente conservadas. Durante a infecção por *A. marginale*, eventos de recombinação gênica de *msh2* e seus pseudogenes resultam no aparecimento seqüencial de novas variantes de MSP2 e subsequente controle da riquetsemia pelo sistema imune, levando à infecção persistente (FRENCH et al., 1999; BRAYTON et al., 2001; BRAYTON et al., 2002).

A imunização de bovinos com ambas as proteínas estimulou forte resposta humoral e celular de memória (BROWN et al., 1998; BROWN et al., 2001a, 2001b), sugerindo que essas proteínas podem gerar imunidade protetora contra *A. marginale*.

Neste trabalho, avaliou-se a associação de MSP1a e MSP2 recombinantes, com adjuvante CpG ODN 2006, como imunógeno contra desafio heterólogo com *A. marginale*.

A ausência de diferenças significativas entre os grupos imunizados e controles com relação à redução de VG, o aumento de temperatura e as riquetsemias máximas indicam que a imunização com MSP1a e MSP2 recombinantes, ou MSP2 isoladamente, com o adjuvante CpG ODN 2006, não foi protetora contra anaplasmoses.

A despeito da ausência de proteção, a imunização estimulou uma significativa produção de IgG contra MSP1a e MSP2, bem como de IgG₂ contra MSP1a. No entanto, não houve resposta significativa de IgG₂ contra MSP2.

Apesar dos padrões distintos de resposta de IgG₂ contra MSP1a e MSP2, tais diferenças não refletiram no grau de proteção contra anaplasmoses entre os grupos vacinados com MSP1a/MSP2 e apenas com MSP2, como seria de se esperar, em função da proteção contra essa doença estar associada à produção de IgG₂ (BROWN et al., 1998).

A ausência de proteção pode ter ocorrido, dentre outros fatores, por uma resposta celular deficiente. Essa hipótese não foi testada neste trabalho, mas em experimentos similares, nos quais 50 µg de MSP2 associados com 1 mg de CpG ODN 2006 foram usados para imunizar bovinos por cinco a seis vezes. Uma forte resposta T CD4⁺, com produção de IFN-γ, foi detectada (ZHANG et al., 2003, ABBOTT et al., 2005).

Em artigo publicado após a conclusão deste trabalho, demonstrou-se que, apesar de uma forte resposta humoral (IgG₁ > IgG₂) e celular (T CD4 + padrão Th1) ser estimulada pela imunização de bovinos com MSP2 nativa, em associação com CpG ODN 2006 ou IL-12 recombinante, após o desafio com 3 x 10³ eritrócitos infectados com isolado homólogo de *A. marginale*, não houve proteção (ABBOTT et al., 2005). Essa ausência de proteção estava associada com uma rápida e prolongada perda de respostas T CD4⁺ específicas para MSP2, após o desafio com *A. marginale*.

O desaparecimento de respostas T CD4⁺ de memória não pôde ser explicado por mecanismos já conhecidos (exemplo, emergência de varian-

tes distintas de MSP2, células supressivas), mas estava correlacionado com a presença de relevantes números de corpúsculos de *A. marginale*, sugerindo um mecanismo desconhecido de modulação do sistema imune bovino pela riquetsia (ABBOTT et al., 2005).

Esse modelo só foi observado até o momento com bovinos imunizados com MSP2, mas o fato de *A. marginale* inibir, de maneira dose-dependente, a proliferação de linfócitos (BROWN et al., 1998; ABBOTT et al., 2005) sugere que essa riquetsia pode exercer efeito regulador negativo sobre o sistema imunológico bovino, o que pode ter sido a causa da ausência de proteção observada no presente estudo.

Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de regulação exercidos por *A. marginale* sobre o sistema imunológico bovino, para delineamento de estratégias mais eficientes de imunização contra essa riquetsia.

Conclusão

A imunização de bovinos com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* com CpG ODN 2006 como adjuvante não protege contra desafio com isolado heterólogo.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ao funcionário da Embrapa Gado de Corte Rubens Soares, pela assistência nas coletas de material.

Referências

- ABBOTT, J. R.; PALMER, G. H.; KEGERREIS, K. A.; HETRICK, P. F.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. Rapid and long-term disappearance of CD4+ T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 11, p. 6702-6715, 2005.
- ARAÚJO, F. R.; MELO, V. S. P.; RAMOS, C. A. N.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, G. S.; ALVES, L. C.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; FRAGOSO, S. P.; ARAUCO, P. R. C.; BACENELLI, G.; OLIVEIRA, M. B. **Desenvolvimento de ensaios de imunoadsorção enzimática baseados em MSP1a e MSP2 recombinantes de isolado brasileiro de *Anaplasma marginale***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. 24 p. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 17).
- 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**, Bethesda, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.
- BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D.R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES JUNIOR, D. P. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.
- BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 7, p. 4130-4135, 2001.
- BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; LUNDGREN, A.; YI, J.; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 1151-1159, 2002.

BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; ZHU, D.; LEWIN, H. A.; SOSNOW, J.; PALMER, G. H. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, p. 1114-1124, 2001a.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4⁺ T Lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1); a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b; preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, p. 6853-6862, 2001b.

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**, Bethesda, v. 66, p. 5406-5413, 1998.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

FRENCH, D. M.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 11, p. 5834-5840, 1999.

FREY, A.; DI CANZI, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 221, p. 35-41, 1998.

FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 145-153, 2001.

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

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

McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; GOFF, W. L.; JOHNSON, M. I.; DAVIS, W. C. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 697-700, 1984.

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**, Berlin, v. 7, p. 93-101, 1991.

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

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.

OLIVEIRA, J. B.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; ARAÚJO, F. R. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 395-400, 2003.

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

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G. H.; McGUIRE, T. C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 57, n. 11, p. 3666-3669, 1989.

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

PALMER, G. H.; McELWAIN, T. F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 57, p. 233-253, 1995.

PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 133, n. 2, p. 1010-1015, 1984.

PALMER, G. H.; OBERLE, S. M.; BARBET, A. F.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1526-1531, 1988.

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**, Amsterdam, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.

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

RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA ORTIZ, M. A.; HERNANDEZ SALGADO, G.; SANTOS CERDA, N. A.; ABOYTES TORRE, R.; CANTO ALARCON, G. J. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 239-252, 2000.

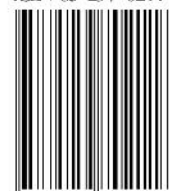
TEBELE, N.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

ZHANG, Y.; PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. CpG ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a rickettsial outer membrane protein in alum. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, n. 23, p. 3307-3318, 2003.



Gado de Corte

ISBN 85-297-0211-5



9 788529 702117

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**