

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E CELULAR DE CAMUNDONGOS  
BALB/C IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA rMSP1 $\alpha$  OBTIDA DO ISOLADO  
UFMG2 DE *Anaplasma marginale*.**

**BRUNA TORRES SILVESTRE**

Belo Horizonte

2013

**BRUNA TORRES SILVESTRE**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E CELULAR DE CAMUNDONGOS  
BALB/C IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA rMSP1a OBTIDA DO ISOLADO  
UFMG2 DE *Anaplasma marginale*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

**Orientador:** Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

**Co-Orientadora:** Dr.<sup>a</sup> Élide Mara Leite Rabelo

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte

2013

**Orientação:**

- Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro <sup>I</sup>

**Co-orientação:**

- Dr<sup>a</sup> Élide Mara Leite Rabelo <sup>II</sup>

**Colaboradores:**

- Dr. Flávio Guimarães da Fonseca <sup>III</sup>
- Dr. Ricardo Toshio Fujiwara <sup>IV</sup>
- Dr<sup>a</sup>. Lilian Lacerda Bueno <sup>IV</sup>

I – Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

II – Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG;

III – Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG;

IV – Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar  
de pé sobre ombros de gigantes...”*

Isaac Newton

*“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família.”*

Léon Tolstoi

Dedico este trabalho aos meus pais, Adilson e Janete, a minha irmã Ana Paula, e ao meu grande amor Alcimar, que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, me dando carinho, apoio, incentivo, fé, e principalmente amor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar comigo em todos os momentos, iluminando-me, protegendo-me, e sendo meu refúgio e fortaleza nos momentos difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pelo apoio, pela confiança e pelo grande exemplo de compromisso e ética. Seus ensinamentos foram de fundamental importância para a concretização deste trabalho.

A minha co-orientadora, Prof. Élide Mara Leite Rabelo, que durante estes dois anos tornou-se uma grande amiga, com quem pude contar em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pelo carinho e apoio.

Ao Prof. Flávio Guimarães da Fonseca pela colaboração no trabalho e por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para realização dos meus experimentos.

Ao Prof. Ricardo Fujiwara e a Lilian Lacerda Bueno pela colaboração na parte da citometria de fluxo, pela disponibilidade e pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

Ao Jamil, funcionário do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, pelos grandes ensinamentos quanto à expressão de proteína. Sem a sua ajuda provavelmente eu não conseguiria solucionar os problemas que surgiram durante o experimento. Minha eterna gratidão!!!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG e aos professores e funcionários do departamento por participaram direta e indiretamente da minha formação como Parasitologista. Em especial ao Prof. Alan Lane de Melo, pelas conversas, pelo carinho, e por se tornar um grande amigo e mentor da Turma do Pepino. Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos por disponibilizarem o uso do ÄKTA, ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos pelo uso do leitor de

ELISA, do agitador e de inúmeros equipamentos, em especial ao Prof. Nelder, ao Vladimir e a Rafaela que sempre foram solícitos; e ao Laboratório de Genética e Bioquímica pela utilização da estrutura do laboratório.

A Sumara e Sibebe, secretárias da Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, pela disponibilidade e prontidão em resolver nossos problemas.

As amigas do Laboratório de Protozoologia Veterinária: Paula, Mercês, Camila, Júlia e Diana, pelo apoio e disposição em me ajudar durante os experimentos. Em especial, agradeço a Mercês, minha mãezinha de coração, que me ensinou tudo o que sei sobre cultivo celular.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular: Ana Cristina, Ana Flávia, Luciana Serafim, Carina, Fernando, Thayse, William, Vivian e Ione. Em especial agradeço a Ana Cristina pelo carinho, companheirismo e disposição em me ajudar no que foi preciso; a Luciana Serafim, que se tornou uma grande amiga e companheira de almoço; a Ana Flávia, que dividiu comigo os perrengues da expressão e purificação da proteína; e a Thayse e o William que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Agradeço a Silvia Regina Costa Dias, pelas dúvidas tiradas no corredor, pela paciência e disposição em me ajudar.

A Alice Versiani que foi meu braço direito neste trabalho. Obrigada pela disponibilidade, pela paciência, por compartilhar comigo os altos e baixos desta pesquisa e, principalmente, pela amizade.

Ao Rodrigo Lourdes pela disponibilidade em retirar o sangue dos animais sempre que precisei, e ao Tiago Mendes pela ajuda nos programas de predição de epítomos.

A minha querida Turma do Pepino, que foi, é e sempre será a melhor turma de mestrado desta instituição. Obrigada pelas conversas, pelas risadas e por compartilharem comigo todos os ensinamentos da Parasitologia. Em especial agradeço a Luciana Laranjo pela amizade; ao João, que de um simples colega de turma se tornou um grande amigo com quem pude contar durante meus experimentos; a Ana Luiza e a Lívia, que me ajudaram

na parte de citometria de fluxo; a Aliani, Júnior e a Bruninha por me socorreram na hora das fotos dos mil géis e membranas de Western. Obrigada a todos!!!

A minha grande amiga Érica Munhoz, que em pouco tempo se tornou uma pessoa especial na minha vida. Obrigada pelas apresentações de trabalho, por ser minha companheira de ônibus (e às vezes de carro), por ter quase morrido de fome quando me esperava para almoçar, por entender que 5 minutos na verdade são 40, por ter me ajudado no meu experimento, e enfim, por ser simplesmente minha amiga. Obrigada por tudo!!!

Agradeço especialmente aos meus pais, Adilson e Janete, que sempre me ensinaram a lutar pelos meus ideais, sem me esquecer de que o amor, a honestidade e a simplicidade são os principais valores da vida; a minha irmã, Ana Paula, por dividir comigo as alegrias e as tristezas, e por me ensinar que um sorriso pode mudar tudo.

Ao meu esposo, Alcimar, pelo amor, pelo carinho, pela paciência, pela compreensão da ausência, e por ter vivenciado comigo todas as etapas deste trabalho. Obrigada por fazer os meus dias mais felizes, e por participar e acreditar nos meus sonhos. Amo você!!!

A minha companheira fiel, Lilika, por me receber na porta de casa todos os dias, independente da hora; pelos momentos de companhia e pelas horas de diversão e brincadeiras.

Também agradeço aqueles que foram de fundamental importância ao meu trabalho: os camundongos, que possibilitaram a realização deste estudo. Espero tê-los tratado com respeito e dignidade.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância  
Balb/c – linhagem de camundongos albinos  
bp – pares de bases  
BrdU - bromodeoxiuridina  
BSA – albumina de soro bovino  
CBA - *Cytometric Bead Array*  
CD – “Cluster of differentiation”/grupamento de diferenciação  
Cebio - Centro de Bioterismo  
CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal  
cm - centímetro  
CTL – linfócito T citotóxico  
DAB - 3,3’ diaminobenzidina  
DMSO – Dimetil Sulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
EDAC - N-etil-N’-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida  
ELISA – *Enzyme Lynked Immunossorbent Assay*  
FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography  
FSC - *Forward Scatter*  
hs – horas  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
HNO<sub>3</sub> – ácido nítrico  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico  
ICB – Instituto de Ciências Biológicas  
IDE8 – linhagem de células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis*  
IgG – Imunoglobulina G  
IL - interleucina  
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo  
M – molar

$\mu\text{g}$  – micrograma  
 $\mu\text{l}$  – microlitro  
MG – Minas Gerais  
mL – mililitro  
 $\mu\text{m}$  – micrômetros  
 $\mu\text{M}$  – micromolar  
mm - milímetro  
mM – milimolar  
MOPS - (3-(N-Morfolino) Ácido Propanossulfônico  
MSP – *major surface protein*  
rMSP1a – MSP1a recombinante  
MWNT – nanotubos de carbono de paredes múltiplas  
MHC – *major histocompatibility complex*  
NaCl – cloreto de sódio  
ng – nanograma  
NHS - N-hidroxisuccinimida  
nm – nanômetro  
nM – nanomolar  
NTCs – nanotubos de carbono  
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*  
O.D – densidade ótica  
OPD - O-Fenilenodiamina  
PBS – *Phosphate Buffer Saline*  
PBST – PBS 1x + 0,05% de Tween 20  
pH – potencial hidrogeniônico  
PM – padrão de peso molecular  
PVDF – *Polyvinylidene fluoride*  
RBS – *Ribosome Binding Site*  
RNA – ácido ribonucléico  
rpm – rotações por minuto  
RPMI – meio de cultura desenvolvido pelo *Instituto Roswell Park Memorial*  
SDS – duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

SSC - *Side Scatter*

SWNT – nanotubos de carbono de parede simples

Tampão MES - Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado

TEMED – N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina

Th1 – resposta imune do tipo 1

Th2 – resposta imune do tipo 2

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Tris-HCL – tris hidrocloreto

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFMG2 – isolado de *A. marginale* altamente patogênico

V – volts

X – vezes

xg – vezes gravidade

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema do ciclo de desenvolvimento do *A. marginale* em bovinos e carrapatos. (Kocan et al. 2003)..... 29
- Figura 2** - Estruturas dos nanotubos de parede simples - SWNT (A) e de paredes múltiplas – MWNT (B). (Foldvari & Bagonluri 2008)..... 39
- Figura 3** - Seqüência gênica parcial da proteína MSP1 $\alpha$  (GenBank EU676175.1) obtida do isolado UFMG2 de *A. marginale*. ..... 51
- Figura 4 - Desenho esquemático do vetor de expressão *pJexpress414*.** Neste plasmídeo observam-se os sítios de origem de replicação (ori); gene da  $\beta$ - galactosidase que permite a seleção de organismos contendo o plasmídeo; o gene de resistência a ampicilina; sítio sintético de ligação ao ribossomo (RBS); região do promotor T7; sítio múltiplo de clonagem (SMC) que contém na porção 5' sítios para enzimas de restrições *NdeI* e *XhoI*, seqüência codificadora da proteína MSP1 $\alpha$ , seqüência que codifica uma cauda de seis histidinas da proteína produzida, e o códon de terminação na porção C-terminal..... 52
- Figura 5 - Desenho esquemático do processo de funcionalização covalente entre MWNT e rMSP1 $\alpha$ :** 1) oxidação em ácido nítrico para adicionar radicais carboxila aos MWNT; 2) a adição do agente acoplante EDAC leva a formação de um composto intermediário altamente reativo, porém instável em solução aquosa; 3) adição do NHS forma um éster ativo mais estável; 4) o éster ativo sofre uma reação de substituição nucleofílica e reage com os grupos amina das proteínas, formando a ferramenta MWNT+rMSP1 $\alpha$ ..... 59
- Figura 6 – Desenho esquemático da padronização da proporção MWNT : rMSP1 $\alpha$  utilizado no processo de funcionalização covalente.**..... 60

**Figura 7 - Esquema do protocolo de imunização de 3 doses (dose-reforço-reforço):**

As doses foram administradas via subcutânea com 200 µl das soluções apresentadas na tabela 1, com intervalo de 21 dias entre as imunizações. A coleta do sangue foi realizada 11º dia após a 1ª dose e o 1º reforço, e o sacrifício dos animais foi realizado no 14º dia após o 2º reforço para coleta de sangue e baço. .... 62

**Figura 8 – Colônia de *A. marginale* em células IDE8 após 12 a 14 dias de infecção *in vitro* (aumento 100x).** ..... 64

**Figura 9 - Predição de epítomos de células B e CTL:** A seqüência da MSP1a-UFMG2 foi submetida a análise de predição de epítomos de células B (letra A) e CTL (letra B) utilizando os softwares *BepiPred* e *NetCTL*. A letra C representa a localização de todos os epítomos preditos pelos servidores. .... 71

**Figura 10 - (A) Gel SDS-PAGE 15% corado por azul de Coomassie indicando o melhor tempo de indução da expressão da rMSP1a:** T0 = clones de *E. coli* BL-21 não induzidos com IPTG; T1 a T16 = tempos de expressão, em horas, após a indução com IPTG 1 M; PM = marcador de peso molecular. (B) Western blot da rMSP1a após a lise bacteriana, indicando a presença da proteína na fração solúvel da cultura: S = sobrenadante da lise bacteriana (fração solúvel); P = pellet da lise bacteriana (fração insolúvel); PM = marcador de peso molecular. O anticorpo mouse anti-histidina (GE Healthcare Life Sciences), diluído 1:2000 foi utilizado como anticorpo primário. .... 72

**Figura 11 - Gel SDS-PAGE 15% da purificação da rMSP1a através de cromatografia de afinidade ao níquel utilizando colunas de níquel *HisTrap HP*<sup>®</sup> (GE Healthcare):** Descarte = porção protéica não ligada à coluna de níquel; rMSP1a eluída = proteína eluída da coluna após adição do tampão de eluição (500 mM de imidazol); PM = marcador de peso molecular. .... 73

**Figura 12 - Solubilização dos MWNT em água deionizada:** A) Cristais de MWNT carboxilados. B) MWNT adicionados em água deionizada antes de serem sonicados. C) Solução contendo MWNT solúveis (imagem cedida por Astigarraga et al. 2011). .... 74

**Figura 13 - Gel SDS-PAGE 15% da padronização da funcionalização MWNT+rMSP1a:** Os sobrenadantes das lavagens foram aplicados em gel SDS-PAGE 15%, com objetivo de identificar a proporção ideal de MWNT : rMSP1a. 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> correspondem, respectivamente, a primeira, segunda e terceira lavagem após a funcionalização. 1:1 = proporção igual peso/peso de MWNT e rMSP1a; 1:3 = três vezes a quantidade de rMSP1a em relação aos MWNT; 1:5 = cinco vezes a quantidade de rMSP1a em relação aos MWNT; e 1:10 = dez vezes a quantidade de rMSP1a em relação aos MWNT..... 75

**Figura 14 - Padronização do teste de ELISA:** (A) Padronização da concentração de rMSP1a foi determinada em 0,12 µg/poço (S/N = 6,85); (B) A diluição ideal dos soros dos animais foi de 1:400 (S/N = 37,0); (C) A melhor diluição do conjugado foi de 1:20000 (S/N = 33,25). Os soros foram testados em pools de grupo (positivos = grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e Vacina Completa; controle = grupo PBS)..... 76

**Figura 15 - Detecção de anticorpos anti-rMSP1a no soro dos camundongos após as imunizações:** Os soros dos camundongos foram utilizados em ensaios de ELISA, na diluição 1:400, para detecção de anticorpos anti-rMSP1a. Diferenças significativas foram observadas entre a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> dose nos grupos rMSP1a e MWNT+rMSP1a. No grupo vacina completa, houve diferença significativa apenas entre a 1<sup>a</sup> dose e as subseqüentes. As letras a, b e c representam a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> dose, respectivamente. Cada barra representa a média ± desvio padrão do grupo (n=6). Análise estatística por ANOVA, com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. (\*\*\*)= p<0,001). ..... 77

**Figura 16 - ELISA anti-Mouse IgG rMSP1a do soro dos animais após a 3<sup>a</sup> imunização:** Os soros dos animais - dos grupos PBS, rMSP1a, MWNT+rMSP1a e Vacina Completa foram diluídos partindo-se de 1:400 até 1:291600, utilizando o conjugado anti-IgG peroxidase na diluição 1:20000. O valor do *cut off* (representado pela linha pontilhada ---- ) foi utilizado para determinar o ponto limite entre as amostras positivas e negativas. O *cut off* representa a média da absorbância do grupo PBS (1:400) + 3 x desvio padrão..... 78

**Figura 17 - Western Blot da rMSP1a com o soro dos animais após as imunizações:** Os soros foram testados em *pools* de grupo (n=6), sendo diluídos de 1:200. 1 = Pool Grupo Vacina Completa; 2 = Pool Grupo MWNT; 3 = Pool soro Pré-imune; 4 = Pool Grupo NI; 5 = Pool Grupo rMSP1a; 6 = Pool Grupo PBS; e 7 = Pool Grupo MWNT+rMSP1a..... 79

**Figura 18 - Proliferação dos esplenócitos após estímulo com meio RPMI, ConA ou rMSP1a:** As barras mostram a absorbância observada após a incorporação do BrdU às novas fitas de DNA sintetizadas pelas células em proliferação. A barra branca representa os esplenócitos não estimulados, a barra cinza os esplenócitos estimulados com 5µg/mL ConA, e a barra preta os esplenócitos estimulados com 20µg/mL rMSP1a. Os esplenócitos dos animais imunizados MWNT+rMSP1a proliferaram em níveis significativamente superiores aos que receberam rMSP1a (\*\* = p<0,01) e vacina completa (\* = p<0,05). Diferenças significativas (p<0,05) foram observadas entre o grupo PBS e os grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa. Análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA, com pós teste de comparações múltiplas de Tukey (n=6). ..... 80

**Figura 19 - Percentual de linfócitos T CD4+/CD44+ presentes na cultura de esplenócitos dos animais imunizados:** Diferenças significativas foram observadas entre os grupos MWNT+rMSP1a (\*\*) e vacina completa (\*) em relação ao grupo PBS. O grupo rMSP1a apresentou diferença significativa em relação ao grupo MWNT+rMSP1a (\*). Animais do grupo MWNT estão representados pela linha pontilhada (---). \*\* = p<0,01 e \* = p<0,05. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. .... 81

**Figura 20 - Percentual de linfócitos T CD4+/CD62L+ na cultura de esplenócitos estimulados com rMSP1a por 48hs:** Diferenças significativas foram observadas nos grupos MWNT+rMSP1a (\*\*\*) e vacina completa (\*\*) em relação ao grupo PBS. O grupo rMSP1a apresentou diferença estatisticamente significativa somente em relação ao grupo MWNT+rMSP1a (\*\*). Animais do grupo MWNT estão representados pela

linha pontilhada (---). \*\*\* =  $p < 0,001$  e \*\* =  $p < 0,01$ . Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. .... 82

**Figura 21 - Dosagem de IL-10 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de esplenócitos estimulados com rMSP1a, através da técnica de ELISA de captura:** A) Dosagem de IL-10 = Diferenças significativas não foram observadas entre os grupos analisados. B) Dosagem de TNF- $\alpha$  = Diferenças estatisticamente significativas foram observadas somente entre o grupo MWNT+rMSP1a e os grupos NI (letra a), PBS (letra b) e MWNT (letra c). Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. \* =  $p < 0,05$ . .... 83

**Figura 22 - Dosagem de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 nos soros dos animais após as imunizações, utilizando o kit CBA:** A - C) Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas dosagens de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17. D) O grupo vacina completa apresentou níveis mais elevados de IL-10 em relação aos grupos NI, PBS, rMSP1a e MWNT (\*\* =  $p < 0,01$ ). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos MWNT+rMSP1a e vacina completa. Dados paramétricos foram analisados utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey, e dados não paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. .... 84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Esquema de imunização dos camundongos Balb/c .....	6062
--	------

## RESUMO

Anaplasmoze bovina é uma doença causada pela bactéria gram-negativa intraeritrocitária *Anaplasma marginale*, transmitida biologicamente por carrapatos ou mecanicamente por moscas hematófagas. As proteínas de superfície (MSPs) de *A. marginale*, são importantes para a interação do patógeno com o hospedeiro, e constituem possíveis alvos vacinais contra essa doença. As proteínas MSP1a e MSP2 apresentam maior potencial como imunógenos, sendo a MSP1a considerada uma adesina de eritrócitos bovinos e células de carrapatos. Proteínas exógenas administradas isoladamente no organismo podem apresentar baixa biodistribuição ou serem rapidamente degradadas ou eliminadas. A utilização de carreadores constitui uma alternativa para aumentar a eficiência da distribuição e a apresentação do antígeno ao sistema imune. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune humoral e celular de camundongos Balb/c imunizados com o fragmento recombinante da proteína MSP1a, do isolado UFMG2 de *A. marginale* em diferentes combinações. Um fragmento da MSP1a de 339bp, compreendendo a porção N-terminal, foi clonado em vetor *pJexpress414*. O produto da expressão foi purificado e a identidade da proteína foi confirmada por SDS-PAGE e Western Blot. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) foram utilizados como molécula carreadora da rMSP1a na apresentação do antígeno ao sistema imune. Trinta e seis camundongos Balb/c, com idade de 6 a 8 semanas, foram divididos em seis grupos de seis animais cada (Não Imunizados, PBS, rMSP1a, MWNT, MWNT+rMSP1a e vacina completa (antígeno de *A. marginale* cultivado *in vitro* + MWNT+rMSP1a) e imunizados com três doses, via SC, intervaladas a cada 21 dias. Camundongos imunizados com a proteína rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa produziram altos níveis de IgG anti-rMSP1a, mostrando que a ligação da rMSP1a aos MWNT não interferiu na sua conformação original. Entretanto, o grupo vacina completa apresentou títulos de anticorpos mais baixos do que os grupos rMSP1a e MWNT+rMSP1a. Não foi detectada resposta no grupo imunizado com MWNT livre. Esplenócitos dos animais imunizados com a ferramenta MWNT+rMSP1a apresentou uma maior capacidade proliferativa, além de maiores percentuais de linfócitos T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62+. Níveis

significativamente maiores de TNF- $\alpha$  foram observados no grupo MWNT+rMSP1a em relação ao grupo PBS, e maior concentração de IL-10 foi observada no soro dos animais do grupo vacina completa. Estes resultados sugerem que a proteína rMSP1a associada a MWNT influenciou tanto no aumento da resposta de memória quanto na ativação de linfócitos.

## ABSTRACT

Bovine Anaplasmosis is a disease caused by the intra-erythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale*, which is biologically transmitted by ticks and mechanically by hematophagous flies. Surface proteins (MSPs) of *A. marginale*, are important for the interaction of the pathogen with host and constitute potential vaccine targets against this pathogen. MSP1a and MSP2 have greater potential as immunogens, being considered the MSP1a a adhesin of bovine erythrocytes and tick cells. Isolated exogenous proteins administered into the body can have low biodistribution or are rapidly degraded or eliminated. The use of carriers would be an alternative for increasing the efficiency of distribution and presentation of the antigen to the immune system. The aim of the present study was to evaluate the humoral and cellular immune response of Balb/c mice immunized with the recombinant protein fragment MSP1a, originated from the *A. marginale* UFMG2 in different combinations. A fragment of 339bp MSP1a comprising the N-terminal region, was cloned into the expression vector *pJexpress414*. The expression product was purified and identity of the protein was confirmed by SDS-PAGE and Western Blot. Multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) were used as a carrier molecule to the rMSP1a as antigen presentation to the immune system. Thirty-six Balb/c mice, aged 6 to 8 weeks, were divided into six groups of six animals each (non-immunized, PBS, rMSP1a, MWNT, MWNT+rMSP1a and complete vaccine (antigen of *A. marginale* cultivated in vitro + MWNT+rMSP1a) and immunized with three doses, in 21 days intervals. Mice immunized with the protein rMSP1a, MWNT+rMSP1a and vaccine produced high levels of IgG anti-rMSP1a, showing that the binding of rMSP1a in MWNT did not interfere in its original conformation. However, the complete vaccine group presented antibody titers lower than groups rMSP1a and MWNT+rMSP1a. No response was detected response in the group immunized with free MWNT. Splenocytes of group MWNT+rMSP1a significantly proliferated upon stimulation with the protein and presented a higher percentage of CD4+/CD44 + and CD4 +/CD62 +. Significant levels of TNF- $\alpha$  were observed in the group MWNT+rMSP1a compared to PBS group, and the highest concentration of IL-10 was observed in serum of the animals tested complete vaccine. These results suggest

that rMSP1 $\alpha$  associated with MWNT may influence both the increased memory response as lymphocyte activation.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1 <i>Anaplasma marginale</i></b> .....	<b>25</b>
<b>1.2 Transmissão</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3 Ciclo de Desenvolvimento</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4 Distribuição Geográfica e Prejuízos Econômicos</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5 Controle</b> .....	<b>30</b>
1.5.1 Controle de Artrópodes.....	31
1.5.2 Quimioprofilaxia.....	31
1.5.3 Manutenção de rebanhos livres de <i>A. marginale</i> .....	31
1.5.4 Vacinação.....	32
1.5.4.1 Vacina Viva.....	32
1.5.4.2 Vacina Inativada.....	33
<b>1.6 Principais Proteínas de Superfície – MSPs (<i>Major Surface Protein</i>)</b> .....	<b>34</b>
<b>1.7 Resposta Imune na Anaplasmoze Bovina</b> .....	<b>36</b>
<b>1.8 Cultivo <i>in vitro</i></b> .....	<b>37</b>
<b>1.9 Nanotubos de Carbono</b> .....	<b>38</b>
1.9.1 Nanobiotecnologia .....	40
1.9.2 NTCs x Desenvolvimento de Vacinas .....	41
1.9.3 Funcionalização dos NTCs com peptídeos antigênicos.....	42
1.9.4 Toxicidade dos nanotubos de carbono .....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>45</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1 - Objetivo Geral</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2 - Objetivos Específicos</b> .....	<b>48</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
<b>PARTE I - Predição de epítomos na seqüência da proteína MSP1a/UFMG2 de <i>A. marginale</i></b> .....	<b>50</b>
4.1.1 Predição de epítomos lineares de células B e células T CD8+ .....	50
<b>PARTE II - Expressão e Purificação da proteína rMSP1a</b> .....	<b>50</b>
4.2.1 Produção do fragmento rMSP1a: Clonagem e Transformação .....	50
4.2.2 Mini-Expressão da proteína rMSP1a.....	53
4.2.3 Expressão e purificação da proteína rMSP1a .....	54
4.2.4 Quantificação de proteínas (Método de Bradford) .....	55
4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) .....	56
4.2.6 Eletrotransferência da proteína rMSP1a – Western Blot.....	57
<b>PARTE III - Nanotubos de Carbono</b> .....	<b>57</b>
4.3.1 Obtenção dos nanotubos de paredes múltiplas (MWNT).....	57
4.3.2 Solubilização dos MWNT .....	58
4.3.3 Funcionalização dos MWNT com rMSP1a.....	58

<b>PARTE IV - Avaliação da resposta humoral de camundongos Balb/c imunizados com rMSP1a em diferentes combinações.</b> .....	<b>61</b>
4.4.1 Animais experimentais .....	61
4.4.2 Delineamento experimental .....	61
4.4.3 Cultivo <i>in vitro</i> do isolado UFMG2 de <i>A. marginale</i> .....	63
4.4.4 ELISA para determinação dos níveis de anticorpos .....	64
4.4.4.1 Padronização da concentração antígeno – rMSP1a .....	64
4.4.4.2 Padronização da concentração de soro .....	65
4.4.4.3 Padronização da concentração do conjugado (anti-mouse IgG) .....	65
4.4.5 Avaliação de títulos de anticorpos IgG anti-rMSP1a .....	65
4.4.6 Western Blot .....	66
<b>PARTE V - Avaliação da resposta celular</b> .....	<b>66</b>
4.5.1 Análise de proliferação celular por marcação com BrdU .....	66
4.5.2 Avaliação da população de linfócitos T CD4+, CD44+ e CD62+ .....	68
4.5.3 Determinação da produção de citocinas por ELISA de captura (R&D <sup>®</sup> Systems, EUA) e por <i>Cytometric Bead Array</i> (kit CBA - BD <sup>®</sup> Biosciences) .....	68
<b>4.6 Análise Estatística</b> .....	<b>69</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
<b>PARTE I – Predição de epítomos de células B e T</b> .....	<b>71</b>
5. 1 Predição de epítomos lineares de células B e epítomos CTL .....	71
<b>PARTE II – Obtenção da proteína rMSP1a</b> .....	<b>72</b>
5.2 Expressão e Purificação da proteína rMSP1a .....	72
<b>PARTE III – Nanotubos de Carbono</b> .....	<b>74</b>
5.3 Funcionalização covalente dos MWNT com rMSP1a .....	74
<b>PARTE IV - Avaliação da resposta humoral</b> .....	<b>75</b>
5.4 Padronização do teste de ELISA .....	75
5. 5 Avaliação da resposta humoral através do ELISA .....	76
5.6 Avaliação da resposta humoral através do Western Blot .....	78
<b>PARTE V – Avaliação da resposta celular</b> .....	<b>79</b>
5.7 Análise da proliferação celular após estímulo com rMSP1a .....	79
5. 8 Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62+ .....	80
5.9 Dosagem de citocinas do soro e sobrenadante de cultura .....	82
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>96</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>98</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>100</b>

# **I - INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

Anaplasmosse bovina é uma doença infecciosa causada pela riquetsia intraeritrocitária *Anaplasma marginale*, pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (Dumler et al. 2001). A doença apresenta distribuição mundial, atingindo principalmente bovinos de regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das principais restrições para a pecuária em muitos países. A principal forma de transmissão da doença ocorre por meio de carrapatos e moscas hematófagas, podendo ainda ser transmitida iatrogenicamente (Guglielmone, 1995).

Infecção por *A. marginale* resulta no desenvolvimento de anemia moderada a grave e icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, podendo ser observado febre, perda de peso, aborto, letargia, baixa produção de leite e, freqüentemente, a morte de animais adultos (Ristic et al. 1977; Kuttler 1984). Animais que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecção persistente caracterizada por baixa riquetsemia, não detectável em esfregaço sanguíneo (Kieser et al. 1990; French et al. 1998, 1999). Bovinos persistentemente infectados apresentam imunidade ao longo da vida e, após desafio, desenvolvem baixo ou nenhum sinal clínico da doença (Kocan et al. 2010). Porém, estes animais são considerados importantes na epidemiologia da doença, por serem reservatórios do *A. marginale*, possibilitando a transmissão da riquetsia para um animal susceptível através da alimentação de vetores biológicos ou mecânicos.

### 1.1 *Anaplasma marginale*

Membros da família Anaplasmataceae são organismos intracelulares obrigatórios, que se desenvolvem exclusivamente dentro de vacúolos parasitóforos ligados à membrana da célula hospedeira, multiplicando-se tanto em hospedeiros vertebrados quanto em invertebrados, principalmente carrapatos (Kocan et al. 2010). O gênero *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez em 1910 por Sir Arnold Theiler, que descreveu “pontos marginais” encontrados em eritrócitos corados de bovinos doentes eram o agente causador de uma doença específica (Theiler 1910, 1911). As inclusões localizadas marginalmente haviam sido observadas freqüentemente em células

vermelhas do sangue de animais anêmicos, muitas vezes naqueles que sofriam de babesiose. Theiler posteriormente descreveu uma subespécie de *A. marginale*, o *A. centrale*, que é menos patogênico e as inclusões localizam-se no centro dos eritrócitos.

O nome científico *Anaplasma marginale* é baseado em suas características de coloração e localização no interior da célula hospedeira, com "*Anaplasma*" referindo-se a falta de citoplasma e "*marginale*" denotando a localização periférica do organismo nas células hospedeiras (Theiler 1910). *A. marginale* desenvolve-se dentro de vacúolos parasitóforos, apresentando-se como corpúsculos de inclusão intraeritrocitários, de localização periférica, visualizados em microscopia ótica como pequenos pontos escuros, variando entre 0,1µm a 0,8 µm. À microscopia eletrônica esses corpúsculos estão separados do citoplasma do eritrócito por uma membrana, e contêm de um a oito corpos iniciais, de 0,3 µm a 0,4 µm de diâmetro, que são as unidades infectantes (Ribeiro & Passos 2002).

Trabalhos têm demonstrado a existência de duas formas morfológicamente distintas de *A. marginale*, corpúsculos com presença ou ausência de apêndice (Kocan et al. 1984; Smith et al. 1986). Este apêndice foi denominado de filamento, cauda, projeção e, mais recentemente, de apêndice de inclusão, sendo constituído por lâminas interconectadas de material proteináceo, firmemente arrumadas, que assumem configurações de cometas ou alça (Kocan et al. 1984).

O apêndice é visualizado através de microscopia de contraste de fases, coloração pelo “novo azul de metileno” (Schalm 1964), através da reação de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica. Amostras com essa característica morfológica têm sido isoladas em diferentes estados da América do Norte e no México (Smith et al. 1986). No Brasil, Ribeiro et al (1997) isolaram uma amostra de *A. marginale* com apêndice de um bezerro naturalmente infectado no estado de Minas Gerais, sendo esta a única amostra de *A. marginale* com apêndice registrada no Brasil até o presente momento.

## **1. 2 Transmissão**

A transmissão do *A. marginale* pode ser efetuada biologicamente por carrapatos ou mecanicamente através de moscas hematófagas e fômites contendo sangue contaminado

(Dikmans 1950; Kocan et al. 2003, 2004). A transmissão biológica é efetuada por carrapatos, e aproximadamente 20 espécies de Ixodídeos têm sido incriminadas como vetores no mundo, como por exemplo, *Rhipicephalus (Boophilus) spp.*, *Dermacentor spp.* e *Ixodes ricinus*, enquanto que o *Amblyomma spp.* não demonstrou estar envolvido na transmissão dessa riquetsia (Dikmans 1950; Ewing 1981; Kocan et al. 2004). A transmissão do *A. marginale* pode ocorrer transestadialmente ou intraestadialmente, enquanto que a transmissão transovariana não foi comprovada (Stich et al. 1989). A transmissão transestadial é dada por ninfas ou adultos que se infectaram no estágio anterior, e a transmissão intraestadial ocorre dentro do mesmo estágio.

A transmissão intrastadial mostrou-se ser efetiva por carrapatos machos, uma vez que eles tornam-se persistentemente infectados com o *A. marginale* e podem transmiti-lo repetidamente durante a movimentação entre os bovinos (Kocan et al. 1992a,b). Machos infectados podem ser um importante mecanismo de transmissão do patógeno no caso de carrapatos de apenas um hospedeiro, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Dermacentor albipictus* (Kocan et al. 2003). No Brasil, o carrapato *R. (B.) microplus* é considerado o principal vetor biológico da anaplasmose bovina, e o desenvolvimento de colônias de *A. marginale* nas células do intestino de fêmeas ingurgitadas foi comprovado por Ribeiro & Lima (1996). Pesquisas recentes documentaram que a transmissão biológica por carrapatos foi mais eficiente do que a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans*, a mosca do estábulo (Scoles et al. 2005). No entanto, alguns isolados de *A. marginale* não são infectantes ou transmissíveis por carrapatos (Kocan et al. 2004).

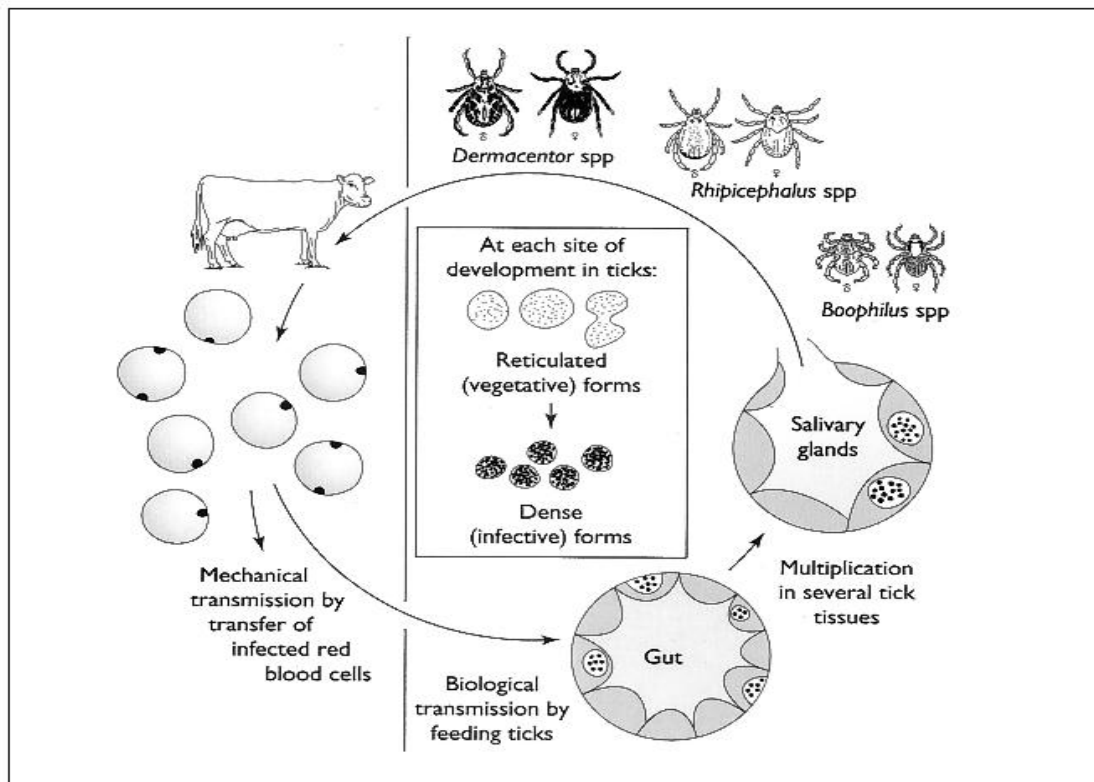
A transmissão mecânica por moscas hematófagas tem sido relatada por dípteros hematófagos do gênero *Tabanus*, *Stomoxys*, e várias espécies de mosquitos (Potgieter 1979; Ewing 1981; Foil 1989). Esta forma de transmissão provavelmente é a principal rota de disseminação do *A. marginale* em certas áreas dos Estados Unidos, América Central e do Sul, e África onde os carrapatos vetores estão ausentes (Ewing 1981; Foil 1989) e onde o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o carrapato tropical de bovinos, parece não ser um vetor biológico do agente (Figuerola et al. 1998; Coronado 2001). Além disso, o *A. marginale* mantém sua viabilidade nas peças bucais das moscas por até duas horas, possibilitando a transmissão mecânica de um hospedeiro infectado a outro (Ribeiro & Passos 2002). Similarmente, a transmissão mecânica associada com

equipamentos cirúrgicos contaminados, pode dar origem a casos clínicos fora da estação normal do vetor (Reeves & Swift 1977; Ewing 1981; Smith et al. 1989).

### **1.3 Ciclo de Desenvolvimento**

O ciclo parasitológico do *A. marginale* inicia-se com a penetração dos corpos iniciais nos eritrócitos bovinos, local onde ocorre a infecção e multiplicação da riquetsia (Figura 1). O *A. marginale* penetra nos eritrócitos pelo processo de rofecitose, que envolve a invaginação da membrana citoplasmática formando o vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo, os corpos iniciais multiplicam-se por divisão binária formando até oito elementos. Os corpos iniciais saem dos eritrócitos por um processo de rofecitose reversa, sem romper a membrana das hemácias, e iniciam novo ciclo ao penetrar em novos eritrócitos (Ribeiro & Passos 2002). Durante a fase aguda 70% ou mais de eritrócitos podem ser parasitados. O período de incubação varia de 7 a 60 dias, sendo observada uma média de 28 dias para o aparecimento dos sinais clínicos da doença.

Após a detecção de eritrócitos infectados, o número de células parasitadas aumenta geometricamente. O *A. marginale* causa alterações na membrana dos eritrócitos infectados, que posteriormente são fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário, resultando no desenvolvimento de anemia moderada a grave, e icterícia sem hemoglobinemia ou hemoglobinúria (Kocan et al. 2003). Após a infecção o animal pode desenvolver a doença na forma aguda, superaguda, leve ou crônica (Ristic 1981).



**Figura 1** - Esquema do ciclo de desenvolvimento do *A. marginale* em bovinos e carrapatos. (Kocan et al. 2003)

O ciclo de desenvolvimento do *A. marginale* nos carrapatos é complexo e coordenado com o ciclo de alimentação dos mesmos (Kocan et al. 1992a,b) (Figura 1). Durante a hematofagia, eritrócitos infectados com *A. marginale* são ingeridos pelo carrapato, proporcionando a infecção das células intestinais. Após a penetração nas células do intestino, *A. marginale* se multiplica por divisão binária, formando um vacúolo contendo inúmeros corpúsculos. Após a lise do vacúolo, outros tecidos do carrapato tornam-se infectados, incluindo as glândulas salivares, proporcionando a transmissão do *A. marginale* para outros bovinos (Ge et al. 1996; Kocan et al. 2004). A primeira forma de *A. marginale* observada dentro das colônias é a forma reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. As formas reticuladas, em seguida, transformam-se em formas densas, que é a forma infectante e podem sobreviver fora das células do hospedeiro por um período de tempo limitado (Kocan et al. 2003). Bovinos tornam-se

infectados quando as formas densas são transmitidas durante a alimentação do carrapato via glândulas salivares.

#### **1.4 Distribuição Geográfica e Prejuízos Econômicos**

*A. marginale* é endêmico nos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul, bem como nas ilhas do Caribe (Kocan et al. 2010), sendo enzoótica em todos os países da América Latina, com a exceção das áreas desertas e certas cadeias de montanhas, como os Andes (Guglielmone 1995). A anaplasmose bovina também é endêmica em regiões da Ásia e África, e na Europa é encontrada principalmente nos países do Mediterrâneo onde a infecção tem sido descrita em bovinos e várias espécies de animais selvagens (revisado por de la Fuente et al. 2005). Esta ampla e crescente distribuição provavelmente resultou do transporte de animais portadores com subsequente transmissão mecânica e biológica de bovinos assintomáticos persistentemente infectados para bovinos susceptíveis (Kocan et al. 2010). No Brasil, o *A. marginale* é endêmico em todo o território, causando importantes problemas sanitários.

Anaplasmose bovina causa importantes perdas econômicas devido à alta morbidade e mortalidade de rebanhos susceptíveis. Estes prejuízos estão associados a perda de peso, redução na produção de leite, aborto, custos com o tratamento e controle da doença (Kocan et al. 2003). Nos Estados Unidos, a perda anual causada pela anaplasmose, é estimada em mais de 300 milhões de dólares e na América Latina em 800 milhões de dólares (Kocan et al. 2003). No Brasil, prejuízos causados pelo *A. marginale* são difíceis de calcular, não só pela morbidade e mortalidade, mas pelas seqüelas que impedem o desenvolvimento normal dos animais e conseqüentemente, os índices produtivos do rebanho (Arteche et al. 1992).

#### **1.5 Controle**

Medidas de controle para a anaplasmose não alteraram significativamente nas últimas décadas. Atuais medidas de controle incluem o controle de artrópodes, administração profilática de antibióticos, vacinação e a manutenção de rebanhos livres

de *Anaplasma*. A aplicação destes métodos é influenciado pela disponibilidade, custo e viabilidade de aplicação (Kocan et al. 2000).

### **1.5.1 Controle de Artrópodes**

O controle de artrópodes, como carrapatos e moscas, é extremamente difícil e caro. A poluição ambiental gerada pelo uso repetitivo de acaricidas está se tornando a questão mais importante, além de resultar no desenvolvimento de carrapatos e populações de moscas resistentes. Nas áreas em que a anaplasiose é endêmica, a interrupção da aplicação de acaricidas aumenta o risco de animais suscetíveis se infectarem com *A. marginale*, podendo levar a grandes surtos da doença (Norval et al. 1992).

### **1.5.2 Quimioprofilaxia**

A quimioterapia, é um processo caro e muitas vezes não aplicável em criações extensivas de bovinos. O uso intenso de antibióticos eleva o risco de desenvolvimento de organismos resistentes, apesar da resistência do *A. marginale* aos antibióticos não ter sido relatada até o momento (Kocan et al. 2010).

### **1.5.3 Manutenção de rebanhos livres de *A. marginale***

Em áreas onde a anaplasiose não é endêmica, o controle da doença tem sido efetuado através da manutenção de rebanhos livres de *A. marginale*. Este método de controle tem como objetivo evitar a importação de animais portadores da anaplasiose que poderiam servir como uma fonte de infecção. Porém, esta metodologia tem sido dificultada pela falta de testes sorológicos com sensibilidade capaz de detectar a infecção de baixo nível em bovinos persistentemente infectados (Kocan et al. 2000). Métodos de diagnóstico baseados na detecção de DNA têm sido desenvolvidos para identificação de infecções por *Anaplasma*, porém a técnica tem sido principalmente utilizada na área da pesquisa devido aos custos relacionada à sua execução. Até o presente, no entanto, testes sorológicos baseado na detecção das proteínas de superfície

(MSPs) continuam sendo o meio mais prático de testar grandes números de amostras de bovinos para detectar a infecção (Kocan et al. 2010).

#### **1.5.4 Vacinação**

Vacinas para o controle da anaplasmosose incluem dois tipos principais: vacina viva e vacina morta (ou inativada), ambas utilizando eritrócitos bovinos infectados como fonte de antígeno. Estas vacinas são direcionadas para a prevenção de morbidade e mortalidade e não impede o animal de se infectar após a exposição desafio; induzem imunidade protetora que silencia ou previne a doença clínica, mas nenhum tipo previne os bovinos de se tornarem persistentemente infectados com *A. marginale* (Kocan et al. 2003).

##### **1.5.4.1 Vacina Viva**

A utilização de vacinas vivas para o controle da anaplasmosose foi iniciado por Sir Arnold Theiler no início de 1900. Estratégias vacinais usando organismos vivos incluem: (I) vacinas vivas contendo cepas atenuadas de *A. marginale*, (II) infecção seguida de tratamento, e (III) vacinas vivas contendo cepas menos virulentas de *A. centrale*.

A atenuação de cepas de *A. marginale* tem sido realizada através de irradiação ou pela passagem do patógeno em hospedeiros atípicos, tais como ovelhas e cervídeos (Edds et al. 1966; Sharma, 1986; Kuttler et al. 1988). Bovinos imunizados com antígeno atenuado desenvolvem infecções persistentes, que tipicamente induzem proteção durante toda a vida do animal contra a doença clínica (Ristic & Carson, 1977; Abdala et al., 1990; Wright, 1990; Tebele & Palmer, 1991). No entanto, animais persistentemente infectados podem não ser imunes quando desafiados com genótipos geneticamente diferentes do *A. marginale*; além de contribuir para a disseminação da riquetsia, uma vez que estes animais servem de fonte de infecção para transmissão mecânica e biológica (Kocan, 2003).

Outra estratégia tem sido inocular bovinos com eritrócitos infectados com *A. marginale* e tratá-los com tetraciclina no início da elevação da temperatura corporal ou

a detecção da parasitemia. Este método previne a anaplasnose aguda e os animais tornam-se persistentemente infectados. Porém, o controle das reações pós-inoculação foi muitas vezes mal sucedida na prevenção da doença aguda (Kuttler & Todorovic, 1973). Este método requer monitoramento de perto dos animais, o que muitas vezes torna inviável sua utilização em grandes rebanhos.

O *A. centrale*, isolado por Sir Arnold Theiler no início dos anos 1900, é atualmente a amostra mais utilizada em vacinas vivas para o controle da anaplasnose bovina (Kocan, 2003). Theiler observou que o *A. centrale* foi menos virulento para bovinos do que o *A. marginale*, e que bovinos infectados com *A. centrale* desenvolviam imunidade protetora contra infecções por *A. marginale* (Theiler, 1911). No entanto, o uso da vacina viva é restrito a animais jovens, uma vez que animais adultos são susceptíveis a infecção.

Apesar de mais de um século de uso em campo, a base para a imunidade protetora contra cepas virulentas de *A. marginale* ainda permanece desconhecida. Além disso, a possibilidade de transmissão de outros patógenos deve ser considerada, uma vez que se trata de uma vacina viva proveniente de sangue infectado. Este fato tem impedido sua comercialização tanto nos Estados Unidos quanto na União Européia (Agnes et al. 2010). Outro fator importante é que a imunidade protetora gerada pela vacina viva de *A. centrale* não é uniforme contra todos os isolados de *A. marginale*, e surtos da doença têm sido relatados mesmo em populações vacinadas (Wilson et al. 1980; Turton et al. 1998; Bock & de Vos, 2001; Shkap et al., 2002).

#### **1.5.4.2 Vacina Inativada**

Vacinas inativadas de *A. marginale*, derivadas de eritrócitos infectados, apresentam várias desvantagem, dentre elas: de serem contaminadas com o estroma dos eritrócitos podendo causar anemia isohemolítica nos animais recém nascidos de vacas vacinadas; apresentam o risco de transmitir outros patógenos; custo elevado de produção por utilizar animais livres de infecção como fonte de eritrócitos infectados; e seu uso pode ser limitado a uma região geográfica devido à diversidade genética de isolados de *A. marginale* (Kocan et al. 2003; Garcia-Garcia et al. 2004).

A produção de vacinas inativadas de *A. marginale* em cultivo de células embrionárias de carrapato tem sido amplamente pesquisada na tentativa de se evitar os

problemas das vacinas derivadas de eritrócitos. Esta vacina pode ser mais facilmente padronizada, eliminando ainda a necessidade de inoculação experimental em animais em sua produção (Kocan et al. 2003). Outras abordagens testadas para o controle imunológico da anaplasmose é baseada na vacinação com proteínas de superfície naturais ou recombinantes (Palmer et al. 1986,1988,1989; Tebele et al. 1991; McGuire et al. 1994a; de la Fuente et al. 2003; Kocan et al. 2003). Estudos realizados nas últimas duas décadas têm contribuído para ampliar o conhecimento da composição antigênica do *A. marginale*, bem como identificar o papel das MSPs no desenvolvimento da imunidade protetora contra a infecção.

### **1.6 Principais Proteínas de Superfície – MSPs (*Major Surface Protein*)**

A identificação de proteínas de superfície do *A. marginale* é essencial para criar um banco de dados a ser usado para o desenvolvimento de vacinas (Araújo et al. 2008). Cinco proteínas de superfície (MSPs) foram identificadas na membrana de *A. marginale* oriundos de eritrócitos de bovinos e em células de carrapatos. Quatro destas MSPs, chamadas MSP1, MSP2, MSP3 e MSP4, foram inicialmente identificadas usando anticorpos policlonais neutralizantes (Palmer & McGuire, 1984), e posteriormente a MSP5 foi identificada (Visser et al 1992). Estas proteínas são antigenicamente relacionadas e são responsáveis pela produção de anticorpos nos animais que foram naturalmente infectados ou vacinados com corpúsculos iniciais de *A. marginale* (Tebele et al. 1991).

O complexo MSP1 é composto por dois peptídeos independentes, covalentemente ligados. A MSP1a e MSP1b mostraram-se estar envolvidas na adesão do *A. marginale* às células hospedeiras (Garcia-Garcia et al. 2004). A MSP1a, codificada por um gene de cópia única *mSP1a*, é uma adesina de eritrócitos e células do carrapato; enquanto que a MSP1b, codificada por membros da família multigênica *mSP1b*, é apenas uma adesina de eritrócitos bovinos (McGarey & Allred 1994; McGarey et al. 1994b; de la Fuente et al. 2001).

O peso molecular da MSP1a varia entre os diferentes isolados de *A. marginale* (70 - 100 kDa), devido as diferenças no número de repetições de peptídeos em tandem na região N-terminal da proteína. Estas repetições de peptídeos são expostas na superfície

do *A. marginale*, sendo necessárias e suficientes para a adesão do *A. marginale* às células hospedeiras (Palmer et al. 1987; McGarey et al, 1994b;. McGarey e Allred, 1994; de la Fuente et al., 2001 e 2003).

Uma resposta diferencial de anticorpos contra a MSP1a e MSP1b foi observada em bovinos imunizados com *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos ou cultura de células de carrapato (Kocan et al. 2001; de la Fuente et al. 2002; Garcia-Garcia et al. 2004). Essa diferença foi encontrada como resultado da alta expressão do MSP1a pelo *A. marginale* de eritrócitos bovinos, e baixos níveis de expressão da MSP1a por organismos derivados de culturas de células de carrapato (Garcia-Garcia et al. 2004).

As MSP2 e MSP3 são codificadas por uma família multigênica, apresentando variações quanto às propriedades antigênicas e estruturais entre os isolados geográficos (Alleman & Barbet 1996; Barbet et al. 2001). A composição antigênica da MSP2 varia durante o mesmo ciclo de parasitemia em bovinos (French et al. 1999) e em carrapatos persistentemente infectados (de la Fuente & Kocan 2001). A atividade dessas proteínas está ligada ao mecanismo de evasão da resposta imune e a persistência do microrganismo no hospedeiro (French et al. 1998; Palmer et al. 2000).

A MSP4 e MSP5 são proteínas codificadas por genes de cópia única. Embora estas proteínas sejam altamente conservadas entre os isolados e apresentar parte da sua seqüência homóloga com polipeptídeos da MSP2 (Palmer et al. 1994; de la Fuente et al. 2003, 2004), informações sobre suas funções não estão bem esclarecidas. Estudos epidemiológicos e imunológicos utilizando diferentes MSPs revelaram que a proteína MSP5 apresenta características antigênicas que possibilitam seu emprego como antígeno nos ensaios de diagnóstico de anaplasmose bovina conferindo sensibilidade e especificidade aos testes (Knowles et al. 1996; Vidotto et al. 1998b). Porém, achados recentes sugerem que o teste MSP5-cELISA também pode ser reconhecido por anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum* em bovinos infectados (Dreher et al. 2005). Assim, o teste MSP5-cELISA não diferencia espécies de *Anaplasma* em regiões geográficas onde ocorre co-infecção com *A. phagocytophilum* e *A. marginale* ou *A. centrale* (Hofmann-Lehmann et al. 2004; Lin et al. 2004; de la Fuente et al. 2004).

As MSPs de *A. marginale* derivadas de cultura de células de carrapato e de eritrócitos bovinos infectados têm-se mostrado conservadas (Barbet et al. 1999), exceto a MSP1a

que mostrou-se diferencialmente expressa em eritrócitos bovinos e cultura de células de carrapato (Kocan et al. 2001; de la Fuente et al. 2002; Garcia-Garcia et al. 2004).

Atualmente, o seqüenciamento genômico e proteômico tem possibilitado a identificação de novas proteínas de membrana, além de aumentar a taxa de candidatos vacinais (Junior et al. 2010). Uma série de novos genes de proteínas da membrana externa do *A. marginale* foram encontrados: *omp1-14*, AM097, AM956, fator-Tu, VirB9, VirB10, AM197, AM854, AM127, AM387, VirB2, VirB7, VirB11 e VirD4 (Brayton et al. 2006; Lopez et al. 2005; Suttent et al. 2010). Tais proteínas localizadas ou associadas com a membrana externa do *A. marginale* são consideradas imunógenos potenciais, uma vez que estimularam a proliferação de células T de memória e a secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Lopez et al. 2007).

### **1.7 Resposta Imune na Anaplasmosose Bovina**

A infecção pelo *A. marginale* é capaz de estimular tanto a resposta humoral quanto a resposta celular no hospedeiro. Ambas as respostas são importantes no controle da doença, uma vez que anticorpos neutralizantes e INF- $\gamma$  eliminam o organismo via óxido nítrico ou moléculas relacionadas (Palmer et al. 1999; Brown et al. 1998a, 2001). O papel das células T CD4+ nesta infecção, está associado a sua capacidade de ativação de células T helper e a secreção de INF- $\gamma$ . O INF- $\gamma$  produzido induz a mudança do isotipo IgG2, promovendo a opsonização do *A. marginale* ou eritrócitos infectados; e estimulam a fagocitose e a produção de óxido nítrico através de macrófagos ativadas (Estes et al. 1994, revisado por Kocan et al. 2003).

As proteínas de superfície (MSPs) do *A. marginale* são capazes de estimular a resposta imune dos animais (Tebele et al. 1991), estando envolvidas no desenvolvimento da resposta imune protetora. Em um estudo *in vitro*, anticorpos anti-MSP1 opsonizaram corpúsculos iniciais de *A. marginale* por fagocitose mediada por macrófagos ativados (Cantor et al. 1993). Esta opsonização, e subsequente eliminação do *A. marginale*, são mecanismos dependentes do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II e INF $\gamma$  secretado por linfócitos T CD4+ antígeno-específicos. Além disso, a proteína MSP1a foi reconhecido por células T CD4+ de memória em bovinos imunizados com o complexo MSP1 de *A. marginale* (Brown et al 2001), impedindo o

desenvolvimento da riquetsemia após desafio homólogo e heterólogo (Palmer et al. 1989). Esta proteção indica a conservação de epítomos de células T entre os diferentes isolados de *A. marginale*, capazes de estimularem a resposta imune protetora dos animais (Brown et al. 2002).

Durante a infecção, o *A. marginale* sofre variações antigênicas nas proteínas MSP2 e MSP3 (Brayton et al. 2003; Palmer & Brayton 2007), e uma IgG2 específica a variação é produzida em resposta a cada variante emergente (French et al. 1999). Este fato sugere que a resposta de IgG2 controla novos surgimentos de variações, mas não consegue eliminar o patógeno ao escape contínuo da resposta imune pelas novas variantes. Han e colaboradores (2010) demonstraram que células T CD4+ ativadas durante a infecção desenvolveram uma resposta de memória fraca. Os mecanismos resultantes da deficiência da resposta de células T durante a infecção não são conhecidos, no entanto esta regulação negativa da resposta das células T CD4+ poderia impedir a inflamação sistêmica prolongada no hospedeiro infectado, em resposta a elevados níveis contínuos do *A. marginale*, mediado por células T regulatórias.

## **1.8 Cultivo *in vitro***

Vários sistemas de cultura *in vitro* do *A. marginale* foram tentativamente realizados, tais como cultura de eritrócitos (Kessler & Ristic 1979); cultura de medula óssea de bovinos, medula óssea de coelhos e gânglios linfáticos de bovinos (Marble & Hanks 1972; Hildago 1975; McHolland & Trueblood 1981); e cultura de células do mosquito *Aedes albopictus* (Mazzola et al. 1976). Porém, ambas as tentativas resultaram em uma rápida manutenção do organismo e a propagação do *A. marginale* não foi confirmada.

O cultivo de células de carrapatos teve estabelecimento da sua primeira linhagem há mais de 30 anos atrás (Varma et al. 1975). De acordo com Bell-Sakyi et al. (2007), sistemas de culturas de células *in vitro* derivadas de vetores ou tecidos dos hospedeiros têm importante papel em pesquisas sobre carrapatos e doenças transmitidas por estes, possibilitando avanços nos aspectos da biologia básica destes vetores, na relação hospedeiro-vetor-parasito e ainda no controle das doenças.

A linhagem de células derivadas de embriões de carrapatos *Ixodes scapularis*, IDE8, foi estabelecida em 1994 por Munderloh et al., sendo capaz de proporcionar o

desenvolvimento do *A. marginale*. Quando inoculados com eritrócitos infectados, as células IDE8 tornaram-se infectadas, resultando no primeiro sistema celular contínuo de cultura dessa riquetsia (Munderloh et al. 1996). Níveis de infecção alcançaram 100% da cultura e os organismos gerados foram infectivos para bovinos.

No entanto, *A. marginale* cultivado em células IDE8 expressam baixos níveis da MSP1a (Garcia-Garcia et al. 2004), e quando usados em ensaios de vacinação em bovinos produzem ineficiente resposta humoral, não protegendo os animais contra desafios experimentais. Como resultado, bovinos imunizados com *A. marginale* derivado de eritrócitos desenvolveram uma resposta preferencial à MSP1a, enquanto que bovinos imunizados com *A. marginale* derivado de cultura de células de carrapato responderam preferencialmente contra a MSP1b (Kocan et al. 2001; de la Fuente et al. 2002; Garcia-Garcia et al. 2004). Assim, o cultivo de *A. marginale* em células IDE8 torna-se impróprio para a produção de antígenos a ser utilizado em vacina inativada. Recentemente Munderloh et al. (2004) demonstraram a infecção e propagação do *A. marginale* em linhagem de células endoteliais bovinas, porém, até o presente momento não existem trabalhos relacionados a composição gênica e expressão de proteínas de superfície nos organismos produzidos neste sistema.

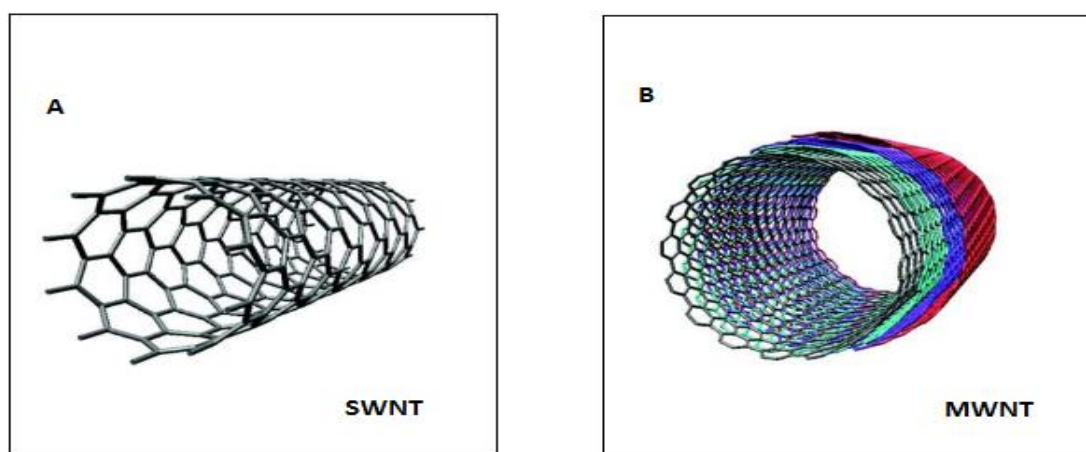
Novas abordagens devem ser avaliadas quanto à utilização da vacina inativada para o controle da anaplasmose bovina. A utilização da MSP1a em ensaios vacinais vem sendo bastante utilizada, devido ao fato desta proteína estar associada no desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Palmer et al. 1986,1988,1989; McGuire et al. 1994a, 1994b; Brown et al. 1998, 2001; de la Fuente et al. 2003; Kocan et al. 2003). Nos últimos anos, sistemas carreadores de antígeno têm atraído a atenção de vários pesquisadores, uma vez que este sistema é capaz de otimizar a apresentação do peptídeo ao sistema imune. Dentre estes carreadores estão as micropartículas (lipossomas) e os sistemas coloidais (nanopartículas) (Schaffazick & Guterres 2003; Hennrich et al. 2006; Foldvari et al. 2008).

## **1.9 Nanotubos de Carbono**

Nanotubos de carbono (NTCs) apresentam características estruturais, mecânicas e eletrônicas peculiares que vem sendo utilizadas na engenharia, química e física. Nos

últimos anos foram descobertas novas aplicações dos NTCs na área da biologia (Sinha & Yeow 2005). O primeiro relato dos NTCs em trabalhos científicos foi feito por Sumio Iijima (1991), e desde então novas propriedades e diferentes aplicações estão sendo pesquisadas (Herbst et al. 2004; Sinha & Yeow, 2005; Foldvari et al. 2008).

Os NTCs são formados por folhas de grafite enroladas, formando pequenos cilindros com diâmetro de 1 a 30 nm. Atualmente existem dois tipos de NTC: os nanotubos de parede simples (SWNT), nos quais possuem apenas um único cilindro de carbono (Figura 2A); e os nanotubos de parede múltipla (MWNT) que possuem de dois a 50 cilindros concêntricos (Figura 2B) (Dresselhaus et al. 2004; Sinha & Yeow 2005).



**Figura 2** - Estruturas dos nanotubos de parede simples - SWNT (A) e de paredes múltiplas – MWNT (B). (Foldvari & Bagonluri 2008).

Estas nanopartículas podem ser produzidas por meio de três técnicas diferentes: descarga por arco elétrico (Iijima 1991; Sinha & Yeow 2005; Joselevick et al. 2008), ablação a laser (Romero et al 2002) ou deposição química de vapor (Joselevich et al. 2008). Em qualquer uma das técnicas utilizadas, os NTCs recém-sintetizados possuem impurezas oriundas do processo de síntese, como por exemplo, partículas de metais catalíticos, carbono amorfo, fuligem e fragmentos de grafite (Helland et al 2007). Essas impurezas podem ocasionar problemas de toxicidade quando NTCs são utilizados *in vivo* (Smart et al. 2006). Por isso, diferentes métodos de purificação são conduzidos para se obter NTCs com a maior pureza possível.

Para a eliminação do carbono amorfo utiliza-se a etapa de oxidação com ácido nítrico, que também contribui para a solubilização dos NTCs em solução aquosa (Rosca et al. 2005). O desenvolvimento de protocolos de oxidação abriu a possibilidade de ligar grupos funcionais às paredes laterais dos nanotubos aumentando sua solubilidade em solventes orgânicos e soluções aquosas. Esta modificação fornece sítios múltiplos para ligação, de drogas, ácidos nucleicos, açúcares, DNA, oligonucleotídeos, peptídeos, proteínas, ou enzimas (Pantarotto et al. 2003a; Foldvari et al. 2008), abrindo a possibilidade da utilização dos NTCs como transportadores e biosensores.

### **1.9.1 Nanobiotecnologia**

A Nanobiotecnologia, ciência que estuda as interações entre nanocompostos e o sistema biológico, está em constante crescimento. Considerando que o carbono é o elemento base de todas as formas de vida conhecidas (Hennrich et al. 2006), os NTCs têm se destacado na utilização como biosensores, dispositivos eletrônicos, carreador de fármacos, dispositivos de diagnóstico, transporte intracelular e intranuclear de drogas e genes, e carreadores de proteínas com objetivo vacinal (Sinha & Yeow 2005; Hennrich et al. 2006).

Atualmente, estudos apontam para o potencial dos NTC conjugado a proteínas como agentes carreador (Foldvari et al. 2008). No entanto, várias questões fundamentais ainda continuam em aberto. Uma delas é o mecanismo que regula a entrada e a internalização dos NTC. Kam et al (2004) propõem que os SWNTs atravessam a membrana celular através de endocitose, enquanto que Pantarotto et al (2004) sugerem um mecanismo não endocítico que envolve a inserção e difusão dos NTC através da bicamada lipídica da membrana celular.

Vários esforços têm sido realizados para desenvolver um sistema inovador capaz de transportar peptídeos antigênicos utilizando a nanotecnologia (Foldvari, et al 2008).

### 1.9.2 NTCs x Desenvolvimento de Vacinas

Há grande interesse de produzir novos e efetivos veículos para administração e apresentação de antígenos ao sistema imune. Os NTCs podem ser considerados excelentes carreadores, devido a sua capacidade de se ligarem a peptídeos e proteínas (Bianco et al. 2005). Atualmente existem trabalhos que mostram que NTCs ligados a antígenos possuem um grande potencial de gerar uma resposta imune protetora através da produção de anticorpos neutralizantes (Pantarotto et al. 2003b; Bianco et al. 2005; Yandar et al. 2008).

A utilização dos NTCs em ensaios vacinais implica na ligação dos NTCs ao antígeno sem que ele perca sua conformação, induzindo assim uma resposta de anticorpos com alta especificidade. No entanto, é importante que os NTC incorporados não apresentem imunogenicidade intrínseca, e, por conseguinte, desencadeie uma resposta imune (Foldvare et al 2008).

As nanopartículas também podem ser utilizadas para modular a resposta imune celular. Zeinali et al. (2009) demonstraram que SWNT funcionalizado a proteína recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* promoveu resposta voltada para o tipo Th1 em camundongos Balb/c. Pantarotto et al (2003a) relataram que a utilização dos NTC induziram uma resposta imune melhorada. Neste trabalho, peptídeos derivados da proteína VP1 do vírus da Febre Aftosa foram acoplados em SWNT e utilizados para a imunização de camundongos Balb/c. Como resultado, a ferramenta SWNT+VP1 induziu uma maior resposta imune contra o peptídeo, sem nenhuma reatividade cruzada detectável para os SWNT.

Um importante parâmetro a considerar é a manutenção da conformação do antígeno, na qual é necessária para indução da resposta humoral com alta especificidade. Em estudo recente, demonstrou que a funcionalização de nanotubos de carbono com peptídeos antigênicos mantém o epítipo de células B conservado (Pantarotto et al. 2003b). No entanto, a utilização dos NTCs em sistemas biológicos exige uma compreensão mais detalhada quanto às características dos NTCs e suas propriedades físicas e químicas.

### **1.9.3 Funcionalização dos NTCs com peptídeos antigênicos**

Várias metodologias têm sido aplicadas para aumentar a solubilidade dos NTCs através de ligações covalentes ou não-covalentes de moléculas na sua superfície. A melhor estabilidade foi alcançada através de ligações covalentes entre NCTs e proteínas (Jiang et al. 2003), utilizando um agente acoplante intermediário que proporcionou a ligação entre NTCs e a proteína alvo. Esse procedimento, denominado funcionalização, permite que as moléculas aderidas sirvam como pontos de ancoragem para grupos funcionais de interesse (Pompeo & Resasco 2002). Nanotubos de carbono funcionalizados a proteínas são hábeis em atravessar a membrana celular, tornando esta ferramenta um vetor potencial para o transporte de diversos antígenos (Pantarotto et al. 2003a, 2004; Kam et al. 2004).

### **1.9.4 Toxicidade dos nanotubos de carbono**

Apesar dos nanotubos de carbono demonstrarem um grande potencial no transporte de drogas e antígenos, alguns trabalhos apontam os possíveis efeitos adversos causados pelo tamanho dos nanotubos, grau de pureza e concentração (Maynard et al. 2004). No entanto, controvérsias envolvem a interpretação atribuída aos dados de toxicidade dos NTC. (Foldvari et al. 2008).

Um dos primeiros estudos que investigaram a toxicidade de NTCs foi publicado em 2003 por Shvedova et al, que investigaram a citotoxicidade de SWNTs brutos (não-funcionalizados) em queratinócitos epidérmicos humanos. Seus resultados mostraram que a exposição aos SWNTs resultou em stress oxidativo acelerado, indicado pela formação de radicais livres e de acúmulo de produtos peroxidativos, esgotamento total de reservas de antioxidantes, e uma perda de viabilidade celular. A preparação dos NTCs continha uma grande proporção de metal catalisador (ferro e níquel), o que contribuiu significativamente para o stress oxidativo e diminuição da viabilidade celular.

Estudos subsequentes utilizando NTC mais purificados, porém ainda no estado bruto, também indicaram toxicidade celular, resultando em apoptose e necrose das células (Ding et al. 2005; Manna et al. 2005). Magrez et al (2006) e Tian et al (2006) também

mostraram que outros materiais baseados em carbono, tais como as nanopartículas de carbono, nanofibras de carbono, fuligem, e carbono ativo, parecem ser mais tóxico para as células do que MWNTs. Entre os nanotubos de carbono, os SWNTs parecem ser mais tóxico do que os MWNTs.

*In vivo*, algumas evidências indicam toxicidade relativamente leve dos nanotubos de carbono via oral, dérmica e sistêmica, como por exemplo injeções subcutâneas (Sato et al. 2005). Trabalhos realizados através da administração intravenosa de SWNT demonstraram que estes compostos são rapidamente eliminados da corrente sanguínea através de excreção renal, sem apresentar efeito patogênico evidente (Singh et al. 2006).

A toxicidade pulmonar por inalação é uma preocupação, uma vez que partículas nanométricas são consideradas mais tóxicas do que partículas de tamanho maior. Porém informações atuais sobre a toxicidade dos NTC neste órgão parecem contraditórias (Warheit et al. 2004; Foldvari et al. 2008). Todas estas controvérsias podem estar relacionadas as características dos NTCs utilizados, técnicas de síntese e nível de purificação no qual eles foram submetidos antes da exposição aos animais.

## **II - JUSTIFICATIVA**

## 2. Justificativa

*Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmoze bovina, atinge bovinos de regiões tropicais e subtropicais, sendo transmitido principalmente por carrapatos e moscas hematófagas. A doença é considerada um fator limitante para a pecuária em diversos países, devido à alta morbidade e mortalidade de rebanhos susceptíveis (Kocan et al. 2003). A prevenção da doença é realizada através do controle de vetores, uso profilático de antibióticos e a vacinação, por meio de vacinas vivas ou inativadas. Essas medidas não visam impedir a infecção, mas sim reduzir a ocorrência de casos clínicos e a mortalidade de animais decorrentes da intensa riquetsemia, e consequente redução do hematócrito provocada pelo *A. marginale* (Ribeiro & Lima, 1996).

Até recentemente, o *A. marginale* cultivado em células IDE8 foi considerado uma importante alternativa para o desenvolvimento de vacina inativada. Porém, estudos realizados por Kocan et al. (2001), de la Fuente et al. (2002), Garcia-Garcia et al. (2004) e Lasmar et al. (2012) demonstraram que animais imunizados com *A. marginale* derivado de cultura *in vitro* desenvolveram uma resposta imune preferencial a MSP1b, não impedindo os animais de tornarem-se infectados após desafio. Assim, novas abordagens deverão ser desenvolvidas para a utilização do cultivo *in vitro* do *A. marginale* em ensaios vacinais.

A MSP1a desempenha um papel importante na infecção do *A. marginale*, devido a presença de peptídeos em tandem, presentes na região N-terminal da proteína, que possibilita a adesão do *A. marginale* aos eritrócitos bovinos e células de carrapato (de la Fuente et al. 2003). Esta região é capaz de estimular a resposta imune do hospedeiro, impedindo o desenvolvimento da riquetsemia em animais vacinados (Brown et al. 1998a, 2001). Sua utilização como antígeno vacinal contra a anaplasmoze bovina poderia estimular a resposta humoral e celular dos animais, e até mesmo protegê-los contra desafios homólogos e heterólogos.

No entanto, sabe-se que proteínas exógenas, quando administradas isoladamente no organismo, podem ser rapidamente eliminadas ou degradadas, apresentarem baixa biodistribuição e solubilidade, além da possibilidade de sofrerem mudanças conformacionais indesejadas (Bianco et al. 2005; Klumpp et al. 2006). A utilização de

sistemas carreadores, capazes de transportar o peptídeo na concentração e local desejado, seria uma alternativa para aumentar a eficiência da distribuição e a apresentação do antígeno ao sistema imune. Devido a sua capacidade de se ligar a vários grupos funcionais, a biocompatibilidade com sistemas biológicos e a capacidade de serem internalizados por células, os nanotubos de carbono têm sido amplamente utilizados como carreadores de antígeno em ensaios vacinais (Pantarotto et al. 2003; Bianco et al. 2005; Yandar et al. 2008). Assim, é proposto neste trabalho a avaliação da imunogenicidade da proteína rMSP1a, do isolado UFMG2 de *A. marginale*, associada a nanotubos de carbono e a antígeno de *A. marginale* produzido em cultura de células IDE8.

## **III - OBJETIVOS**

### **3. Objetivos**

#### **3.1 - Objetivo Geral**

Avaliar a resposta imune humoral e celular de camundongos Balb/c imunizados com o fragmento recombinante da proteína MSP1a do isolado UFMG2 de *A. marginale*, utilizando nanotubos de carbono como molécula carreadora.

#### **3.2 - Objetivos Específicos**

- 1) Predizer epítomos reconhecidos por células B e células T presentes na seqüência da proteína MSP1a/UFMG2 utilizando ferramentas de bioinformática;
- 2) Expressar e purificar o fragmento recombinante da proteína MSP1a do isolado UFMG2 de *A. marginale*;
- 3) Produzir MWNT funcionalizados estavelmente com o fragmento rMSP1a;
- 4) Avaliar a resposta humoral (anti-IgG total) de camundongos da linhagem Balb/c imunizados com o fragmento rMSP1a em diferentes combinações, através da técnica de ELISA e Western blot;
- 5) Avaliar o perfil da resposta celular em camundongos imunizados com o fragmento rMSP1a em diferentes combinações, através de citometria de fluxo.

## **IV - MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. Material e Métodos

### PARTE I - Predição de epítomos na seqüência da proteína MSP1a/UFMG2 de *A. marginale*

#### 4.1.1 Predição de epítomos lineares de células B e células T CD8+

A predição de epítomos lineares de células B foi realizada utilizando-se o programa *BepiPred* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). Este software requer a entrada de seqüências únicas em formato FASTA e prediz potenciais epítomos de células B utilizando uma combinação de um modelo de Markov oculto e um método de escala de propensão baseados na hidrofiliidade e predição de estruturas secundárias. Valores acima de 1.3 foram considerados como potenciais epítomos de células B.

A predição de epítomos de células T citotóxicas (CTL) foi realizada utilizando-se o software *NetCTL* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>), no qual permite a predição de sítios de ligação de peptídeos à MHC de classe I. Como sugerido pelos autores do software, valores de score acima de 0,75 são considerados potenciais epítomos de CTL.

### PARTE II - Expressão e Purificação da proteína rMSP1a

#### 4.2.1 Produção do fragmento rMSP1a: Clonagem e Transformação

A seqüência parcial da proteína MSP1a do isolado UFMG2 de *A. marginale* foi obtida a partir de análise “*in silico*” das seqüências de MSP1a disponíveis no banco de dados do NCBI (*GenBank* EU676175.1) (Figura 3). Este isolado foi obtido a partir do sangue de um bezerro naturalmente infectado em Inhaúma-MG; não possui apêndice e apresenta alta virulência, por induzir alta morbidade e mortalidade em bovinos experimentalmente inoculados (Bastos, 2010).

O fragmento MSP1a/UFMG2 contém 339 bp e representa parte da porção N-terminal da proteína, sendo esta região considerada a porção imunogênica da MSP1a (de la Fuente et al. 2003; Garcia-Garcia et al. 2004).

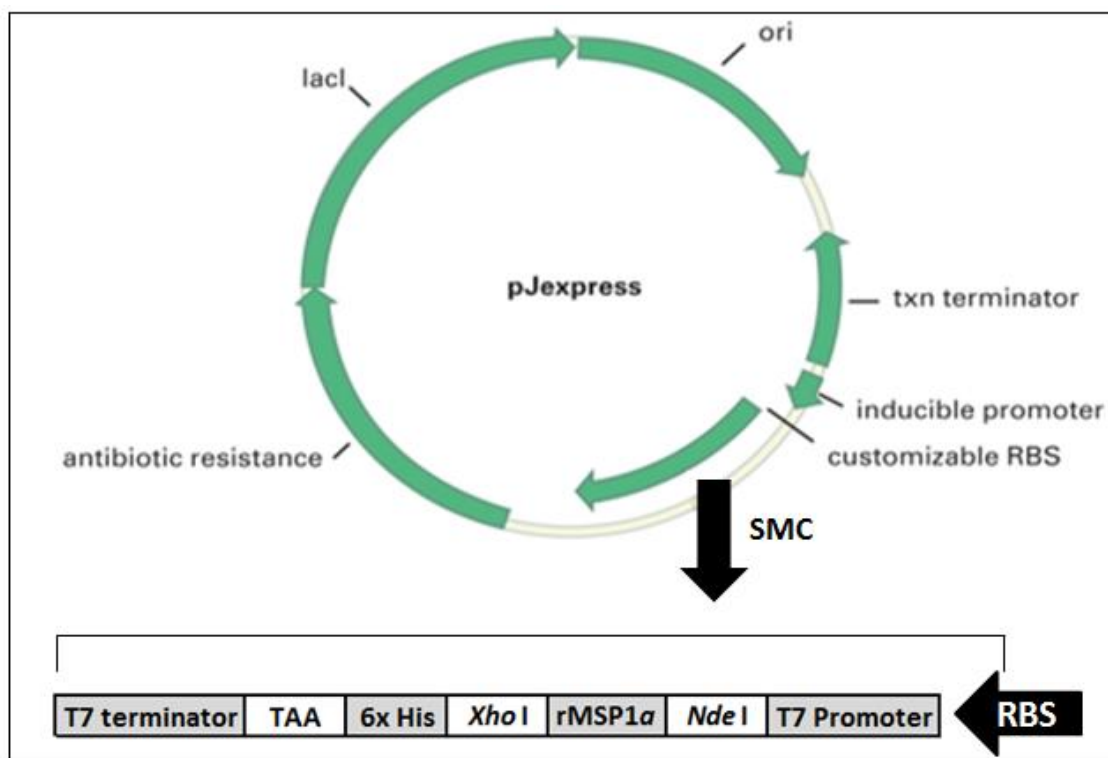
```
>gb |EU676175.1| Anaplasma marginale strain UFMG2 major
surface protein 1a gene

AGGAGGTAAAACATATGTCAGAGTTGTCCCTTCAGTCAACTGATAGCTCGTCAGCGAGTGG
TCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTTATCTCAAAGTGATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTA
GGAGCTGATAGCTCGTCAGCGAGTGGTCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTTATCTCAAAGTG
ATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATAGCTCGTCAGCGAGTGGTCAGCAGCA
AGAGAGTAGTGTGTTATCTCAAAGTGATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGAGCTGAT
TGGCGGCCAGAGATGCGCTCCAAGGTTGCGAGTGTGAGTACTTTTTGCTCGAGCACCATC
ACCACCATCATTAA
```

**Figura 3 - Sequência gênica parcial da proteína MSP1a (GenBank EU676175.1) obtida do isolado UFMG2 de *A. marginale*.**

Este fragmento foi inserido no vetor *pJexpress414* pela empresa americana DNA2.0<sup>®</sup>, utilizando o códon otimizado para expressão em *Escherichia coli*. Foram adicionados a sequência alvo sítios para as enzimas de restrição *NdeI* (CATATG) e *XhoI* (CTCGAG) nas extremidades 5' e 3' do fragmento respectivamente, além da sequência codificadora para seis resíduos de histidina e o códon de terminação TAA na extremidade C-terminal (Figura 4).

O vetor sintetizado foi eluído, segundo instruções do fabricante, e quantificados em NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (260/280 nm). Este plasmídeo foi utilizado para termo-transformação de bactérias *Escherichia coli* XL1-Blue quimiocompetentes (Phoneutria, MG, Brasil), para a produção do plasmídeo em maiores quantidades. Nesta reação, 100 ng do plasmídeo recombinante e 30 µl de bactérias *E. coli* XL1-Blue foram incubados em gelo por 10 minutos, seguido de choque térmico por um minuto e meio a 42°C, e nova incubação em gelo por mais dois minutos. Posteriormente, foi adicionado 500 µl de meio Circlegrow<sup>®</sup> líquido (MP Biomedicals), pH 7,0, e a mistura foi deixada sob agitação por 1 hora a 37°C para a expressão do gene de resistência. As células bacterianas potencialmente transformadas foram recuperadas por centrifugação, e plaqueadas em meio Circlegrow<sup>®</sup>/Ágar seletivo (ampicilina 100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.



**Figura 4 - Desenho esquemático do vetor de expressão *pJexpress414*.** Neste plasmídeo observam-se os sítios de origem de replicação (*ori*); gene da  $\beta$ - galactosidase que permite a seleção de organismos contendo o plasmídeo; o gene de resistência a ampicilina; sítio sintético de ligação ao ribossomo (RBS); região do promotor T7; sítio múltiplo de clonagem (SMC) que contém na porção 5' sítios para enzimas de restrições *NdeI* e *XhoI*, seqüência codificadora da proteína *MSP1a*, seqüência que codifica uma cauda de seis histidinas da proteína produzida, e o códon de terminação na porção C-terminal.

Os clones contendo o plasmídeo com o inserto *rMSP1a* foram selecionados e cultivados a 37°C por 16 horas em 3 ml de meio Circlegrow® líquido seletivo (MP Biomedicals) para a amplificação e purificação do DNA plasmidial, utilizando o kit Wizard® Plus SV Miniprep (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA purificado foram obtidas usando espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

Os plasmídeos recombinantes obtidos através da técnica de Miniprep foram utilizados para eletro-transformação de bactérias *E. coli* BL-21 para expressão da *rMSP1a*. Nesta reação, 100 ng do plasmídeo recombinante e 60  $\mu$ l de bactérias *E. coli* BL-21 foram adicionados a uma cubeta apropriada e eletroporada a 2,5 V. Após a adição de 500  $\mu$ l meio Circlegrow® líquido seletivo (ampicilina 100  $\mu$ g/ml), seguida de incubação a 37°C por 1 hora, a cultura foi plaqueada em meio Circlegrow®/Ágar

seletivo (ampicilina 100 µg/ml) e incubada a 37°C por 16 horas. Os clone positivos foram utilizados para padronização das melhores condições de expressão da rMSP1a.

#### 4.2.2 Mini-Expressão da proteína rMSP1a

A indução da expressão em pequena escala foi realizada com objetivo de padronizar as melhores condições de produção da rMSP1a, para serem aplicadas na expressão em larga escala.

Clones da linhagem *E. coli* BL-21 contendo o plasmídeo *pJexpress414+rMSP1a* foram cultivados em 10 ml de meio Circlegrow<sup>®</sup> líquido contendo ampicilina (100 µg/ml), à 37°C sob agitação constante de 150 rpm (incubadora refrigerada com agitação TECNAL modelo TE-421). Após 16 horas de incubação, a cultura foi diluída 1:10 em 10 ml de meio Circlegrow<sup>®</sup> líquido contendo ampicilina (100 µg/ml), e novamente incubada nas mesmas condições citadas acima. Ao atingir a densidade ótica de 0,4 – 0,6 a 600nm (O.D. <sub>600nm</sub>) uma alíquota de 1 ml da cultura foi coletada (tempo 0 hs), seguida da adição do indutor IPTG 1M (1µl/ml). A cultura foi mantida por 16 horas de incubação à 37°C, coletando-se alíquotas de 1 ml após 2hs, 3hs, 4hs e 16hs de indução. Posteriormente estas alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) conforme descrito no item 4.2.5.

O restante da cultura obtido após 16 horas de indução foi centrifugado a 8000 xg, 4°C por 20 minutos. O sedimento de bactérias foi ressuspensão em tampão de lise (20 mM fosfato de sódio; 20 mM imidazol) acrescido ou não de NaCl 50mM ou 500mM. Para otimizar o processo de lise bacteriana, o precipitado foi incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente com lisozima (0,5 mg/ml), seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento rápido. Após nova incubação com lisozima (0,5 mg/ml por 15 minutos), o meio foi submetido a 3 ciclos de sonicação de 15 segundos cada, seguido de 15 segundo em banho de gelo, com 30% de amplitude utilizando aparelho de ultrassom (Branson Sonc Power – Sonofer Cell Disruptor 450). O extrato protéico foi centrifugado a 11.000 xg, 4°C por 15 minutos, sendo o sobrenadante e o pellet submetidos à eletroforese SDS-PAGE 15% para verificar se a proteína rMSP1a se encontrava na fração solúvel ou insolúvel da cultura.

Além disso, outro protocolo foi realizado sem a execução da etapa de congelamento e descongelamento rápido, com objetivo de avaliar a real necessidade deste procedimento no processo de lise bacteriana. Neste protocolo a etapa de sonicação por ultrassom foi realizada entre as duas etapas de incubação com lisozima.

Após a análise do material obtido da lise bacteriana foram padronizadas as seguintes condições: utilização de tampão de lise acrescido de 50 mM NaCl; incubação com lisozima (0,5 mg/ml) por 15 minutos; três ciclos de sonicação em banho de gelo; nova incubação com lisozima (0,5 mg/ml) por 15 minutos, e centrifugação a 11.000 xg, 4°C por 15 minutos.

#### **4.2.3 Expressão e purificação da proteína rMSP1a**

Com a padronização das melhores condições de expressão e lise bacteriana, a expressão da rMSP1a em escala de 1 litro foi realizada. Clones bacterianos contendo o inserto recombinante foram selecionados e cultivados em tubos de 50 ml contendo 10 ml de meio Circlegrow<sup>®</sup> líquido seletivo (ampicilina 100 µg/ml), a 37°C sob agitação constante (150 rpm). Após 16 horas de incubação a cultura foi diluída 1:25 em 1 litro de meio Circlegrow<sup>®</sup> líquido seletivo (ampicilina 100 µg/ml) e incubada a 37°C sob agitação constante a 150 rpm. Ao atingir a O.D.<sub>600nm</sub> de 0,4 - 0,6 o indutor IPTG 1M (1µl/ml) foi acrescido à cultura para induzir a expressão da proteína recombinante.

Após a realização das melhores condições de expressão citadas no item 2.2, a cultura foi centrifugada a 8000 xg, 4°C por 20 minutos, e o precipitado de bactérias lisado em tampão de lise (20 mM fosfato de sódio; 20 mM imidazol; 50mM NaCl). O extrato protéico foi posteriormente centrifugado a 11.000 xg, 4°C por 15 minutos e o sobrenadante obtido foi submetido à filtração em membrana de 0,45µm, com objetivo de remover debris celulares produzidos após o processo de lise bacteriana. O lisado protéico produzido foi estocado a 4°C para posterior purificação.

A etapa de purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando colunas de Níquel Sepharose High Performance *HisTrap* HP<sup>®</sup> de 1 ml (GE Healthcare) conectadas no cromatógrafo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) multidimensional ÄKTAprime plus<sup>®</sup> (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com 16 ml de tampão de ligação pH 7,4 contendo 20 mM de fosfato de

sódio, 20 mM de imidazol e 50 mM NaCl. Após a aplicação do lisado protéico, a coluna foi novamente lavada com tampão de ligação até que nenhuma leitura fosse observada a 280nm. Após a corrida, as proteínas aderidas à matriz da coluna foram eluídas utilizando o tampão de eluição contendo 20 mM fosfato de sódio, 500 mM de imidazol e 50 mM NaCl, pH 7,4. Aliquotas das frações contendo o material não ligante à coluna (descarte) e a proteína eluída foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE 15% e posteriormente analisadas através da técnica de Western Blot (conforme descrito nos tópicos a seguir), com objetivo de confirmar a identidade da proteína produzida.

Após a confirmação da identidade da proteína as frações purificadas contendo a rMSP1a foram concentradas através da técnica de ultrafiltração de membrana utilizando tubos *Vivaspin20*<sup>®</sup> (GE Healthcare), até a concentração de 90 a 95% do volume. De acordo com as recomendações do fabricante, a proteína rMSP1a, de aproximadamente 13 kDa, foi centrifugada a 8000 xg, 4°C por 29 minutos, utilizando uma membrana com *cut off* de 5 kDa. Alternativamente, a ultrafiltração permitiu a remoção de sais e outros contaminantes, inclusive a redução significativa de imidazol presente na amostra.

Para verificar a quantidade de proteína após a etapa de concentração, as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford.

#### **4.2.4 Quantificação de proteínas (Método de Bradford)**

A determinação da concentração protéica foi realizada segundo Bradford (1976). O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue BG-250. Este método baseia-se na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas e aromáticas, possibilitando uma coloração diferencial em concentrações variadas de proteína.

A reação foi realizada em placas de 96 poços, na qual, em duplicata, foram adicionados em cada poço 20 µl das amostras em diferentes diluições e 180 µl do reagente de Bradford (0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% etanol; 10% ácido fosfórico). A leitura da intensidade da cor foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 595nm (VersaMax Elisa Microplate Reader – Molecular Devices), e os valores

obtidos foram comparados a uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 e 2,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , conforme a fórmula:  $[I]_{\text{proteína}} = a \cdot x + b \cdot fd \div cv$  ( $a$  = ângulo de inclinação da reta;  $x$  = média das leituras das amostras em duplicata;  $b$  = ponto de interseção no eixo  $y$ ;  $fd$  = fator de diluição;  $cv$  = fator de correção do volume para obter-se a concentração em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

#### **4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida 15% com SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), corados por Coomassie Brillante Blue R250. O gel é composto de duas fases, sendo a fase superior denominada gel de concentração ou empilhamento (acrilamida:bis-acrilamida 4%; Tris-HCl pH 6,8 0,5M; SDS 10%; 1% persulfato de amônio; 0,1% TEMED; água destilada), e a fase inferior denominada gel de separação (acrilamida:bis-acrilamida 15%; Tris-HCl pH 8,8 1,5M; SDS 10%; 1% persulfato de amônio; 0,1% TEMED; água destilada).

As amostras a serem analisadas foram incubadas em tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5M pH 6,8; 4% Glicerol, Bromophenol Blue 0,5%; 200 nM  $\beta$ -Mercaptoethanol e água deionizada) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15% com tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 25mM; Glicina 0,25mM; SDS 0,1%; água destilada) a uma voltagem de 70V, até as bandas atingirem o gel de separação, e 100V até o final da corrida.

Após a eletroforese, o gel foi corado pela solução de azul de Coomassie (45% metanol; 10% ácido acético; 0,25g Coomassie Brillante Blue R250; 45% água destilada) durante 15 minutos sob agitação e descorado com solução descorante (10% metanol; 5% ácido acético; 85% água destilada) por aproximadamente 2 horas. A visualização das bandas foi realizada por comparação com o padrão de peso molecular para proteínas (PageRuler Prestained Protein Ladder – 10 a 170 kDa, Thermo Scientific, EUA ou Prestained Protein Molecular Weight Market – 20 a 120 kDa, Thermo Scientific, EUA).

#### **4.2.6 Eletrotransferência da proteína rMSP1a – Western Blot**

Após a corrida eletroforética, a proteína rMSP1a foi transferida para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (*Amersham Hybond*<sup>TM</sup> – GE Healthcare), em um sistema semi-seco (Semi-dry blot cell transfer – Bio-Rad<sup>®</sup>, EUA), a 20V por 40 minutos, utilizando tampão contendo 20% de metanol, 18,5  $\mu$ M de Tris-base e 0,14 M de glicina, seguindo as recomendações do fabricante.

A membrana foi bloqueada em tampão PBST/caseína (PBS 1x; 0,05% Tween 20; caseína 5%) por aproximadamente 16 horas, sob agitação. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com intervalo de cinco minutos em tampão PBST (PBS 1x; 0,05% Tween 20), seguida da incubação por 1 hora com o anticorpo primário Mouse anti-His (GE Healthcare Life Sciences), diluído 1:2000 em tampão PBST. Após três lavagens com tampão PBST, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma, EUA), diluído na concentração de 1:2000 em tampão PBST, seguido de mais um ciclo de lavagem. A revelação foi realizada com solução contendo 0,5 mg/ml de 3,3'diaminobenzidina (DAB), 0,25 mg/ml de 4-cloronaftol, 8% de metanol e 0,042% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diluídos em PBS 1x. A reação foi interrompida com água destilada e a visualização da banda foi realizada por comparação com o padrão de peso molecular para proteínas (PageRuler Prestained Protein Ladder – 10 a 170 kDa, Thermo Scientific, EUA).

### **PARTE III - Nanotubos de Carbono**

#### **4.3.1 Obtenção dos nanotubos de paredes múltiplas (MWNT)**

Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWNT) picotados e carboxilados foram produzidos no Laboratório de Crescimento de Cristais do Departamento de Física do ICEx/UFMG, e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira através da colaboração com o Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG). Os MWNTs utilizados neste trabalho apresentavam 500nm de comprimento por 40nm de diâmetro, sendo sintetizados pela técnica de

Descarga por Arco Elétrico, na qual, sob altas temperaturas, a condensação e deposição de átomos de carbono são alcançadas através da sublimação do grafite; e então carboxilados pelo método de oxidação em ácido nítrico (Rosca et al. 2005).

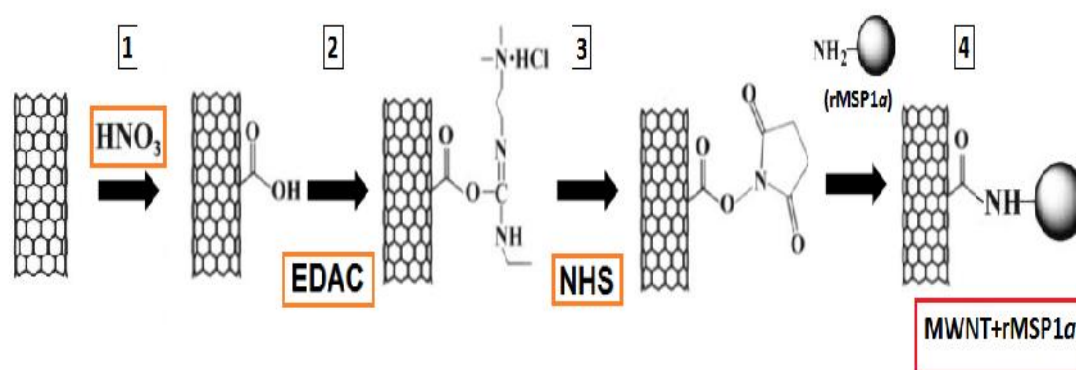
#### **4.3.2 Solubilização dos MWNT**

O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) é utilizado para oxidar MWNT, produzindo grupos carboxílicos principais que contribuem para a solubilização dos MWNT em solução aquosa (Rosca et al. 2005). Após tratamento com  $\text{HNO}_3$ , 10 mg de MWNT foram adicionados a um tubo de vidro contendo 15 mL de água deionizada, e incubados por 2 horas em gerador de banho ultrassônico (Branson 1210), agitando-se a cada 30 minutos de incubação. O material contendo os MWNT solúveis foram autoclavados e armazenados a temperatura ambiente.

#### **4.3.3 Funcionalização dos MWNT com rMSP1a**

A funcionalização dos MWNT com rMSP1a, ou seja, a ligação covalente entre os radicais carboxílicos presentes na superfície dos MWNTs e os radicais amínicos da proteína rMSP1a, foi realizada através da reação de amidação ativada por diimida (Jiang et al. 2003). Nesse processo, utiliza-se o cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) como agente acoplante intermediário entre os radicais carboxila presentes na superfície dos MWNTs e a porção amina da proteína. Porém, esse composto é instável em solução aquosa e sua utilização no acoplamento direto entre MWNT e proteína proporciona ligações intermoleculares indesejáveis entre as proteínas, uma vez que a maioria destas são ricas em ambos os grupos amino e ácido carboxílico em sua superfície. No entanto, esta ligação intermolecular pode ser evitada através do agente estabilizante N-hidroxisuccinimida (NHS), que converte os ácidos carboxílicos em ésteres ativos, que em seguida são submetidos à reação de substituição nucleofílica com os grupos amina da proteína, resultando na formação de uma ligação amida entre os MWNT e as proteínas (Figura 5).

## Funcionalização

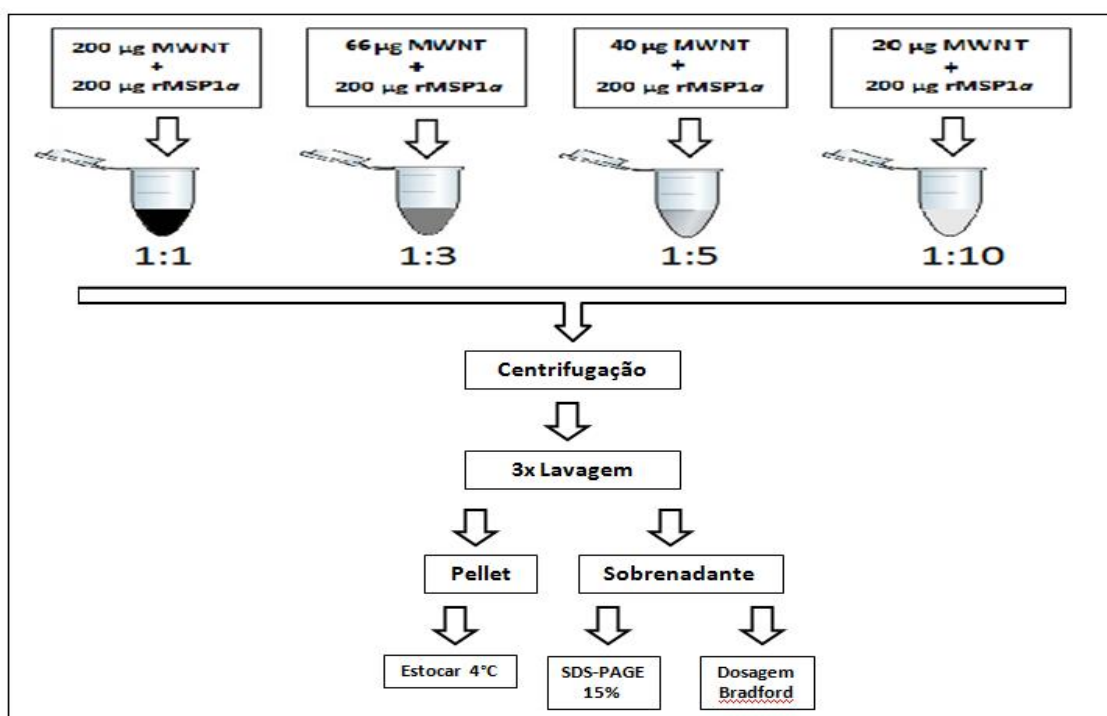


**Figura 5 - Desenho esquemático do processo de funcionalização covalente entre MWNT e rMSP1 $\alpha$ :** 1) oxidação em ácido nítrico para adicionar radicais carboxila aos MWNT; 2) a adição do agente acoplante EDAC leva a formação de um composto intermediário altamente reativo, porém instável em solução aquosa; 3) adição do NHS forma um éster ativo mais estável; 4) o éster ativo sofre uma reação de substituição nucleofílica e reage com os grupos amina das proteínas, formando a ferramenta MWNT+rMSP1 $\alpha$ .

A funcionalização dos MWNT com rMSP1 $\alpha$  foi realizada com a adição de 188  $\mu\text{l}$  de tampão MES 500 mM pH = 6,1 (ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado), 432  $\mu\text{l}$  de NHS (50mg/ml) e 938  $\mu\text{l}$  MWNT solubilizados. Após agitação rápida, 225  $\mu\text{l}$  de EDAC (10 mg/ml) foi rapidamente adicionado e a mistura mantida sob agitação rápida em vórtex (Phoenix AP56) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 16000 xg, 25°C por 10 minutos, e o sobrenadante descartado para eliminar resíduos de EDAC e NHS.

A padronização da funcionalização entre MWNT+rMSP1 $\alpha$  foi realizada testando-se quatro proporções de nanotubos : proteína (1:1, 1:3, 1:5 e 1:10 – peso:peso), a fim de se verificar em qual destas proporções houve uma maior eficiência na funcionalização com menos proteína sendo eliminada nas lavagens (Figura 6). A quantidade de proteína manteve-se constante em todas as proporções (200  $\mu\text{g}$ ), variando-se a quantidade de MWNT que se ligará covalentemente às proteínas (200 66, 40 e 20  $\mu\text{g}$  respectivamente). Os MWNT tratados com EDAC foram ressuspensos em 1,5 mL de tampão MES 50 mM pH=6,1, e divididos em 4 alíquotas nas proporções citadas acima (Figura 6). Posteriormente foi adicionado 200  $\mu\text{g}$  rMSP1 $\alpha$  em cada alíquota, e o volume final

ajustado para 1 mL com tampão MES 50 mM pH 6,1. As alíquotas foram incubadas a 4°C, por 1 hora sob agitação constante (150 rpm), e posteriormente submetidas a três centrifugações de 9600 xg, 4°C por 10 minutos, com objetivo de remover as proteínas que não se ligaram aos MWNTs. O sobrenadante das lavagens foram estocados a 4°C e o pellet ressuspensionado em 1 mL de tampão MES 50 mM pH=6,1. Para identificar a melhor proporção de MWNT : rMSP1 $\alpha$ , o sobrenadante coletado em todas as três lavagens foram quantificados pelo método de Bradford e corridos em gel SDS-PAGE 15%.



**Figura 6** – Desenho esquemático da padronização da proporção MWNT : rMSP1 $\alpha$  utilizado no processo de funcionalização covalente.

## **PARTE IV - Avaliação da resposta humoral de camundongos Balb/c imunizados com rMSP1 $\alpha$ em diferentes combinações.**

### **4.4.1 Animais experimentais**

Foram utilizados trinta e seis fêmeas de camundongo da linhagem Balb/c, com idade entre 6 a 8 semanas, procedentes do Centro de Bioterismo (Cebio) do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em gaiolas plásticas com dimensões de 30x18x22 cm, submetidos a ciclo de claro e escuro, controle de ventilação e receberam ração e água a vontade. Os animais foram vermifugados com Sulfóxido de Albendazole (0,6  $\mu$ g/mL), disponibilizado na água por 24 horas. Após 14 dias da vermifugação, os animais foram utilizados no experimento. A utilização desses animais foi realizada de acordo com os procedimentos éticos aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG – N° protocolo: 298/2012).

### **4.4.2 Delineamento experimental**

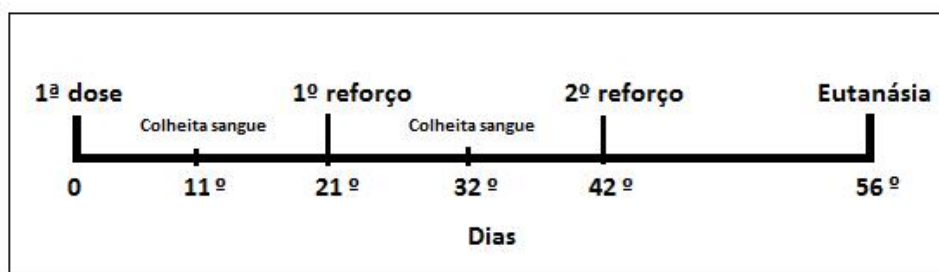
A imunogenicidade da rMSP1 $\alpha$ , e suas diferentes combinações, foi avaliada através da imunização dos camundongos utilizando um protocolo homólogo de 3 doses intervaladas de 21 dias, via subcutânea. Os camundongos foram distribuídos em 6 grupos de 6 animais cada, e imunizados ao lado da cauda com 200  $\mu$ l das respectivas soluções:

**Tabela 2** - Esquema de imunização dos camundongos Balb/c

GRUPO	(n)	DOSE	Adjuvante
<b>Não Imunizados (NI)</b>	6	**	**  + 50 µl Adjuvante Emulsigen®
<b>PBS</b>	6	150 µl de PBS	
<b>rMSP1a</b>	6	25 µg de rMSP1a	
<b>MWNT</b>	6	18 µg de MWNT	
<b>MWNT+rMSP1a</b>	6	18 µg de MWNT funcionalizados com 25 µg de rMSP1a	
<b>Vacina Completa</b>	6	18 µg de MWNT funcionalizados com 25 µg de rMSP1a + 25 µg de antígeno de <i>A.marginale</i> sonicado, produzido em cultura celular	

Amostras sanguíneas foram coletadas através de punção da veia caudal no dia zero e no 11º dia após a primeira e a segunda imunização, para avaliação dos níveis de IgG total anti-rMSP1a através da técnica de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e Western Blot (Figura 7).

Após 14 dias da última dose, os animais receberam 100 µl de solução anestésica (ketamina 21%, xilazina 8%, PBS) e foram sangrados através do plexo axilar. Em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical para remoção do baço e posterior análise da resposta celular. O sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos, e o soro obtido foi armazenado a -20°C para avaliação dos níveis de IgG total anti-rMSP1a através da técnica de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e Western Blot. Uma alíquota do soro foi armazenada em freezer -80°C, com objetivo de avaliar o perfil de citocinas em cada grupo.



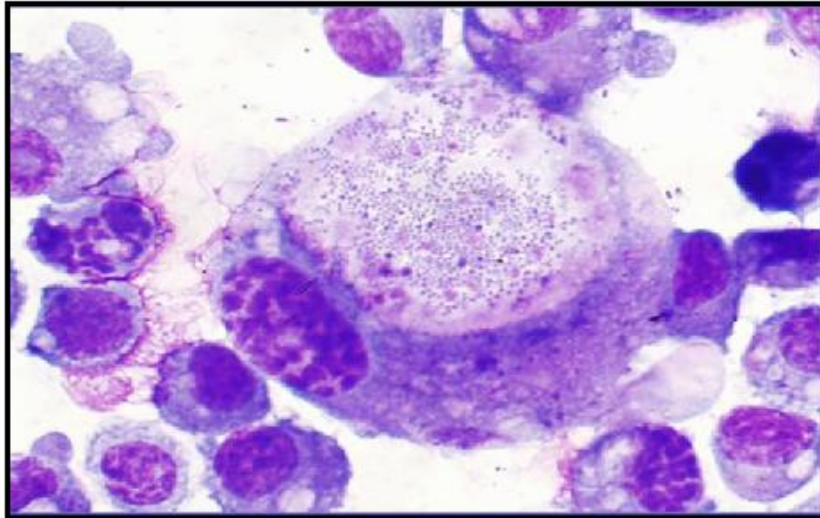
**Figura 7 - Esquema do protocolo de imunização de 3 doses (dose-reforço-reforço):** As doses foram administradas via subcutânea com 200 µl das soluções apresentadas na tabela 1, com intervalo de 21 dias entre as imunizações. A coleta do sangue foi realizada 11º dia após a 1ª dose e o 1º reforço, e o sacrifício dos animais foi realizado no 14º dia após o 2º reforço para coleta de sangue e baço.

#### 4.4.3 Cultivo *in vitro* do isolado UFMG2 de *A. marginale*

O cultivo e a manutenção *in vitro* do *A. marginale* em células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8) tem sido realizado no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG. Estas células foram gentilmente cedidas pela Dra. Bell-Sakyi (CTVM, University of Edinburgh, UK) com permissão da Dra. U. G. Munderloh (University of Minnesota, USA), sendo mantidas em meio L-15B (Leibovitz), com pH entre 6,8 a 7,2, e suplementado com 10% de caldo de triptose fosfatada, 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de lipoproteína bovina concentrada, 1% de L-glutamine 200nM. As células livres são mantidas em garrafas com área de 25cm<sup>2</sup>, incubadas à temperatura de 32°C e o meio de cultura é trocado semanalmente.

A infecção das células IDE8 com *A. marginale* foi realizada inicialmente a partir de amostras de sangue bovino infectado com isolado UFMG2 de *A. marginale*, crioperservada em nitrogênio líquido, utilizando o DMSO como crioprotetor. Infecções subseqüentes foram realizadas por meio de repique de células infectadas em garrafas de células livres.

As células infectadas foram mantidas em meio L-15B suplementado com MOPS (3-(N-Morfolino) Ácido Propanossulfônico), pH à 7,2 e mantidas a temperatura de 34°C (Figura 8). Os corpúsculos iniciais de *A. marginale* produzidos neste sistema *in vitro* foram purificados segundo Silvestre et al. (2010), no qual as células infectadas foram centrifugadas a 9.000 xg, 4°C por 15 minutos, e o pellet formado foi homogeneizado e incubado com tripsina por 20 minutos à 37°C. Após a adição de PBS estéril, as células foram rompidas mecanicamente e centrifugadas a 2.300 xg por 5 minutos à 18°C. O pellet foi descartado e os corpúsculos presentes no sobrenadante foram quantificados em câmara hemocimétrica e posteriormente submetidos a 4 ciclos de sonicação de 30 segundos cada, seguido de 30 segundos em banho de gelo, com 30% de amplitude. Após a ruptura dos corpúsculos, uma alíquota do material foi utilizada para quantificação das proteínas utilizando o método de Bradford.



**Figura 8** – Colônia de *A. marginale* em células IDE8 após 12 a 14 dias de infecção *in vitro* (aumento 100x).

#### **4.4.4 ELISA para determinação dos níveis de anticorpos**

A análise de anticorpos específicos IgG total contra a rMSP1 $\alpha$ , produzidos pelos camundongos imunizados, foi realizada através do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). Antes da realização do teste, foi realizada a padronização das concentrações de antígeno, soro e conjugado.

##### **4.4.4.1 Padronização da concentração antígeno – rMSP1 $\alpha$**

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc MaxiSorp<sup>®</sup>) foram adsorvidas com cinco concentrações diferentes de rMSP1 $\alpha$  (0,5  $\mu$ g; 0,25  $\mu$ g; 0,12  $\mu$ g; 0,6  $\mu$ g; 0,3  $\mu$ g/poço) em tampão carbonato (0,05 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6), a 4°C por 18 horas. Após a etapa de sensibilização, a placa foi lavada três vezes com PBST (PBS 1x + Tween 20 0,05%), e incubada com 100  $\mu$ l/poço da solução de bloqueio (PBS 1x + 2% caseína) por 2 horas a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com PBST, e em seguida foi adicionado 100  $\mu$ l/poço do soro dos animais em duplicata (pool de grupo), diluído 1:50 em PBST + 0,25% caseína. Após 1 hora de incubação, a placa foi lavada com PBST e incubada com 100  $\mu$ l/poço o anticorpo secundário anti-Mouse IgG Peroxidase

Conjugate (Sigma, EUA), diluído 1:10000 em PBST + 0,25% caseína. A placa foi mantida no escuro por 1 hora a temperatura ambiente, e em seguida lavada com PBST. Foram adicionados 100 µl/poço do substrato enzimático TMB (Tetrametil benzidina) e a placa incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 100 µl/poço de ácido sulfúrico 2M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura foi feita em leitor de microplacas com filtro de 450 nm (VersaMax Elisa Microplate Reader - Molecular Devices). Para identificar a melhor concentração de rMSP1a, os dados obtidos foram plotados em histogramas, e subsequentemente usados para calcular a razão S/N (razão entre a absorbância da amostra positiva pela absorbância da amostra negativa).

#### **4.4.4.2 Padronização da concentração de soro**

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc MaxiSorp<sup>®</sup>) foram adsorvidas com a rMSP1a (na concentração determinada no item anterior) e incubadas com soro dos animais (pool/grupo - duplicata) em seis concentrações diferentes: 1:100 / 1:200 / 1:400 / 1:800 / 1:1600 e 1:3200, diluídos em PBST + 0,25% caseína. Foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 4.4.1.

#### **4.4.4.3 Padronização da concentração do conjugado (anti-mouse IgG)**

Foram avaliadas quatro concentrações diferentes do anticorpo secundário anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma, EUA): 1:10000, 1:20000, 1:40000 e 1:80000, diluídos em PBST + 0,25% caseína, seguindo a metodologia descrita no item 4.4.2. Após a etapa de padronização do antígeno, soro e conjugado todas as 36 amostras de soro foram testadas nestas condições.

#### **4.4.5 Avaliação de títulos de anticorpos IgG anti-rMSP1a**

A titulação de anticorpos IgG anti-rMSP1a foi realizada através da técnica de ELISA, utilizando os soros dos animais do grupo PBS, rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa, obtidos após a terceira imunização. Os soro foram avaliados em *pools*

de grupo e diluídos seriadamente de 1:400 até 1:291.600. O valor de *cut off* foi utilizado para determinar o ponto limite entre as amostras positivas e negativas, no qual foi representado pela média obtida do grupo PBS + 3x desvio padrão.

#### **4.4.6 Western Blot**

A metodologia utilizada nesta etapa foi a mesma descrita no item 2.6. Neste caso, a hibridização do anticorpo primário foi realizada incubando a membrana de PVDF com soro dos animais (pool de grupo), diluídos de 1:200 em PBST 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente.

### **PARTE V - Avaliação da resposta celular**

#### **4.5.1 Análise de proliferação celular por marcação com BrdU**

Para avaliar o reconhecimento da proteína rMSP1a pelos esplenócitos dos camundongos imunizados, foi realizado o ensaio de proliferação celular *in vitro* utilizando o kit BrdU Cell Proliferation Assay (Millipore, EUA). O bromodeoxiuridina (BrdU) é um nucleosídeo sintético não radioativo análogo da timidina, que é incorporado às novas fitas de DNA sintetizadas pelas células em proliferação. Assim, quanto maior a incorporação de BrdU, maior é a atividade proliferativa das células analisadas.

Os baços dos trinta e seis camundongos foram coletados e armazenados em 3 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico e 1% de antifúngico. As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços com o auxílio de lâminas de borda fosca, seguido da centrifugação a 180 xg, por 10 minutos a 4°C. A lise das hemácias foi realizada através da adição de 10 mL de solução de cloreto de amônio ao precipitado de células (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M; KHCO<sub>3</sub> 10 mM; EDTA 0,1mM; água destilada), seguido de agitação rápida e incubação por 20 minutos em banho de gelo. O material foi centrifugado a 180 xg, 4°C por 10

minutos, e o pellet foi ressuspendido em 10 mL de meio RPMI 10% SFB. A suspensão de células foi novamente submetida a etapa de centrifugação (180 xg, 4°C por 10 minutos), e ressuspendida em 1 mL RPMI 10% SFB para avaliação da viabilidade celular utilizando o corante azul de Tripán. Após a contagem das células viáveis em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer, as suspensões de células foram distribuídas em placas de cultura celular de 96 poços (Costar® 96-well tissue culture clusters), dispostas em duplicata, na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço. Os esplenócitos receberam como estímulo 20 µg/mL rMSP1a (= 1µg/poço), 5 µg/mL Conavalina A ou apenas meio RPMI 0% SFB (sem estímulo). As placas contendo dos diferentes estímulos foram incubadas por 72 horas, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura sem estímulo (RPMI 0% SFB) foi utilizada como controle interno negativo, e a cultura estimulada com o mitógeno (Con A) como controle positivo, na qual foi avaliada a capacidade imunoproliferativa dos esplenócitos. As placas contendo os diferentes estímulos foram preparadas em duplicata, com objetivo de realizar tanto a análise de proliferação celular (kit BrdU) quanto na imunofenotipagem de linfócitos T CD4+, CD44+ e CD62+.

A avaliação da proliferação celular foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante do kit. Após o período de incubação de 72 horas foram adicionados 20 µl/poço do BrdU, seguido de nova incubação por 18 horas, 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após centrifugação a 179 xg, 25°C por 10 minutos, o sobrenadante foi armazenado em freezer -80°C, para posterior dosagem de citocinas, e as células foram fixadas na superfície da placa onde foi realizada a desnaturação do DNA. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, seguido da incubação por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo anti-BrdU. Após nova etapa de lavagem, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário Goat anti-Mouse IgG conjugado a peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as placas foram lavadas e o substrato TMB foi adicionado. Após incubação de 30 minutos no escuro a temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 2M, e a absorbância medida em leitor de microplacas com filtro de 450 nm (VersaMax Elisa Microplate Reader - Molecular Devices). Além das amostras, foram realizados dois controles: poços contendo os esplenócitos na ausência do BrdU, e poços contendo apenas meio RPMI 0%.

#### **4.5.2 Avaliação da população de linfócitos T CD4+, CD44+ e CD62+**

Após 48 horas de incubação com os diferentes estímulos (RPMI, Con A ou rMSP1 $\alpha$ ), as placas contendo a cultura de esplenócitos foram utilizadas para avaliar a frequência de células T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62L+. As células foram lavadas (PBS, azida sódica 0,1%, albumina de soro bovino 0,5% - pH=7,2) e coletadas com auxílio de pipetas. Posteriormente foram divididas em tubos de citometria, e duplamente marcadas com anticorpos específicos para CD4 (0.5 mg/mL, clone H129.19) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e CD44 PE (0,2 mg/mL, clone IM7) conjugados com ficoeritrina (PE), ou CD4-FITC e CD62L-PE clone (0.2 mg/mL, MEL-14) durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação as células foram novamente lavadas e centrifugadas a 1300 rpm, 4°C por 10 minutos, esse processo foi repetido por 2 vezes. O sobrenadante foi descartado e as células foram então fixadas em solução fixadora para citometria – Max Fax Fix (PBS, 5% formaldeído, 5% cacodilato, pH=7,2). As células foram estocadas a 4°C, protegidas da luz, até o momento da leitura em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA). Foram selecionadas apenas as populações de linfócitos, e para a realização da leitura foram adquiridos aproximadamente 20 mil eventos de células. As análises foram feitas pelo software flowjo ©Tree Star, Inc. 1997 - 2012. Controles marcados com FITC e PE foram usados para calibração do aparelho.

#### **4.5.3 Determinação da produção de citocinas por ELISA de captura (R&D® Systems, EUA) e por *Cytometric Bead Array* (kit CBA - BD® Biosciences)**

Após 72 horas de incubação com os diferentes estímulos (RPMI 0%, 5 $\mu$ g/mL ConA e 20 $\mu$ g/mL rMSP1 $\alpha$ ), o sobrenadante da cultura de esplenócitos foi utilizado para detectar e quantificar citocinas IL-4, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  utilizando kits comerciais (R&D® Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de acordo com as instruções do fabricante. Para detecção das citocinas as placas foram sensibilizadas utilizando anticorpos de captura específicos diluídos em PBS pH 7,4, posteriormente bloqueadas com PBS BSA1% e incubadas durante 2 horas com o

sobrenadante da cultura de esplenócitos. Anticorpos de detecção biotinilados combinados com estreptavidina-HRP (Amersham Biosciences, EUA), e o cromógeno OPD (O-Fenilenodiamina) foram utilizados para detectar e revelar a reação. Após a interrupção com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M, a reação colorimétrica foi analisada em leitor de microplacas de ELISA a 492nm. O cálculo das concentrações finais de citocinas foram obtidos utilizando o programa SoftMax® Pro 4.8, e os resultados obtidos em pg/mL.

A dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10 do soro dos camundongos após a última imunização foi realizada através da técnica de citometria de fluxo, utilizando o kit *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1, Th2, Th17 Cytokine Kit* (BD® Biosciences, USA). Este kit apresenta uma alta sensibilidade, sendo capaz de detectar baixas concentrações destas citocinas (0,1 a 5000 pg/mL). Em resumo, os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para cada citocina, e com anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 500  $\mu$ l da solução de lavagem e o material centrifugado a 1300 rpm, 18°C por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ l da solução de lavagem para posterior leitura em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software *BD CBA Analysis Software*, por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit, sendo a concentração dos analitos na amostra determinado em pg/mL.

#### **4.6 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados gerados foi realizada utilizando o software *Graph Pad Prism 5.0*, sendo o teste de Kolmogorov-Smirnov inicialmente utilizado para determinar a normalidade dos dados. Os resultados paramétricos passaram pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para múltiplas comparações. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

## **V – RESULTADOS**

## 5. Resultados

### PARTE I – Predição de epítomos de células B e T

#### 5. 1 Predição de epítomos lineares de células B e epítomos CTL

A figura 9 mostra as seqüências de epítomos de células B e CTL preditas com o auxílio do software *BepiPred* e *NetCTL*. Os resultados apontam que a seqüência da proteína MSP1a do isolado UFMG2 de *A. marginale* apresenta 3 regiões possíveis de ligação de células B (SSSASGQQQ) (Figura 9A), além de quatro epítomos de ligação com MHC de classe I. Destes, três epítomos apresentavam a seqüência QSDQASTSS, e um apresentando a seqüência RSKVASVEY (Figura 9B).

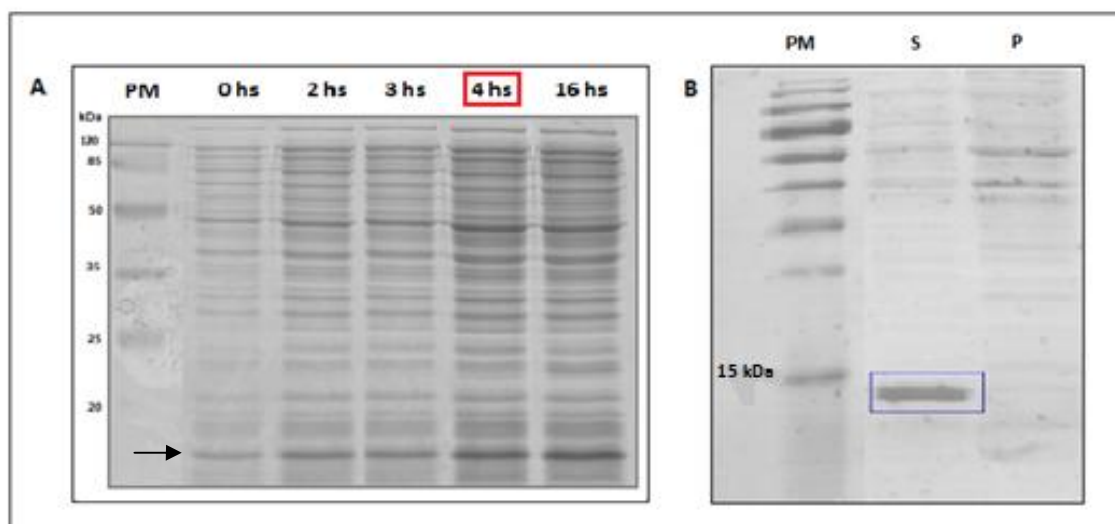


**Figura 9 - Predição de epítomos de células B e CTL:** A seqüência da MSP1a-UFMG2 foi submetida a análise de predição de epítomos de células B (letra A) e CTL (letra B) utilizando os softwares *BepiPred* e *NetCTL*. A letra C representa a localização de todos os epítomos preditos pelos servidores.

## PARTE II – Obtenção da proteína rMSP1a

### 5.2 Expressão e Purificação da proteína rMSP1a

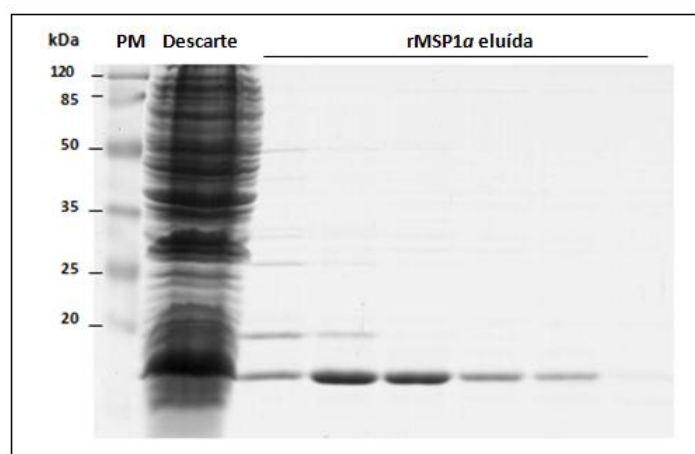
O melhor tempo de indução da expressão da rMSP1a foi determinado em 4 horas, no qual evidenciou-se uma nítida banda de peso molecular compatível com a sequência alvo ( $\pm 13$  kDa). O perfil das proteínas bacterianas demonstrou que os clones de *E. coli* BL-21 apresentaram uma produção basal de rMSP1a antes mesmo da indução com IPTG (tempo 0 hs) (Figura 10A). Após a etapa de lise bacteriana foi possível verificar que a proteína rMSP1a se apresentou no sobrenadante do lisado (fração solúvel), não havendo a necessidade da utilização de agentes desnaturantes para sua purificação (Figura 10B).



**Figura 10** - (A) Gel SDS-PAGE 15% corado por azul de Coomassie indicando o melhor tempo de indução da expressão da rMSP1a: T0 = clones de *E. coli* BL-21 não induzidos com IPTG; T1 a T16 = tempos de expressão, em horas, após a indução com IPTG 1 M; PM = marcador de peso molecular. (B) Western blot da rMSP1a após a lise bacteriana, indicando a presença da proteína na fração solúvel da cultura: S = sobrenadante da lise bacteriana (fração solúvel); P = pellet da lise bacteriana (fração insolúvel); PM = marcador de peso molecular. O anticorpo mouse anti-histidina (GE Healthcare Life Sciences), diluído 1:2000 foi utilizado como anticorpo primário.

Após a padronização das melhores condições de expressão e lise bacteriana, a expressão da rMSP1a foi realizada em maior escala. Clones de *E. coli* BL-21, contendo o inserto recombinante, foram cultivados em meio líquido seletivo a 37°C, por 4 horas de indução com IPTG 1M e submetidos a centrifugação. A fração solúvel da cultura foi

submetida à cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando colunas de Níquel Sepharose High Performance *HisTrap* HP<sup>®</sup> de 1 ml (GE Healthcare) conectadas no cromatógrafo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) multidimensional ÄKTAprime plus<sup>®</sup> (GE Healthcare). A eficiência da purificação foi confirmada através da análise das frações eluídas durante o processo cromatográfico por gel SDS-PAGE 15% (Figura 11). Apesar da grande quantidade de proteína observada no descarte da cromatografia, a quantidade de rMSP1 $\alpha$  obtida foi suficiente para realizar as etapas de imunizações e as posteriores análises.



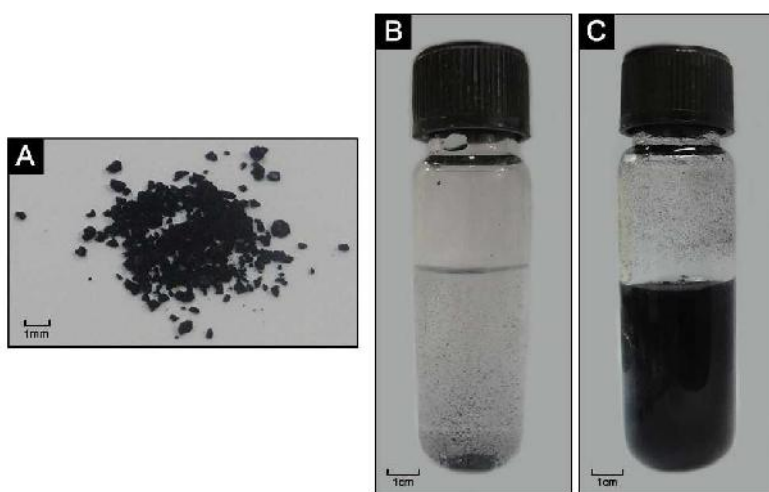
**Figura 11 - Gel SDS-PAGE 15% da purificação da rMSP1 $\alpha$  através de cromatografia de afinidade ao níquel utilizando colunas de níquel *HisTrap* HP<sup>®</sup> (GE Healthcare):** Descarte = porção proteica não ligada à coluna de níquel; rMSP1 $\alpha$  eluída = proteína eluída da coluna após adição do tampão de eluição (500 mM de imidazol); PM = marcador de peso molecular.

As frações contendo a rMSP1 $\alpha$  eluída, foram agrupadas e concentradas através da técnica de ultrafiltração de membrana utilizando tubos Vivaspin20<sup>®</sup> (GE Healthcare). A identidade da proteína foi confirmada pelo anticorpo anti-histidina, através da técnica de Western Blot (dado não mostrado). Após a confirmação da identidade da proteína, o material concentrado foi quantificado pelo método de Bradford, apresentando a concentração de 2,0 mg/L de cultura.

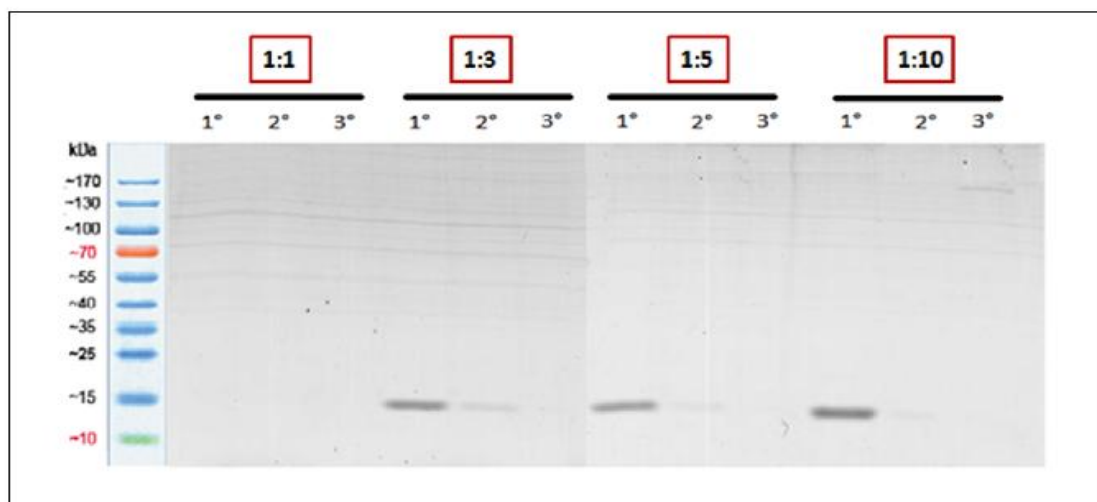
## PARTE III – Nanotubos de Carbono

### 5.3 Funcionalização covalente dos MWNT com rMSP1a

Após a solubilização dos MWNT em água deionizada (Figura 12), os nanotubos de carbono foram funcionalizados a rMSP1a. O sobrenadante das quatro proporções de nanotubos : proteína foram preparados e corridos em gel SDS-PAGE 15%, a fim de se verificar em qual das proporções houve uma maior eficiência da funcionalização com menos proteína sendo eliminada nas lavagens. Foi possível verificar que na proporção 1:1 as proteínas rMSP1a foram capazes de se ligarem covalentemente a porção carboxilada dos MWNTs, não sendo observado banda de tamanho esperado ( $\pm 13$  kDa) em nenhuma das três lavagens. Na proporção 1:3 as proteínas rMSP1a adicionadas se ligarem aos MWNTs carboxilados, saturando o processo de ligação, sendo detectadas nas duas primeiras lavagens. Na terceira lavagem a banda já não foi detectada, o que indica a eliminação de todas as proteínas não-funcionalizadas. Nas proporções subsequentes (1:5 e 1:10), a quantidade de rMSP1a eliminada foi ainda maior, indicando que os MWNT alcançaram sua capacidade máxima de funcionalização (Figura 13). Assim, a proporção 1:3 (terceira lavagem) foi escolhida para a formação da ferramenta MWNT+rMSP1a.



**Figura 12 - Solubilização dos MWNT em água deionizada:** A) Cristais de MWNT carboxilados. B) MWNT adicionados em água deionizada antes de serem sonicados. C) Solução contendo MWNT solúveis (imagem cedida por Astigarraga et al. 2011).



**Figura 13 - Gel SDS-PAGE 15% da padronização da funcionalização MWNT+rMSP1a:** Os sobrenadantes das lavagens foram aplicados em gel SDS-PAGE 15%, com objetivo de identificar a proporção ideal de MWNT : rMSP1a. 1ª, 2ª e 3ª correspondem, respectivamente, a primeira, segunda e terceira lavagem após a funcionalização. 1:1 = proporção igual peso/peso de MWNT e rMSP1a; 1:3 = três vezes a quantidade de rMSP1a em relação aos MWNT; 1:5 = cinco vezes a quantidade de rMSP1a em relação aos MWNT; e 1:10 = dez vezes a quantidade de rMSP1a em relação aos MWNT.

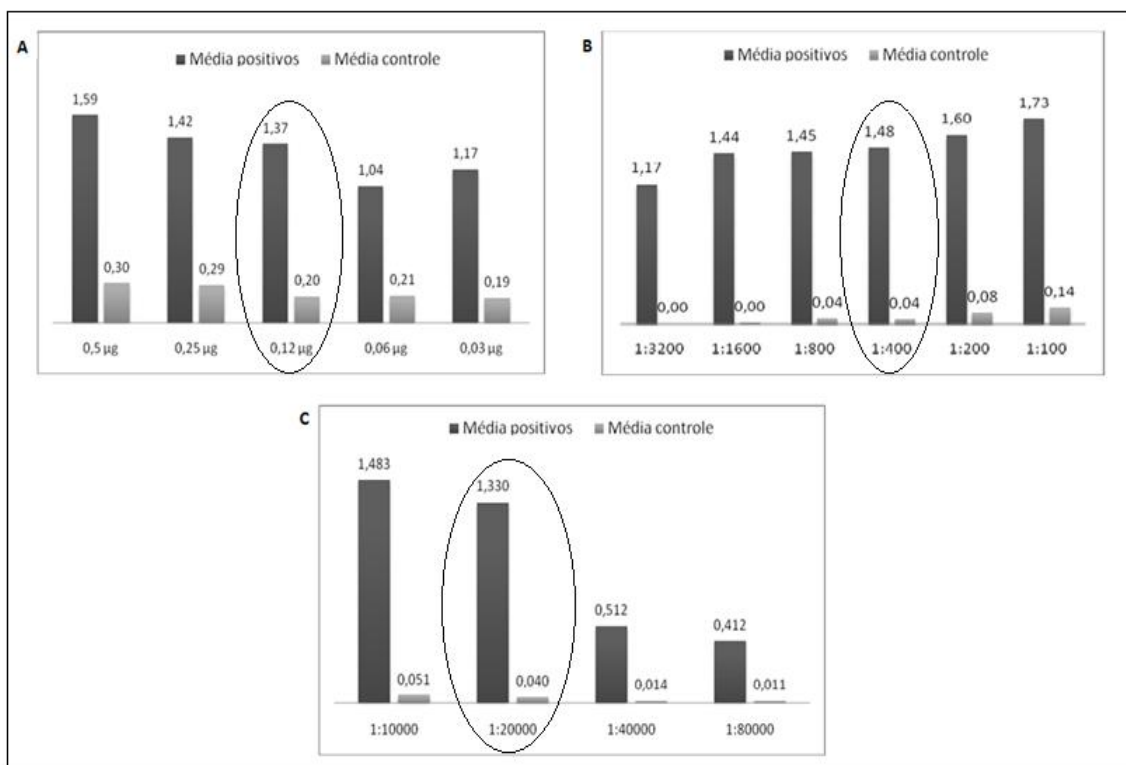
Após a determinação da proporção 1:3, o sobrenadante foi submetido ao método de Bradford para verificar a quantidade de proteínas eliminadas nas lavagens. De acordo com os resultados, nas duas lavagens subsequentes a funcionalização foram eliminadas 30 µg de rMSP1a, e nenhuma proteína foi detectada na terceira lavagem. Logo, 170 µg rMSP1a foi funcionalizada em 66 µg MWNT. Após a padronização da funcionalização, a ferramenta MWNT+rMSP1a foi produzida para realização das etapas de imunização.

## PARTE IV - Avaliação da resposta humoral

### 5.4 Padronização do teste de ELISA

A padronização da concentração de antígeno, diluição do soro e conjugado para o teste de ELISA foi realizada visando-se obter um protocolo eficiente, capaz de detectar a diferença máxima entre a O.D dos soros positivos e soros controle, além de minimizar reações inespecíficas.

A concentração ótima de rMSP1a foi determinada em 0,12 µg/poço, sendo a diluição ideal do soro de 1:400. A melhor diluição do conjugado (anti-Mouse IgG) foi de 1:20000, na qual apresentou a melhor distinção entre os soros positivos e controles (Figura 14).

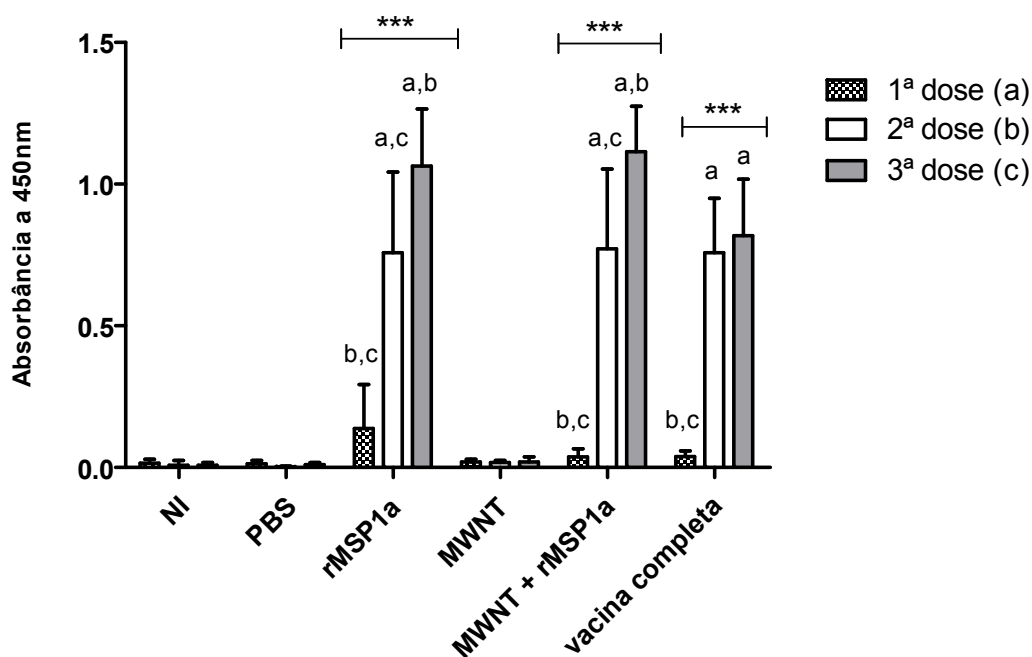


**Figura 14 - Padronização do teste de ELISA:** (A) Padronização da concentração de rMSP1a foi determinada em 0,12 µg/poço (S/N = 6,85); (B) A diluição ideal dos soros dos animais foi de 1:400 (S/N = 37,0); (C) A melhor diluição do conjugado foi de 1:20000 (S/N = 33,25). Os soros foram testados em pools de grupo (positivos = grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e Vacina Completa; controle = grupo PBS)

## 5.5 Avaliação da resposta humoral através do ELISA

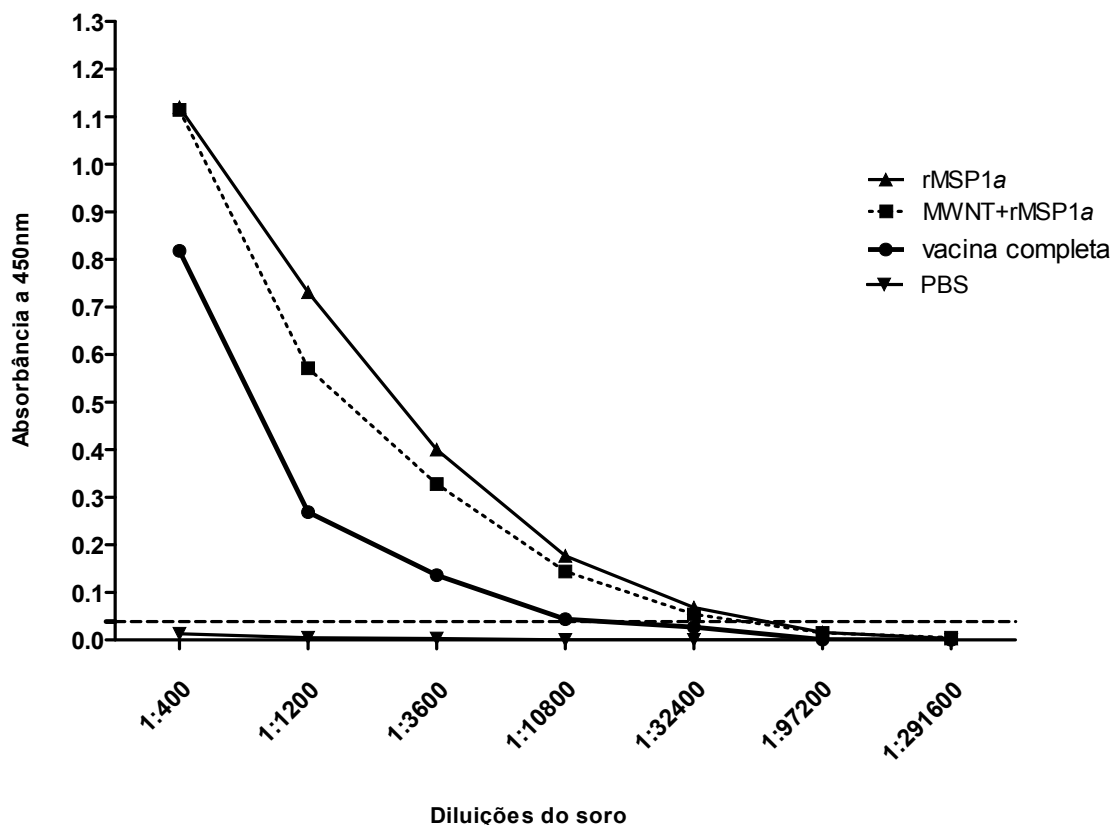
Os animais que receberam a rMSP1a (grupo rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa) produziram níveis significativos de IgG anti-rMSP1a quando comparados com soro dos animais dos grupos NI, PBS e MWNT (Figura 15). Os camundongos imunizados com rMSP1a e MWNT+rMSP1a apresentaram títulos de anticorpos significativamente maiores entre a todas as imunizações ( $p < 0,001$ ). Os animais do

grupo vacina completa, não apresentaram níveis significativamente diferentes de IgG anti-rMSP1a entre a segunda e a terceira dose ( $p>0,05$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa.



**Figura 15 - Detecção de anticorpos anti-rMSP1a no soro dos camundongos após as imunizações:** Os soros dos camundongos foram utilizados em ensaios de ELISA, na diluição 1:400, para detecção de anticorpos anti-rMSP1a. Diferenças significativas foram observadas entre a 1ª, 2ª e 3ª dose nos grupos rMSP1a e MWNT+rMSP1a. No grupo vacina completa, houve diferença significativa apenas entre a 1ª dose e as subsequentes. As letras a, b e c representam a 1ª, 2ª e 3ª dose, respectivamente. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão do grupo ( $n=6$ ). Análise estatística por ANOVA, com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. (\*\*\*) =  $p<0,001$ .

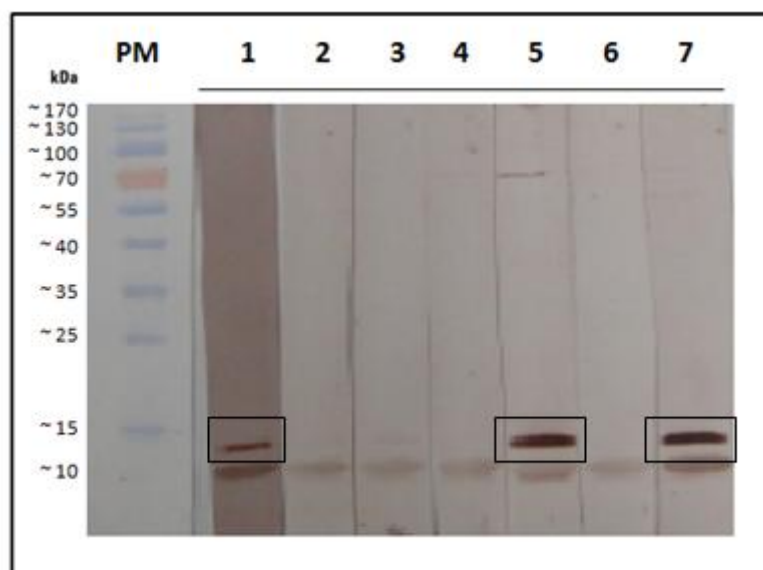
A titulação de anticorpos IgG anti-rMSP1a foi avaliada no soro dos animais dos grupos PBS, rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa após a terceira imunização. De acordo com a Figura 16, animais do grupo rMSP1a e MWNT+rMSP1a apresentaram títulos de anticorpos mais altos do que os animais do grupo vacina completa, sendo detectados até a diluição 1:32400. Animais imunizados com a vacina completa apresentaram títulos de anticorpos mais baixos, sendo 1:10800 a última diluição detectável. Animais do grupo PBS não reagiram com a rMSP1a em nenhuma das diluições, sendo a absorbância detectada até a diluição 1:3600.



**Figura 16 - ELISA anti-Mouse IgG rMSP1a do soro dos animais após a 3ª imunização:** Os soros dos animais - dos grupos PBS, rMSP1a, MWNT+rMSP1a e Vacina Completa foram diluídos partindo-se de 1:400 até 1:291600, utilizando o conjugado anti-IgG peroxidase na diluição 1:20000. O valor do *cut off* (representado pela linha pontilhada ----) foi utilizado para determinar o ponto limite entre as amostras positivas e negativas. O *cut off* representa a média da absorbância do grupo PBS (1:400) + 3 x desvio padrão.

## 5.6 Avaliação da resposta humoral através do Western Blot

O reconhecimento da proteína por anticorpos IgG anti-rMSP1a, presentes no soro dos animais imunizados com o fragmento recombinante, foi evidenciado através da técnica de Western Blot. Foi constatado que somente os soros dos animais dos grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa reagiram com a rMSP1a. Nenhuma reação foi observada com o soro pré-imune e nos grupos NI, PBS e MWNT (Figura 17).

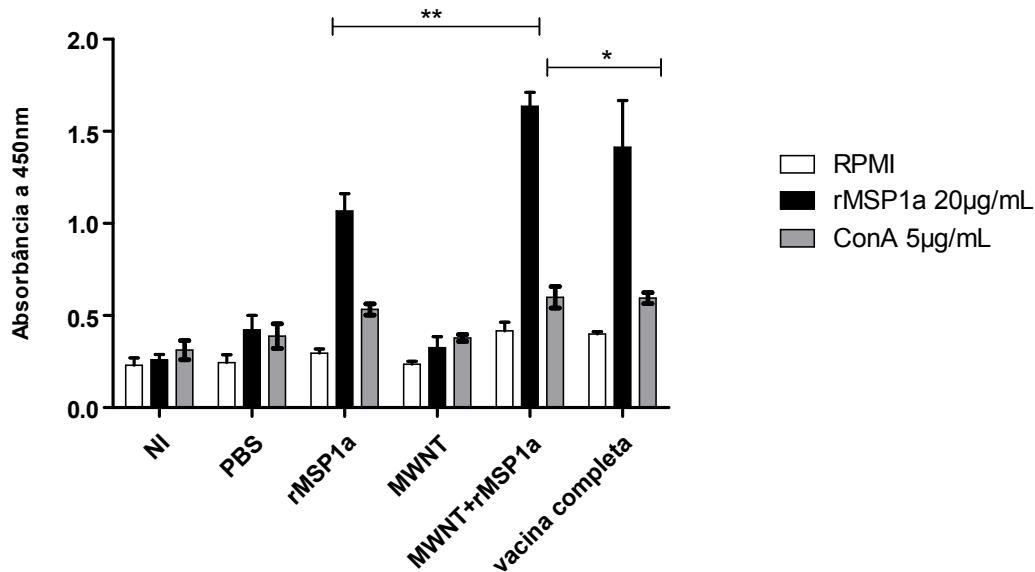


**Figura 17 - Western Blot da rMSP1a com o soro dos animais após as imunizações:** Os soros foram testados em *pools* de grupo (n=6), sendo diluídos de 1:200. 1 = Pool Grupo Vacina Completa; 2 = Pool Grupo MWNT; 3 = Pool soro Pré-imune; 4 = Pool Grupo NI; 5 = Pool Grupo rMSP1a; 6 = Pool Grupo PBS; e 7 = Pool Grupo MWNT+rMSP1a.

## PARTE V – Avaliação da resposta celular

### 5.7 Análise da proliferação celular após estímulo com rMSP1a

A técnica de BrdU se baseia na detecção do bromodeoxiuridina (BrdU) incorporado por células em proliferação. A Figura 18 mostra a proliferação dos esplenócitos dos camundongos estimulados com RPMI, ConA 5 µg/mL e rMSP1a 20 µg/mL por 72 horas. A comparação entre os diferentes estímulos revelou que o índice de proliferação foi menor nas culturas que receberam RPMI e ConA 5 µg/mL quando comparadas as culturas que receberam a proteína rMSP1a. Observou-se que os esplenócitos dos animais dos grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa, proliferaram em níveis superiores ao observado nos animais imunizados com PBS, MWNT e do grupo NI ( $p < 0,05$ ). As células dos animais imunizados com MWNT+rMSP1a proliferaram de forma estatisticamente significativa ao observado nas células dos animais imunizados com rMSP1a ( $p < 0,01$ ) e com vacina completa ( $p < 0,05$ ).



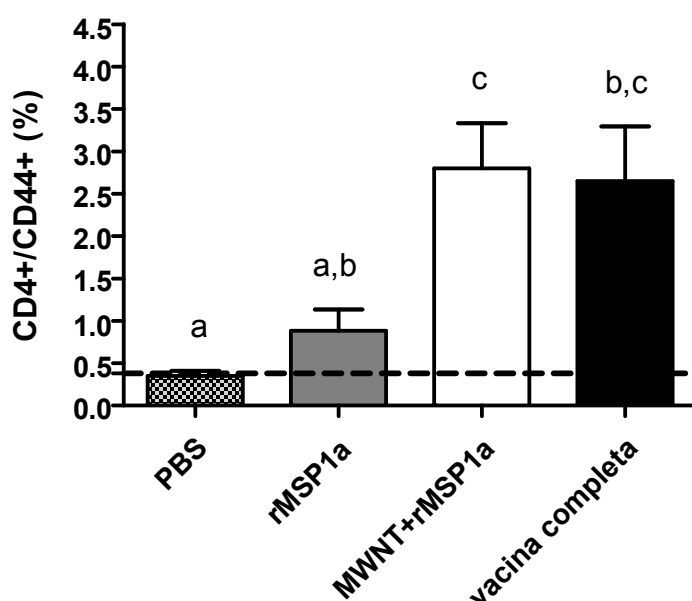
**Figura 18 - Proliferação dos esplenócitos após estímulo com meio RPMI, ConA ou rMSP1a:** As barras mostram a absorbância observada após a incorporação do BrdU às novas fitas de DNA sintetizadas pelas células em proliferação. A barra branca representa os esplenócitos não estimulados, a barra cinza os esplenócitos estimulados com 5µg/mL ConA, e a barra preta os esplenócitos estimulados com 20µg/mL rMSP1a. Os esplenócitos dos animais imunizados MWNT+rMSP1a proliferaram em níveis significativamente superiores aos que receberam rMSP1a (\*\* = p<0,01) e vacina completa (\* = p<0,05). Diferenças significativas (p<0,05) foram observadas entre o grupo PBS e os grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa. Análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA, com pós teste de comparações múltiplas de Tukey (n=6).

## 5. 8 Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62+

Para avaliar o percentual de células T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62+ presentes na cultura de esplenócitos, a população de linfócitos foi selecionada conforme tamanho (200 a 400 FSC) e granulosidade (<200 SSC), e a mesma analisada em gráficos individuais utilizando a intensidade de fluorescência apresentada pelas células duplamente marcadas. As culturas de esplenócitos estimuladas com RPMI 0% apresentaram baixos percentuais de linfócitos CD4+/CD44+ e CD4+/CD62+ em comparação com as culturas estimuladas com rMSP1a e ConA. Não houve diferença estatística das culturas estimuladas com rMSP1a e com ConA 5µg/mL.

A análise dos valores percentuais de linfócitos T CD4+/CD44+ das culturas estimuladas com rMSP1a evidenciou os seguintes resultados: os grupos MWNT+rMSP1a (p<0,01) e vacina completa (p<0,05) apresentaram maiores

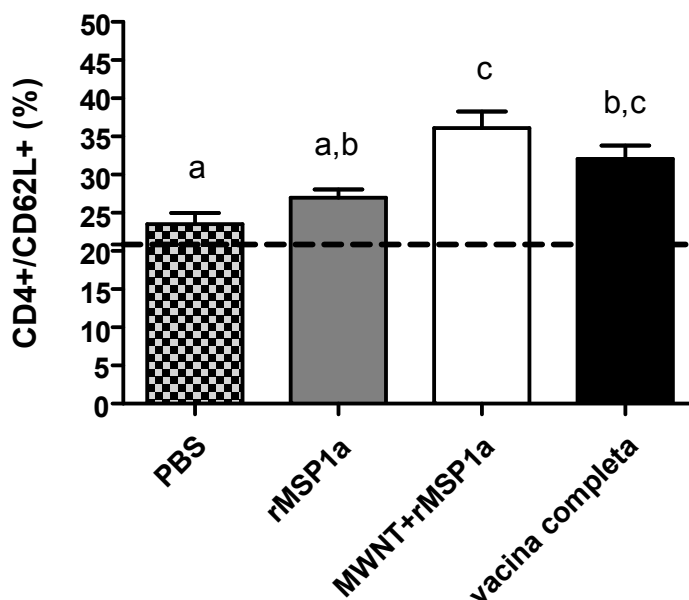
percentuais dessa população de linfócitos em comparação com o grupo PBS, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente); a mesma diferença não foi observada entre os grupos rMSP1a e PBS; animais do grupo rMSP1a apresentaram baixos níveis de linfócitos T CD4+/CD44+ em comparação com o grupo MWNT+rMSP1a, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ); não houve diferença estatística entre os grupos rMSP1a e vacina completa; o grupo MWNT apresentou níveis proporcionais de linfócitos T CD4+/CD44+ ao observado no grupo PBS (Figura 19).



**Figura 19 - Percentual de linfócitos T CD4+/CD44+ presentes na cultura de esplenócitos dos animais imunizados:** Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Animais do grupo MWNT estão representados pela linha pontilhada (---). Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

A Figura 20 mostra o percentual de linfócitos T CD4+/CD62L+ nas culturas estimuladas com rMSP1a. Os grupos MWNT+rMSP1a e vacina completa apresentaram um maior percentual de linfócitos T CD4+/CD62L+ em comparação com o grupo PBS ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$  respectivamente). O mesmo não foi observado entre os grupos rMSP1a e PBS. Porém, animais do grupo rMSP1a apresentaram níveis

significativamente mais baixos dessa população de linfócitos em comparação com os grupos MWNT+rMSP1a ( $p < 0,01$ ).



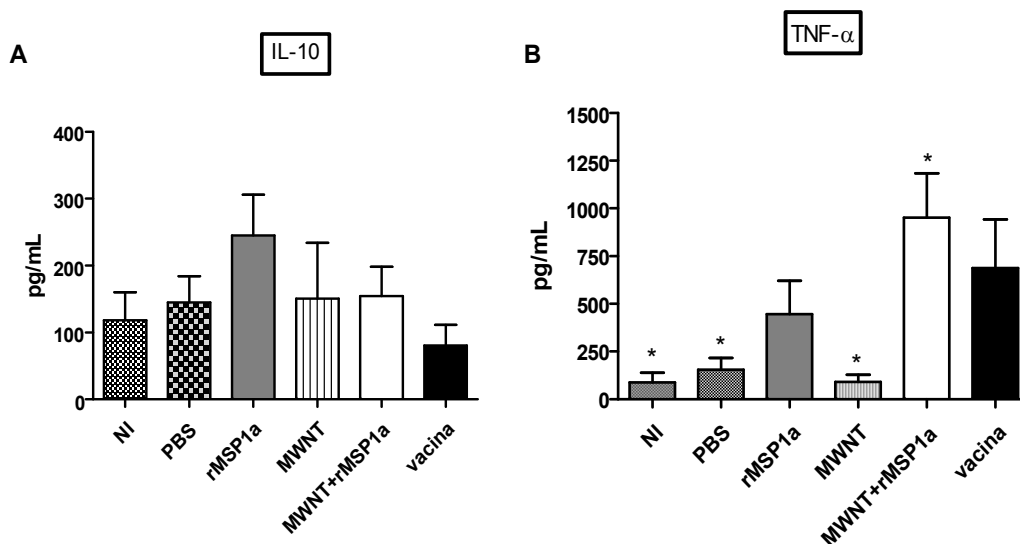
**Figura 20 - Percentual de linfócitos T CD4+/CD62L+ na cultura de esplenócitos estimulados com rMSP1a por 48hs:** Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Animais do grupo MWNT estão representados pela linha pontilhada (---). Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

### 5.9 Dosagem de citocinas do soro e sobrenadante de cultura

Para verificar o perfil de citocinas induzido após as imunizações, o sobrenadante da cultura de esplenócitos foi utilizado para dosagem das citocinas IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  através da técnica de ELISA de captura (R&D<sup>®</sup> Systems, EUA). A capacidade das células produzir as citocinas foi analisada através das placas estimuladas com 5 $\mu$ g/mL ConA e RPMI 0% (controles internos).

Níveis detectáveis de IL-10 e TNF- $\alpha$  foram observados nas culturas estimuladas com a proteína rMSP1a. Os resultados obtidos indicaram que apesar do grupo rMSP1a apresentar níveis mais elevados de IL-10, diferenças significativas não foram observadas entre os demais grupos (Figura 21A). Na análise de TNF- $\alpha$  o grupo MWNT+rMSP1a apresentou concentrações estatisticamente superiores desta citocina

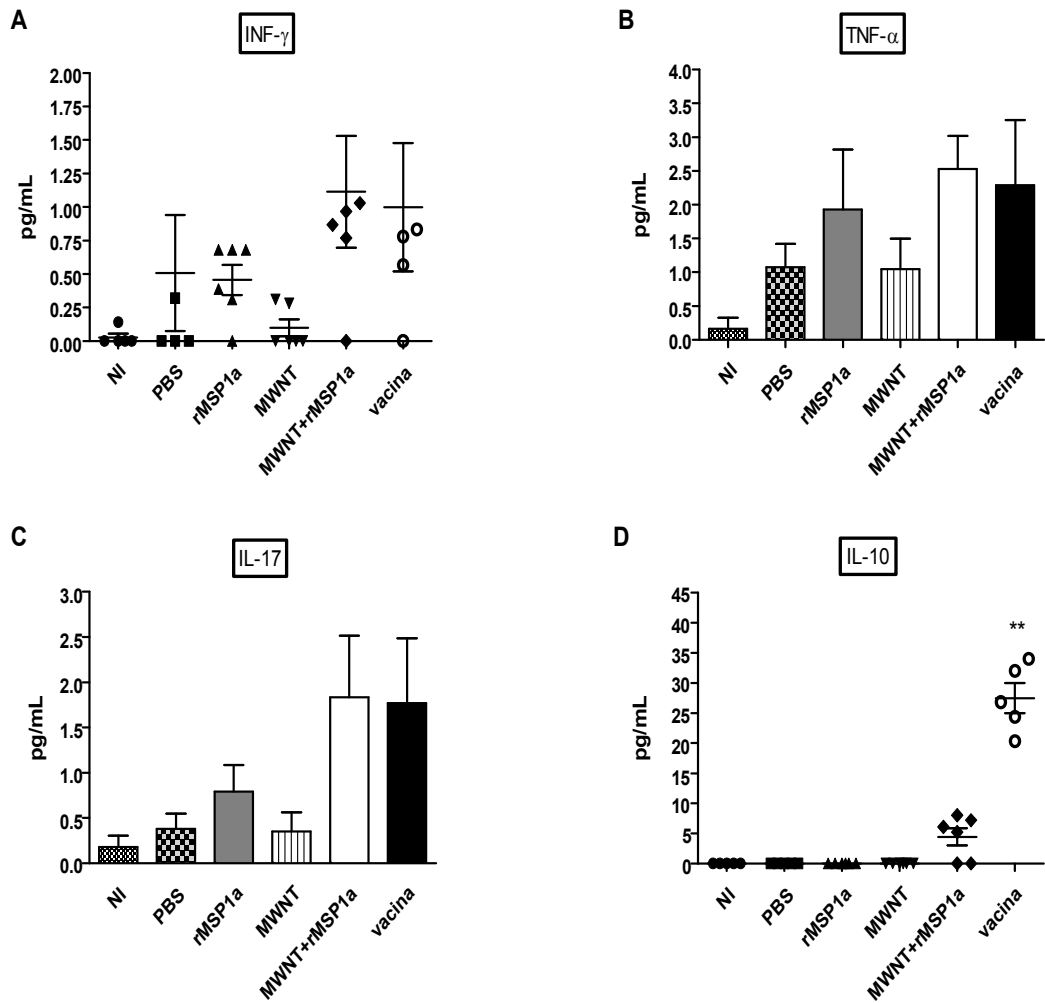
em comparação com os grupos NI, PBS e MWNT ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa (Figura 21B). As citocinas IL-4 e INF- $\gamma$  não foram detectadas utilizando esta metodologia.



**Figura 21 - Dosagem de IL-10 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de esplenócitos estimulados com rMSP1a, através da técnica de ELISA de captura:** A) Dosagem de IL-10 = Diferenças significativas não foram observadas entre os grupos analisados. B) Dosagem de TNF- $\alpha$  = Diferenças estatisticamente significativas foram observadas somente entre o grupo MWNT+rMSP1a e os grupos NI (letra a), PBS (letra b) e MWNT (letra c). Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. \* =  $p < 0,05$ .

Citocinas presentes no soro dos animais após a terceira dose foram analisadas através do kit *Cytometric Bead Array* - CBA (BD<sup>®</sup> Biosciences). Foram analisadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10, porém as citocinas IL-2, IL-4 e IL-6 não foram detectadas.

Apesar do grupo MWNT+rMSP1a e vacina completa apresentarem uma maior produção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, não foram observadas diferenças estatísticas em relação aos demais grupos (Figura 22 A, B e C). Na análise de IL-10, apenas o grupo vacina completa apresentou diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos NI, PBS, rMSP1a e MWNT. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos MWNT+rMSP1a e vacina completa (Figura 22 D).



**Figura 22 - Dosagem de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 nos soros dos animais após as imunizações, utilizando o kit CBA:** A - C) Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas dosagens de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17. D) O grupo vacina completa apresentou níveis mais elevados de IL-10 em relação aos grupos NI, PBS, rMSP1a e MWNT (\*\* =  $p < 0,01$ ). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos MWNT+rMSP1a e vacina completa. Dados paramétricos foram analisados utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey, e dados não paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

## **VI - DISCUSSÃO**

## 6. Discussão

Anaplasmosse bovina é uma doença de distribuição cosmopolita, que atinge principalmente bovinos de regiões tropicais e subtropicais, sendo considerado um dos principais fatores de restrição para a pecuária em muitos países. Dentre as medidas de controle existentes, a vacinação é considerada a mais econômica e efetiva. Inóculos de *A. centrale* tem sido utilizado em vários países, obtendo resultados satisfatórios. Entretanto, sua utilização em outras regiões tem produzido resultados questionáveis (Wilson et al. 1980; Turton et al. 1998; Bock & de Vos, 2001; Shkap et al., 2002), além do fato de seu uso ser restrito aos animais jovens.

Em área de instabilidade enzoótica de anaplasmosse, onde a transmissão do agente não ocorre durante todo o ano, grande parte da população de bovinos adultos é susceptível a contrair a infecção e apresentar quadro agudo com altas taxas de mortalidade. Neste contexto, o emprego de vacinas inativadas seria uma medida indicada para o controle de surtos de anaplasmosse em animais adultos. As vacinas inativadas de *A. marginale* foram amplamente utilizadas, principalmente nos Estados Unidos, mas devido ao fato de serem produzidas com sangue de animais experimentalmente infectados, estas vacinas apresentaram vários inconvenientes que culminaram com sua retirada do comércio (revisado por Kocan et al. 2003).

O cultivo *in vitro* do *A. marginale* em células embrionárias de carrapatos IDE8, trouxe novas perspectivas para utilização da vacina inativada. Porém, *A. marginale* cultivado neste sistema expressa baixos níveis da proteína MSP1a (Garcia-Garcia et al. 2004), e quando usados em ensaios de vacinação em bovinos produzem resposta imune celular ineficiente, não protegendo os animais contra desafios experimentais (Kocan et al. 2001; de la Fuente et al. 2002; Garcia-Garcia et al. 2004; Lasmar et al. 2012). Assim, novas abordagens devem ser avaliadas para a utilização do cultivo *in vitro* de *A. marginale* em ensaios vacinais.

Apesar de muitos esforços, atualmente não há uma vacina inativada comercial contra a anaplasmosse bovina capaz de gerar uma resposta imune protetora eficiente que previna o desenvolvimento da doença clínica. Vários trabalhos têm sido realizados utilizando proteínas de superfície do *A. marginale* (MSPs) como antígeno vacinal

(Palmer et al. 1986,1988,1989; Tebele et al. 1991; McGuire et al. 1994a; Brown et al. 1998a, 2001; de la Fuente et al. 2003; Kocan et al. 2003). Dentre estas proteínas, a MSP1 e a MSP2 têm sido mais utilizadas devido seu potencial imunogênico.

O complexo MSP1 é composto por duas proteínas covalentemente ligadas através de pontes dissulfeto: a MSP1a e a MSP1b. A MSP1a mostrou-se estar envolvida na imunidade, adesão, infecção e transmissão do patógeno (McGarey et al., 1994b; McGarey & Allred, 1994; Palmer et al., 1987, 1988; de la Fuente et al., 2001; Brown et al., 2001). A principal característica da MSP1a é a presença de repetições em tandem na porção N-terminal da proteína, na qual varia entre os diferentes isolados geográficos de *A. marginale*, mas dentro de um isolado, permanece constante (Palmer et al., 2001).

A MSP1a mostrou-se ser uma adesina de eritrócitos bovinos e células de carrapatos, uma vez que estudos utilizando bactérias *E. coli*, transformadas com vetores contendo as repetições em tandem da MSP1a, foram capazes de aderirem na cultura de células de carrapato IDE8 e de hemaglutinar eritrócitos bovinos de maneira similar a bactérias expressando a MSP1a nativa (McGarey et al, 1994b;. McGarey e Allred, 1994; de la Fuente et al., 2001 e 2003). Este achado também foi elucidado por de la Fuente et al. (2003), no qual também demonstrou o papel fundamental da composição dos peptídeos em tandem para a capacidade de adesão da MSP1a. Peptídeos que continham aminoácidos D ou E na posição 20 aderiram-se a cultura IDE8, mas aqueles que continham o aminoácido G na 20ª posição não se ligaram a cultura. Outro fator importante considerado neste estudo foi a capacidade de anticorpos anti-MSP1a, produzidos contra os peptídeos em tandem, de neutralizar a infecção do *A. marginale* em cultura IDE8. Estes dados confirmam que a MSP1a é necessária e suficiente para efetuar a adesão em células bovinas e de carrapatos, além do importante papel das repetições em tandem na adesão e infecção das células hospedeiras.

Considerando o potencial imunogênico da MSP1a, e seu importante papel no desenvolvimento e transmissão do *A. marginale*, a mesma tem sido utilizada em diversos estudos como candidata vacinal da anaplasmoze bovina (Palmer et al. 1987, 1989; McGarey et al., 1994a; Brown et al. 1998a, 2001; Garcia-Garcia et al. 2004), e uma vez que uma vacina efetiva deverá incluir epítomos capazes de induzir resposta protetora para a maioria dos indivíduos e excluir aqueles epítomos que causem imunopatologia ou resposta indesejada (Purcell et al. 2007).

Neste trabalho foi utilizado a seqüência parcial da MSP1a pertencente ao isolado UFMG2 de *A. marginale*, um isolado altamente virulento capaz de causar doença clínica em animais jovens e adultos (Bastos et al. 2010). Esta seqüência corresponde à parte da região N-terminal da proteína, no qual contém três repetições de peptídeos em tandem. Além disso, três epítomos lineares de células B (SGQQQESSVL) e quatro epítomos capazes de estimular células T CD8 (três QSDQASTSS e um RSKVASVEY) foram preditos nessa seqüência. Estes resultados apontam que a MSP1a do isolado UFMG2 poderia ser capaz de estimular a resposta imune do hospedeiro de forma eficiente.

Considerando a necessidade de se desenvolver novas estratégias de vacinação para o controle da anaplasmose bovina, o presente trabalho visou avaliar a resposta humoral e celular de camundongos imunizados com a proteína rMSP1a do isolado UFMG2 de *A. marginale*. A rMSP1a foi expressa em vetores procariotos, uma vez que o sistema de expressão em *E. coli* permite a produção do produto recombinante em grandes quantidades com custo relativamente baixo, devido à velocidade de crescimento bacteriano, alta taxa de expressão, além da fácil capacidade de transformação (Fernandez-Robledo et al. 2010). Devido ao tamanho da rMSP1a ( $\pm$  13 kDa), houve a necessidade da utilização de uma molécula carreadora capaz de estimular uma resposta imune adaptativa específica para a rMSP1a, otimizando a apresentação da proteína ao sistema imune do hospedeiro.

Na última década, a Nanobiotecnologia, ciência que estuda a interação entre os compostos de escala nanométrica e os sistemas biológicos, revelou novas descobertas sobre as propriedades dos nanotubos de carbono e suas potenciais aplicações na área biológica. Dentre suas diversas utilidades está o fato de serem biocompatíveis com sistemas biológicos e apresentarem a capacidade de funcionalização com moléculas orgânicas como DNA, RNA, proteínas e fármacos (Huang et al. 2002; Foldvari et al. 2008); podendo atuar como sistemas carreadores, transportando moléculas de interesse para o interior das células. A utilização dos nanotubos de carbono como carreador antigênico, e sua capacidade de serem internalizados por diferentes tipos celulares, têm sido relatadas em diversos trabalhos (Pantarotto et al. 2003a, 2004; Kam et al. 2005; Bianco et al. 2005; Yandar et al. 2008).

Tendo em vista que peptídeos administrados livremente no organismo podem apresentar baixa solubilidade, rápida degradação e baixa biodistribuição (Bianco et al. 2005; Klumpp et al. 2006), nanotubos de parede múltipla (MWNT) foram utilizados como carreadores da proteína rMSP1a. Neste trabalho foram avaliados o potencial imunogênico da rMSP1a individual, da ferramenta MWNT+rMSP1a e da proteína rMSP1a, funcionalizada a MWNT, associada à antígeno de *A. marginale* cultivado em células IDE8.

Após a obtenção e purificação da rMSP1a em quantidades adequadas, a mesma foi utilizada na etapa de funcionalização com MWNT. Este processo foi realizado através da reação de amidação ativada por diimida proposto por Jiang et al. (2003), na qual proporciona um método universal e eficiente para ligação de biomoléculas a nanotubos de carbono. A ferramenta MWNT+rMSP1a produzida foi utilizada em ensaios de imunogenicidade em camundongos Balb/c.

A imunização dos animais com a proteína rMSP1a individual ou em combinação com MWNT e antígeno de cultura, foi realizada utilizando o adjuvante Emulsigen<sup>®</sup>, capaz de estimular a resposta imune de forma mais rápida no início da infecção, comparado com adjuvantes convencionais (Hiszczynska-Sawicka et al., 2010). Considerando que os dados obtidos neste trabalho serão posteriormente utilizados em ensaios de imunização em bovinos, hospedeiros naturais da doença, o adjuvante Emulsigen<sup>®</sup> foi escolhido devido sua utilização em ensaios vacinais nestes animais (Lasmar et al. 2012).

Os camundongos imunizados com a proteína rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa produziram níveis significativamente altos de anticorpos IgG anti-rMSP1a após as imunizações, demonstrando que mesmo após a funcionalização com os MWNT a rMSP1a manteve sua imunogenicidade conservada. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, os quais demonstraram que camundongos Balb/c imunizados com NTCs funcionalizados a peptídeos antigênicos, desenvolveram resposta humoral na mesma intensidade que quando imunizados com o peptídeo livre, indicando a manutenção da conformação original do peptídeo (Pantarroto et al. 2003a; Yandar et al. 2008; Astigarraga et al. 2011). Diferenças significativas foram observadas entre a segunda e a terceira dose dos grupos rMSP1a e MWNT+rMSP1a. O mesmo fato não foi observado no grupo vacina completa, no qual níveis de anticorpos IgG anti-MSP1a

mantiveram-se relativamente iguais entre a segunda e a terceira imunização. Além disso, o grupo vacina completa apresentou títulos de anticorpos detectados até uma diluição de 1:10800, diferente do que foi observado nos grupos rMSP1a e MWNT+rMSP1a, nos quais a última diluição detectável foi de 1:32400.

Apesar da ferramenta MWNT+rMSP1a ter sido utilizada nas imunizações do grupo vacina completa, foi possível observar uma menor produção de anticorpos IgG anti-rMSP1a no soro destes animais em comparação com animais do grupo que recebeu a mesma ferramenta (grupo MWNT+rMSP1a). Esta diferença também foi observada na técnica de Western Blot, que apesar de ser um teste qualitativo, demonstrou um menor reconhecimento da proteína pelos soros dos animais deste grupo. Esta relativa diminuição na produção de anticorpos pode estar associada à presença do antígeno de *A. marginale* e componentes das células IDE8, no qual a riquetsia é cultivada. Apesar dos corpúsculos de *A. marginale* serem submetidos a etapas de purificação, resíduos da cultura celular ainda permanecem no antígeno, que poderia de alguma forma inibir ou mascarar a resposta imune destes animais. Animais imunizados com a ferramenta MWNT+rMSP1a não apresentaram reatividade cruzada detectável contra os MWNTs, corroborando resultados que demonstraram que estas estruturas não apresentam imunidade intrínseca (Pantarotto et al. 2003a; Yandar et al. 2008).

Apesar da importância dos anticorpos na proteção contra *A. marginale*, estes não são capazes isoladamente de proteger os animais do agente da anaplasmoze (Brown *et al.*, 2001; de la Fuente et al., 2002). Em bovinos imunizados e protegidos contra a infecção usando MSPs purificadas, a proteção foi associada com a resposta de células T CD4+ específicas para MSPs, incluindo a produção INF $\gamma$  e a produção e proliferação de IgG2 (Brown et al. 1998a e 1998b). O paradigma atual do papel das células T CD4+ na imunidade para esta infecção é que antígenos específicos ativam linfócitos T CD4+ resultando na ativação e expansão de células T e secreção de IFN $\gamma$ . O IFN $\gamma$ , que em bovinos induzem a mudança do isotipo IgG2 (Estes et al. 1994), promove a opsonização de bactérias ou eritrócitos infectados, ativam macrófagos para realizar a fagocitose, e auxiliam na produção de outras citocinas e óxido nítrico, que ajuda a eliminar a bactéria intracelular (Palmer et al. 1999).

Na análise de proliferação *in vitro* dos esplenócitos verificou-se que as células que receberam estímulos antigênicos (ConA e rMSP1a) apresentaram significativa resposta

proliferativa em comparação com aquelas não estimuladas (RPMI). Os esplenócitos de todos os camundongos que receberam a rMSP1a proliferaram significativamente após serem estimulados por 72 horas com esta proteína. A proliferação foi mais intensa no grupo MWNT+rMSP1a do que nos grupos rMSP1a e vacina completa. Este fato sugere que a rMSP1a foi capaz de induzir a resposta imune adaptativa nos animais imunizados com este peptídeo. No entanto, MWNT+rMSP1a foi capaz de estimular os linfócitos de maneira mais eficaz do que a rMSP1a individual ou associada a antígeno de cultura. Estes dados corroboram com os achados de Astigarra et al. (2011), no qual demonstraram que camundongos Balb/c imunizados com MWNT funcionalizados a proteína E do vírus da dengue apresentaram uma maior proliferação de esplenócitos do que os animais que receberam apenas a proteína E.

Palmer e colaboradores (1999) enfatizaram a necessidade de identificação de mecanismos imunológicos efetores envolvidos no controle de *A. marginale*, bem como seus epítomos alvos, com o objetivo de desenvolver uma vacina estável e segura. A imunofenotipagem é uma metodologia que pode auxiliar neste tipo de pesquisa, pois permite a análise de populações de células distintas, identificadas a partir da expressão de antígenos de superfície específicos marcados com anticorpos fluorescentes (Roitt et al., 1999). Os esplenócitos coletados dos animais imunizados foram avaliados quanto à presença de células T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62L+.

Linfócitos T CD4+ são mediadores da resposta imune celular que se liga a células que expressam antígenos via MHC de classe II, sendo capazes de induzir a ativação de novas células T *helper*, ativação de macrófagos e diferenciação de células B. Na anaplasmoze bovina, estas células têm sido associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora em animais vacinados (Estes et al. 1994; Brown et al. 1998a, 1998b ; de la Fuente et al. 2002). O antígeno CD44 é uma glicoproteína de membrana expressa em vários tipos de células, incluindo leucócitos e eritrócitos, sendo um marcador indicativo de células T de memória ativada. Através da ligação ao hialuronato, o CD44 está envolvido na adesão de células T ao endotélio e matriz extracelular nos locais de infecção e em tecidos de mucosas. O CD62L (L-selectina) é uma molécula de adesão celular encontrada em células B, células T, monócitos, granulócitos e algumas células natural killer, sendo expressa em altos níveis em células T *naive* ativadas. A L-selectina serve como receptor de entrada dos linfócitos T *naive* e células dendríticas

para os gânglios linfáticos, mediando à ligação de células T às vênulas endoteliais elevadas (HEVs - *high endothelial venules*), permitindo o extravasamento de linfócitos do sangue periférico para dentro do estroma do órgão linfóide (Abbas et al. 2007).

Quando foi analisado o perfil fenotípico de linfócitos T CD4+/CD44+ derivados de cultura de esplenócitos, foi observado que camundongos imunizados com MWNT+rMSP1a e vacina completa apresentaram maior percentual de linfócitos T CD4+/CD44+ do que os animais imunizados com PBS. Esta diferença também foi observada entre os grupos rMSP1a e MWNT+rMSP1a, no qual animais que receberam apenas a proteína rMSP1a apresentaram menor percentual de linfócitos T CD4+/CD44+. Na análise de marcadores de ativação (linfócitos T CD4+/CD62+), foi observado uma maior frequência dessa população no grupo MWNT+rMSP1a, sugerindo que a proteína rMSP1a associada ao MWNT pode influenciar tanto no aumento da resposta de memória quanto na ativação de linfócitos.

A produção de células T CD4+ rMSP1a-específicas demonstrou que epítopos destas células, direcionados ao MHC de classe II, devem estar presente na seqüência da MSP1a/UFGM2, uma vez que uma maior proliferação foi observada quando os esplenócitos de camundongos imunizados com rMSP1a foram estimulados *in vitro* com esta proteína. Estudos realizados por Brown et al. (1998a) demonstraram que o complexo MSP1 foi reconhecido por células T CD4+ de memória em bovinos imunizados com proteínas de membrana do *A. marginale*, sendo a MSP1a preferencialmente reconhecida por estas células; além disso, os animais imunizados tornaram-se protegidos contra o desenvolvimento da riquétsemia após exposição ao desafio. Embora a descrição de epítopos de células T CD4+ em experimentos utilizando camundongos não seja muito relevante para estudos em bovinos, tendo em vista possíveis diferenças significativas no MHC de classe II destas duas espécies, estes dados indicam uma maior capacidade da ferramenta MWNT+rMSP1a em induzir uma resposta de células T CD4+.

Para identificar o perfil de citocinas, o sobrenadante da cultura de esplenócitos dos animais imunizados com diferentes combinações foi analisado através da técnica de ELISA de captura após estimulação *in vitro* por 72 horas com a proteína rMSP1a. A secreção de IL-10 não apresentou diferença significativa entre os grupos, embora foi possível observar aumento dessa citocina nos animais do grupo rMSP1a. Níveis

significativamente elevados de TNF- $\alpha$  foram observados no grupo MWNT+rMSP1a em comparação com o grupo NI, PBS e MWNT. A técnica utilizada não foi capaz de detectar citocinas IL-4 e INF- $\gamma$  no sobrenadante de nenhuma das culturas.

Utilizando o kit CBA (BD<sup>®</sup> Biosciences), foi possível analisar citocinas relacionadas aos perfis Th1, Th2 e Th17 presentes no soro dos animais. Este kit proporciona a detecção de concentrações relativamente baixas destas citocinas, tanto no soro quanto no sobrenadante de cultura. No entanto, citocinas IL-2, IL-4 e IL-6 não foram detectadas. Observou-se uma maior produção de IL-10 pelo grupo vacina em relação aos grupos NI, PBS, rMSP1a e MWNT, porém esta diferença não foi observada em relação ao grupo MWNT+rMSP1a. Considerando que a IL-10 é uma interleucina caracterizada como um inibidor da ativação de macrófagos e células dendríticas, estando envolvida na modulação da resposta imune inata e celular (Abbas et al. 2008), a diminuição da resposta humoral anti-rMSP1a observada nos animais do grupo vacina completa provavelmente foi devido a imuno-modulação desencadeada por esta citocina. A utilização de antígenos totais em ensaios de vacinação contra anaplasmoze bovina e a imuno-modulação da resposta do hospedeiro têm sido relatada em diversos trabalhos. Abott et al. (2005) e Han et al. (2008) demonstraram um desaparecimento rápido de células T CD4+ antígeno-específicas e uma resposta de memória imunológica fraca após a imunização de bovinos com corpúsculos de *A. marginale* após a fase aguda da doença. Esta modulação do sistema imune pode ser uma estratégia do *A. marginale* para evadir do sistema imune do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência em concentrações altas o suficiente para sua transmissão pelo carrapato, como também seria benéfica para o bovino, impedindo a inflamação sistêmica prolongada em resposta a níveis continuamente elevados de bactéria (Han et al. 2010).

Níveis de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 foram expressos em maiores quantidades pelos grupos imunizados com MWNT+rMSP1a e vacina completa, em comparação com animais do grupo rMSP1a. Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos. Estes dados sugerem que mesmo após a estimulação de células T CD4+, as imunizações não foram capazes de induzir uma produção significativa destas citocinas entre os grupos imunizados com a rMSP1a (rMSP1a, MWNT+rMSP1a e vacina completa).

Considerando que animais que receberam a rMSP1 $\alpha$ , apresentaram um aumento não significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17), e que citocinas relacionadas a resposta do tipo Th2 não foram detectadas pelas técnicas realizadas, nenhuma conclusão pode ser extraída com relação ao tipo de resposta induzida após as imunizações. No entanto, é possível concluir que a resposta celular foi fortemente induzida em camundongos imunizados com a ferramenta MWNT+rMSP1 $\alpha$ , uma vez que foi possível observar maiores percentuais de linfócitos T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62L+, bem como uma maior capacidade proliferativa dos esplenócitos de camundongos imunizados com esta ferramenta.

Na pesquisa de novos antígenos candidatos a vacina contra a anaplasose bovina, não somente a atividade protetora deve ser levada em consideração, mas também a capacidade desse antígeno em contribuir para a redução da morbidade associada à doença. A resposta imune de células T CD4+ e de memória, bem como a produção de INF- $\gamma$  é importante na anaplasose bovina, pois auxilia no desenvolvimento de imunidade protetora, capaz de impedir ou até mesmo minimizar a infecção nos animais (Brown et al., 1998a, 1998b; Palmer et al. 1999; de la Fuente et al., 2002). Assim, experimentos em bovinos deverão ser realizados, visando definir a eficácia, a segurança, a imunogenicidade e a proteção induzida pela proteína rMSP1 $\alpha$  associada a MWNT

## **VII - CONCLUSÕES**

## 7. Conclusões

- A seqüência parcial da proteína MSP1a do isolado UFMG2 de *A. marginale* apresenta três possíveis epítomos de célula B e quatro de células T CD8, indicando sua capacidade de estimular o sistema imune do hospedeiro;
- As técnicas de expressão e purificação empregadas na produção da proteína rMSP1a foram eficientes, apresentando uma boa produtividade, com a obtenção de proteínas puras e com bom rendimento;
- A rMSP1a produzida foi funcionalizada com sucesso aos MWNTs, mantendo a imunogenicidade conservada;
- A imunização dos animais com rMSP1a individual, MWNT+rMSP1a e vacina completa induziu altos títulos de anticorpos IgG anti-rMSP1a, sendo que a rMSP1a e MWNT+rMSP1a foram capazes de estimular a resposta humoral com a mesma intensidade;
- Houve uma maior proliferação de linfócitos T nos animais imunizados com a ferramenta MWNT+rMSP1a, os quais apresentaram maiores percentuais de linfócitos T CD4+/CD44+ e CD4+/CD62+;
- Não houve diferença significativa entre os grupos imunizados com as diferentes combinações da proteína rMSP1a na produção das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17. Entretanto, níveis significativos de IL-10 foram detectados nos soros dos animais do grupo imunizado com a vacina completa, sugerindo uma modulação da resposta imunológica.

## **VIII - PERSPECTIVAS**

## 8. Perspectivas

Os resultados obtidos no presente estudo abrem novas possibilidades para a utilização da proteína rMSP1a, associada a nanotubos de carbono, como componentes da vacina inativada de *A. marginale* produzida *in vitro*. Experimentos em bovinos deverão ser realizados, visando:

- Avaliar a resposta humoral e celular de bezerros imunizados com a rMSP1a associada a MWNT e a antígeno de *A. marginale* cultivado em células IDE8;
- Verificar o nível de proteção dos animais imunizados após desafio com o isolado UFMG2 de *A. marginale*;
- Verificar a biocompatibilidade dos MWNT nos tecidos dos animais imunizados, através da análise de parâmetros clínicos e fisiológicos.

## **IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6<sup>a</sup> ed., Saunders Elsevier, Filadélfia, PA, 153-243 / 303-350 pp.

Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC 2005. Rapid and Long-Term Disappearance of CD4<sup>+</sup> T Lymphocyte Responses Specific for *Anaplasma Marginale* Major Surface Protein-2 (MSP2) in MSP2 Vaccinates following Challenge with Live *A. marginale*. J Immunol 174: 6702-6715.

Abdala AA, Pipano E, Aguirre DH, Gaido AB, Zurbriggen MA, Mangold AJ, Gugliemone 1990. Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. Rev Elev Med Vet Pays Trop 43: 155-158.

Agnes JT, Herndon D, Ueti MW, Ramabu SS, Evans M, Brayton KA, et al. 2010. Association of pathogen strain-specific gene transcription and transmission efficiency phenotype of *Anaplasma marginale*. Infect Immun 78(6): 2446-2453.

Alleman AR & Barbet AF 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. J Clin Microbiol 34(2): 270-276.

Araujo FR, Costa CM, Ramos CAN, Farias TA, de Souza IIF, Melo ESP, et al. 2008. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. Mem Inst Oswaldo Cruz 103(2): 186-190.

Arteche CCP 1992. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa de *Anaplasma*. A Hora Veterinária 66(11): 39-42.

Astigarraga RG 2011. Desenvolvimento e avaliação imunológica de Nanotubos de Carbono funcionalizados com a proteína de envelope de *Dengue vírus 3*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 154pp.

Barbet AF, Blentlinger R, Yi JY, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect Immun* 67(1): 102-107.

Barbet AF, Whitmire WM, Kamper SM, Simbi BH, Ganta RR, Moreland AL, et al. 2001. A subset of *Cowdria ruminantium* genes important for immune recognition and protection. *Gene* 275(2): 287-298.

Bastos CV, Passos LM, Facury-Filho EJ, Rabelo EM, Fuente Jde L, Ribeiro MF 2010. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet J* 186(3): 374-378.

Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol* 23(9):450-457.

Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD, Prato M 2005. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* 5: 571-577.

Bock RE & de Vos AJ 2001. Immunity following use of australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J* 79(12): 832-839.

Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brayton KA, Meeus PF, Barbet AF, Palmer GH 2003. Simultaneous variation of the immunodominant outer membrane proteins, MSP2 and MSP3, during *Anaplasma marginale* persistence *in vivo*. *Infect Immun* 71: 6627-6632.

Brayton KA, Palmer GH, Brown WC 2006. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Rev Vaccines* 5(1): 95-101.

Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH 1998a. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun* 66: 5406–5413.

Brown WC, Zhu D, Shkap V, McGuire TC, Blouin EF, Kocan KM, Palmer GH 1998b. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4+ T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect Immun* 66: 5414–5422.

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. *Infect Immun* 69(11): 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. *Infect Immun* 70(10): 5521-5532.

Cantor GH, Pontzer CH, Palmer GH 1993. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Vet Immunol Immunopathol* 37: 343–350.

Coronado A 2001. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. *Revista Científica FCV-LUZ* 11(5): 408-411.

de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 31(2): 145-153.

de la Fuente J & Kocan KM 2001. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infect Immun* 69: 5151–5156.

de la Fuente J, Kocan KM, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Claypool PL, Saliki JT 2002. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet Microbiol* 89(2-3): 239-251.

de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol* 91(2-3): 265-283.

de la Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Vicente J, Estrada-Penã AN, Almazán C, Kocan KM, Martín MP, Gortázar C 2004. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur. J. Wildlife Res* 50: 187–196.

de la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Almazán C, Naranjo V, Gortázar C, Torina A, Caracappa S, García-Pérez AL, Barra M, Oporto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM 2005. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 6: 75-89.

Dikmans G 1950. The transmission of Anaplasmosis. *Am J Vet Res* 11(38): 5-16.

Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW, Chen FF 2005. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall

carbon nanotubes and nanoions on human skin fibroblast. *Nano Lett* 5(12): 2448-2464.

Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Charlier JC, Hernandez E 2004. Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 362: 2065-2098.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:21 45-65.

Edds GT, Simpson CF, Neal FC, White FH 1966. Irradiation of *Anaplasma marginale* for vaccine production. *In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> Panamerican Congress of Veterinary Medicine, 1966.* 242-251.

Estes DM, Closser NM, Allen GK 1994. IFN- $\gamma$  stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- $\mu$  and mitogen. *Cell Immunol* 154: 287-295.

Ewing SA 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. *In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> National Anaplasmosis Conference, 1981, Mississippi State University, Mississippi State.* Mississippi State University 395-423.

Fernández-Robledo JA & Vasta GR 2010. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol* 26(5): 244-254.

Figuerola JV, Alvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Santiago C, Mosqueda JJ, et al. 1998. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. *In: Tropical Veterinary Medicine: Molecular Epidemiology,*

Hemoparasites and Their Vectors, and General Topics 1998. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849: 1-10.

Foil LD 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today* 5(3): 88-96.

Foldvari M & Bagonluri M 2008. Carbon nanotubes as functional exipients for nanomedicines: II Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine* 4(3):183-200.

French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun* 66(3): 1200-1207.

French DM, Brown WC, Palmer GH 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 67(11): 5834-5840.

Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Halbur T, Onet VC, et al. 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(3-4): 137-151.

Ge NK, Kocan KM, Blouin EF, Murphy GL 1996. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults using non-radioactive in situ hybridization. *J Med Entomol* 33: 911-920.

Guglielmone AA 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-119.

Han S, Norimine J, Brayton KA, Palmer GH, Scoles GA, Brown WC 2010. *Anaplasma marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional

memory CD4<sup>+</sup> T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clin Vaccine Immunol* 17(12): 1881-1890.

Helland A, Wick P, Koehler A, Schmid K, Som C 2007. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Ciênc saúde coletiva* 13(2): 441-452.

Hennrich F, Chan C, Moore V, Rolandi M, O'Connell MJ 2006. The element carbon. In: O'Connell MJ editor; *Carbon Nanotubes: Properties and Applications*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Flórida, p. 1-18.

Herbst MH, Macedo MIF, Rocco AM 2004. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Quím Nova* 27(6): 986-992.

Hildago RJ 1975. Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. *Am J Vet Res* 36: 635-640.

Hiszczynska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Oledzka G, Kur J, Bickerstaffe R, et al. 2010. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp Parasitol* 124(4): 365-372.

Huang W, Taylor S, Fu K, Lin Y, Zhang D, Hanks TW, Rao AM, Sun Y 2002. Attaching Proteins to Carbon Nanotubes via Diimide-Activated Amidation. *Nano Letters* 2(4): 311-314.

Iijima S 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56-58.

Jiang K, Schadler LS, Siegel RW, Zhang X, Zhang H, Terrones M 2003. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. *J Mater Chem* 14: 37-39.

Joselevich E, Dai H, Liu J, Hata K, Windle AH 2008. Carbon nanotube synthesis and organization. In: Jorio A, et al. Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications. Springer, Topics in Applied Physics 111: 101-164.

Junior DSG, Araujo FR, Almeida NF, Adi SS, Cheung LM, Fragoso SP, et al. 2010. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. Mem Inst Oswaldo Cruz 105(7): 843-849.

Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H 2004. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. J Am Chem Soc 126: 6850-6851.

Kessler RH & Ristic M 1979. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development of noninfected erythrocytes. Am J Vet Res 40: 1744–1776.

Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. Infect Immun 58(4): 1117-1119.

Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A 2006. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. Biochim Biophys Acta 1758: 404 – 412.

Kocan KM, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ 1984. Demonstration of the inclusion appendage of *Anaplasma marginale* in nymphal *Dermacentor andersoni*. Am Vet Res 45: 1800-1807.

Kocan KM, Goff WL, Stiller D, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, et al. 1992a. Persistence of *Anaplasma marginale* (rickettsiales, anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (acari, ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. J Med Entomol 29(4): 657-668.

Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, et al. 1992b. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 53(4): 499-507.

Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF 2000. Anaplasmosis control - Past, present, and future. In: *Tropical Veterinary Diseases: Control and Prevention in the Context of the New World Order 2000. Annals of the New York Academy of Sciences* 916: 501-509.

Kocan KM, Halbur T, Blouin EF, Onet V, de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, et al. 2001. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet Parasitol* 102(1-2): 151-161.

Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbio Rev* 16(4): 698-712.

Kocan KM, de La Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129: S285-S300.

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167(2-4): 95-107.

Kuttler KL & Todorovic RA 1973. Techniques of pre immunization for the control of Anaplasmosis. In: E. W. Jones (ed.), *Proceedings of the 6<sup>th</sup> National Anaplasmosis Conference* 106-112

Kuttler KL 1984. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants - a review. *J Wildl Dis* 20(1): 12-20.

Kuttler KL, Zaugg JL 1988. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop Anim Health Prod* 20(2): 85-91.

Lasmar PVF, Carvalho AU, Filho EJF, Bastos CV, Ribeiro MFB 2012. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. Rev Bras Parasitol Vet 21(2): 112-117.

Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, et al. 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. Infect Immun 73(12): 8109-8118.

Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. Infect Immun 75(5): 2333-2342.

Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forró L 2006. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. Nano Lett 6: 1121-1125.

Manna SK, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera EV, Jejelowo O, Rice-Ficht A, Ramesh G. 2005. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. Nano Lett 5: 1676-1684.

Marble DW & Hanks MA 1972. A tissue culture method for *Anaplasma marginale*. Cornell Vet 62: 196-205.

Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V 2004. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. J Toxicol Environ Health A 67: 87-107.

Mazzola V, Amerault TE, Roby TO 1976. Survival of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* cells. Am J Vet Res 37: 987-989.

McGuire TC, Stephens EB, Palmer GH, McElwain TF, Lichtensteiger CA, Leib SR, et al. 1994a. Recombinant vaccinia virus expression of *Anaplasma marginale* surface

protein msp-1a - effect of promoters, leader sequences and gpi anchor sequence on antibody-response. *Vaccine* 12(5): 465-471.

McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR 1994b. Putative adhesins of *Anaplasma marginale* - major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun* 62(10): 4594-4601.

McGarey DJ & Allred DR 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body-surface and identification of possible adhesins. *Infect Immun* 62(10): 4587-4593.

McHolland LE & Trueblood MS 1981. Cultivation of *Anaplasma marginale*: eight year report. In: Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference, Starkville, MS. 167-183.

Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtti TJ 1994. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 80: 533-543.

Munderloh UG, Blouin EF, Kocan KM, Ge NL, Edwards WL, Kurtti TJ, 1996. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J Med Entomol* 33: 656-664.

Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, et al. 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 101(1): 53-64.

Norval RAI, Peter T, Sonenshine DE, Burridge MJ 1992. Responses of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to known or potential components of the aggregation-attachment pheromone III-Aggregation. *Exp Appl Acarol* 16(3): 237-245.

Palmer GH & McGuire TC 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol* 133(2): 1010-1015.

Palmer GH, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC 1986. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science* 231(4743):1299-1302.

Palmer GH, Waghela SD, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC 1987. Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the am-105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol* 17(7): 1279-1285.

Palmer GH, Oberle SM, Barbet AF, Goff WL, Davis WC, McGuire TC 1988. Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect Immun* 56(6): 1526-1531.

Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC 1989. Immunization of cattle with the msp-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect Immun* 57(11): 3666-3669.

Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today* 15: 281–286.

Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect* 2: 167-176.

Palmer GH & Brayton KA 2007. Gene conversion is a convergent strategy for pathogen antigenic variation. *Trends Parasitol* 23: 408–413.

Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A 2003a. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem Biol* 10: 961-966.

Pantarotto D, Partidos CD, Graff R, Hoebeke J, Briand JP, Prato M, Bianco A 2003b. Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *J Am Chem Soc* 125(20): 6160-6164.

Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A 2004. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* 10(1): 16-17.

Pompeo F & Resasco DE 2002. Water Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes by Functionalization with Glucosamine. *Nano Lett* 2(4): 369-373.

Potgieter FT 1979. Epizootiology and control of anaplasmosis in south-africa. *J S Afr Vet Assoc* 50(4): 367-372.

Purcell AW, Mccluskey J, Rossjohn J 2007. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* 6(5): 404-414.

Reeves JD & Swift BL 1977. Iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle. *Vet Med Small Anim Clin* 13: 911-914.

Ribeiro MFB & Lima JD 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 61(1-2): 31-39.

Ribeiro MFB, Passos LMF, Guimarães AM 1997. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 70: 271-277.

Ribeiro MFB & Passos LMF 2002. Tristeza Parasitária Bovina. *Cad Tec Vet Zootec* 39: 36-52.

Ristic M & Carson CA 1977. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In:

Miller L.H, Pino J.a, McKelvey J.J (eds) Immunity to blood parasites of animal and man: advances in experimental medicine and biology. Ney York: Plenum Publishing Corp, p. 151-188.

Ristic M 1981. Anaplasmosis. In: Ristic M, McIntyre I 1981. Diseases of cattle in the tropics - economic and zoonotic relevance. Current topics in veterinary medicine and animal science. The Hague/Boston/London 6: 327-344.

Roitt MI, Brostoff J, Male KD 1999. Imunologia. São Paulo: Manole, 424p.

Rosca ID, Watari F, UO M, Akasaka T 2005. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. Carbon 43: 3124–3131.

Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, et al. 2005. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. Mol Biosyst 1: 176-182.

Schaffazick SR & Guterres SS 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quim Nova 26(5): 726-737.

Schalm OW 1964. A simple and rapid method for staining blood films with new methylene blue. J Am Vet Med Assoc 145(15): 1184–1188.

Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH 2005. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari : Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae). J Med Entomol 42(4): 668-675.

Shkap V, Molad T, Fish L, Palmer GH 2002. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. Parasitol Res 88(6): 546-552.

Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P 2003. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. J Toxicol Environ Health A 66: 1909-1926.

Silvestre BT, Vasconcelos MMC, Bastos CV, Ribeiro MFB 2010. Produção de antígenos de *Anaplasma marginale* em cultivo *in vitro* de células IDE8. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 2010. AG30-AG30.

Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, Partidos CD 2006. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. J Am Chem Soc 127: 4388-4396.

Sinha N & Yeow J 2005. Carbon nanotubes for biomedical applications. IEEE Trans Nanobioscience 4(2) 180-195.

Smart SK, Cassady AI, Lu QG, Martin DJ 2006. The biocompatibility of carbon nanotubes. Carbon 44(6): 1034-1047

Smith R, Levy MG, Kuhlenschmidt MS, Adams JH, Rzechula DG, Hardt TA, Kocan KM 1986. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. Am J Vet Res 47: 127-129.

Smith RD, Hungerford LL, Armstrong CT 1989. Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. J Am Vet Med Assoc 195(4): 476-480.

Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ 1989. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. Am J Vet Res 50(8): 1377-1380.

Sutten EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, Brayton KA, Gillespie JJ, Brown WC 2010. *Anaplasma marginale* Type IV Secretion System Proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 Are Immunogenic Components of a Protective Bacterial Membrane Vaccine. Infect Immun 78(3): 1314-1325.

Tebele N & Palmer GH 1991. Crossprotective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. Trop Anim Health Prod 23: 197-202.

Tebele N, McGuire TC, Palmer GH 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. Infect Immun 59(9): 3199-204.

Theiler A 1910. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). J Comp Pathol Ther 23: 98-115.

Theiler A 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: 1st Report of the Director of Veterinary Research. Department of Agriculture of the Union of South Africa. 7-46.

Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H 2006. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. Toxicol In Vitro 20: 1202-1212.

Turton JA, Katsande TC, Matingo MB, Jorgensen WK, Ushewokunze-Obatolu U, Dalgliesh RJ 1998. Observations on the use of *Anaplasma centrale* for immunization of cattle against anaplasmosis in Zimbabwe. Onderstepoort J Vet Res 65(2): 81-86.

Varma MGR, Pudney M, Leake CJ 1975. Establishment of 3 cell lines from tick *Rhipicephalus appendiculatus* (acari-ixodidae) and their infection with some arboviruses. J Med Entomol 11(6): 698-706.

Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E et al. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun* 60(12): 5139-5144.

Yandar N, Pastorin G, Prato M, Bianco A, Patarroyo ME, Lozano JM 2008. Immunological profile of a *Plasmodium vivax* AMA-1 N-terminus peptide-carbon nanotube conjugate in an infected *Plasmodium berghei* mouse model. *Vaccine* 26: 5864–5873

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 77: 117-125.

Wilson AJ, Parker R, Trueman KF 1980. Experimental immunization of calves against *Anaplasma marginale* infection: observation on the use of living *A.centrale* and *A. marginale*. *Vet Parasitol* 7: 305-311.

Wright IG 1990. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. *Rev Sci Tech Off Int Epizool* 9: 345–356.

Zeinali M, Jammalan M, Ardestani SK, Mosaveri N 2009. Immunological and cytotoxicological characterization of tuberculin purified protein derivative (PPD) conjugated to single-walled carbon nanotubes. *Immunol Lett* 126: 48–53.