

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**AVALIAÇÃO DA VACINA DE *Anaplasma marginale* UTILIZANDO rMSP1a
FUNCIONALIZADA A NANOTUBOS DE CARBONO, ASSOCIADO AO
ANTÍGENO INATIVADO PRODUZIDO *in vitro*: PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E A PROTEÇÃO INDUZIDA EM BEZERROS,
APÓS DESAFIO EXPERIMENTAL.**

Bruna Torres Silvestre da Silva

Belo Horizonte

2017

Bruna Torres Silvestre da Silva

**AVALIAÇÃO DA VACINA DE *Anaplasma marginale* UTILIZANDO rMSP1a
FUNCIONALIZADA A NANOTUBOS DE CARBONO, ASSOCIADO AO
ANTÍGENO INATIVADO PRODUZIDO *in vitro*: PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E A PROTEÇÃO INDUZIDA EM BEZERROS,
APÓS DESAFIO EXPERIMENTAL.**

Tese 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 Doutora em Parasitologia.

Orientador: Dr. Múcio F. Barbosa Ribeiro
Co-Orientadora: Dr^a. Deborah A. Negrão-Corrêa

Belo Horizonte
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG e ao Departamento de Parasitologia pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, por todos os ensinamentos durante esses oito anos de convivência. Obrigada pelo apoio, pela confiança e pela oportunidade de aprender um pouquinho sobre o *Anaplasma*. Suas contribuições foram importantes para minha formação acadêmica.

À minha co-orientadora, Prof^a. Déborah A. Negrão-Côrrea, pelos ensinamentos sobre a Imunologia e por estar sempre disposta a me ajudar durante a análise dos dados. Sua ajuda foi fundamental para a compreensão dos meus resultados. Muito obrigada!

À Prof^a. Élide Rabelo pela colaboração no trabalho, por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para realização dos meus experimentos, mas, principalmente, pela amizade e pelo carinho.

Aos Professores Elias J. Facury-Filho e Antônio U. Carvalho da Escola de Veterinária - ICB/UFMG, e aos residentes da Clínica de Ruminantes que contribuíram para a realização dos experimentos. Obrigada pelo apoio e suporte durante a manutenção dos animais.

Ao Dr. Márcio Araújo e ao Dr. Olindo Martins-Filho pela colaboração na parte da citometria de fluxo. Obrigada por disponibilizar toda a estrutura laboratorial e pela ajuda durante a análise dos marcadores.

Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia, em especial à Rosálida, Afonso, Hudson e Sr. Neri. Obrigada pela amizade e pelas conversas sempre agradáveis!

À Sumara e Sibebe, secretárias da Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, pelo carinho, auxílio e prontidão em resolver nossos problemas.

Às amigas do Laboratório de Protozoologia Veterinária: Camila, Júlia e Letícia Estevam. Obrigada por dividirem comigo todos os momentos dessa longa jornada. Obrigada por me ouvirem desabar, rir e até chorar!!! Conviver com vocês foi muito especial pra mim. Camila e Júlia, obrigada pela amizade e pela disposição em me ajudar. Letícia, esses dois últimos anos foram muito mais alegres com a sua presença. Sua amizade trouxe luz e ternura para minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular: Celi, Ceres, Fernando, Luciana, Nayara, Pedro, Talita, Thayse, Vivian e William. Vocês estarão sempre presentes no meu coração. Obrigada por me incluírem na “Família LPM”, obrigada pelos cafés da tarde maravilhosos e, principalmente, pelos planos incríveis de como ficar rico ou então de como não enlouquecer durante a Pós-graduação (rsrsrsrsrs).

Aos amigos Filipe e Nayara a minha eterna gratidão! Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido. Vocês me ajudaram de uma maneira que somente amigos verdadeiros fazem uns pelos outros. Espero um dia poder retribuir à altura.

À Alice Versiani pelo apoio e por me apresentar o universo da nanotecnologia. Muito obrigada!

À Turma do Pepino pela amizade que construímos durante os últimos seis anos. Dividimos muitas coisas boas e algumas ruins, mas o mais importante foi saber que esta longa jornada foi capaz de construir amizades verdadeiras. Espero que os Pepinos sejam sempre unidos, onde estivermos, e que ainda possamos dividir muitos momentos de alegria (#PepinosForever).

Ao Prof. Alan Lane de Melo, nosso querido professor! Obrigada pelas conversas, pelos chás da tarde maravilhosos e pelo carinho com os Pepinos. Seus ensinamentos foram fundamentais para a nossa formação.

Às minhas queridas Pepinas: Bruninha, Érica, Júlia e Luciana Lima. Sem palavras para agradecer a amizade e o carinho recebido por cada uma de vocês. Que a distância nunca interfira na nossa amizade e que possamos compartilhar muitas conquistas. Vocês moram no meu coração!

Agradeço, em especial, aos meus pais Adilson e Janete pelo carinho, amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são o meu porto seguro! À minha irmã, Ana Paula, que enche minha vida de luz e alegria. Seu sorriso e sua espontaneidade me fazem querer ser melhor a cada dia. Amo vocês!

Ao meu grande amor, Alcimar, que esteve comigo em todos os momentos deste doutorado; que suportou os momentos de estresse e cansaço; que entendeu minhas ausências; que me acompanhou durante os experimentos de finais de semana; que me incentivou em todas as minhas decisões. Obrigada por me fazer feliz e por estar sempre ao meu lado!

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

“Mesmo quando tudo parecer desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.

Cora Coralina

1 RESUMO

2
3 Anaplasmosse bovina é uma doença infecciosa causada pela riquetsia intraeritrocitária
4 *A. marginale*. Atualmente não há uma vacina inativada comercialmente disponível.
5 Vacinas inativadas produzidas em células IDE8 falharam devido a ausência da
6 expressão da MSP1a nas riquetsias cultivadas neste sistema. Camundongos imunizados
7 com rMSP1a, utilizando nanotubos de carbono (MWNT) como molécula carreadora,
8 apresentaram resposta celular e humoral significativa, indicando que esta tecnologia
9 possa auxiliar no desenvolvimento de vacina inativada. Desta forma, o presente estudo
10 avaliou o efeito da imunização de bezerros com MWNT funcionalizado com rMSP1a,
11 associado com a vacina inativada de *A. marginale* produzida *in vitro*, na indução da
12 resposta imunológica, no controle da riquetsemia e no desenvolvimento da doença
13 clínica após desafio experimental com amostra heteróloga *A. marginale* UFMG1. A
14 rMSP1a foi expressa em *Escherichia coli* BL21, purificada e ligada covalentemente à
15 MWNTs. Extrato solúvel de *A. marginale* (AmUFMG2) foi produzido em cultivo *in*
16 *vitro* da riquetsia em células IDE8. No Capítulo I foi avaliado a resposta humoral e
17 celular dos bezerros imunizados nos diferentes protocolos e possíveis efeitos tóxicos
18 desta imunização. Para isso, vinte e quatro bezerros machos foram divididos em quatro
19 grupos e imunizados (via SC) com três doses, 21-21 dias, no esquema: G1 (controle),
20 G2 (AmUFMG2), G3 (MWNT+rMSP1a) e G4 (AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a).
21 Amostras de sangue foram coletadas para a contagem global de leucócitos, avaliação da
22 resposta imune e análise bioquímica. A imunização com MWNT+rMSP1a induziu
23 aumento na contagem de leucócitos totais, no número de células NK circulantes, na
24 população de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, linfócitos T ativados, células B e níveis
25 elevados de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2. Além disso, os MWNTs não induziram
26 alterações no perfil bioquímico, indicando que MWNT+rMSP1a foi capaz de induzir
27 resposta celular e humoral significativa, sem gerar toxicidade. No Capítulo II foram
28 avaliados as alterações imunológicas, os parâmetros clínicos e parasitológicos de
29 bezerros imunizados e experimentalmente desafiados com a amostra heteróloga *A.*
30 *marginale* UFMG1. Quinze bezerros machos foram divididos em três grupos e
31 imunizados (via SC) com três doses, 21-21 dias, no esquema: G1 (controle), G2
32 (MWNT+rMSP1a) e G3 (AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a). Após as imunizações, os
33 animais foram desafiados com 4x10⁷ eritrócitos infectados com *A. marginale* UFMG1.
34 Parâmetros clínicos, tais como temperatura retal, volume globular, riquetsemia e escore
35 clínico foram avaliados. Amostras de sangue foram coletadas para a análise da resposta
36 celular e humoral. Animais do G3 apresentaram redução significativa dos níveis de
37 riquetsemia, escore clínico moderado, melhor capacidade de recuperação do volume
38 globular e forte resposta de IgG2. Estes resultados sugerem que a combinação de
39 antígenos presentes no imunógeno recebido pelo grupo G3 foi capaz de proteger os
40 animais do escore grave, permitindo que novas abordagens sejam realizadas utilizando a
41 vacina inativada produzida *in vitro* associada com rMSP1a.

42
43 **Palavras-chave:** *Anaplasma marginale*, vacina inativada, MSP1a, nanotubos de
44 carbono.

1 ABSTRACT

2
3 Bovine anaplasmosis is an infectious disease caused by intracytotoxic rickettsia *A.*
4 *marginale*. There is no commercially available inactivated vaccine. Inactivated vaccine
5 produced in IDE8 cells failed due to absence of the MSP1a expression in the rickettsia
6 cultured in this system. Mice immunized with rMSP1a, linked to carbon nanotubes
7 (MWNT), showed significant humoral and cellular responses, indicating that this
8 technology may help in the development of inactivated vaccine. Therefore, the general
9 objective was to evaluate the effect of the immunization of calves with
10 MWNT+rMSP1a, associated with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in*
11 *vitro*, in the induction of immune response, control of rickettsemia and in the
12 development of clinical disease after experimental challenge with heterologous sample
13 *A. marginale* UFMG1. rMSP1a was expressed in *Escherichia coli* BL21, purified and
14 covalently linked to MWNTs. Soluble extract of *A. marginale* (AmUFMG2) was
15 produced by cultivating *A. marginale* in IDE8 cells. In the Chapter I was evaluated the
16 humoral and cellular response of the calves immunized with the different protocols and
17 possible toxic effects of this immunization. Twenty four holstein calves were divided
18 into four groups and immunized subcutaneously with three doses, 21-21 days, in the
19 following scheme: G1 (control), G2 (AmUFMG2), G3 (MWNT+rMSP1a) and G4
20 (AmUFMG2 and MWNT+rMSP1a). Blood and plasma samples were collected for total
21 leukocyte counts, evaluation of the immune response and biochemical profile.
22 Immunization with MWNT+rMSP1a induced an increase in the total leukocyte counts,
23 in the number of circulating NK cells, in the T lymphocytes CD4⁺, CD8⁺ T, activated T
24 lymphocytes, B cells and high levels of IgG, IgG1 and IgG2 antibodies. Furthermore,
25 MWNTs did not induce changes in the biochemical profile, indicating that the
26 immunization of calves with MWNT+rMSP1a was able to induce significant cellular
27 and humoral response, without generate toxicity. In the Chapter II were evaluated the
28 immunological alterations, clinical and parasitological parameters of calves immunized
29 and experimentally challenged with the heterologous sample *A. marginale* UFMG1.
30 Fifteen holstein calves were divided into three groups and immunized (via SC) with
31 three doses, 21-21 days, in the following scheme: G1 (control), G2 (MWNT+rMSP1a)
32 and G3 (AmUFMG2 and MWNT+rMSP1a). After immunizations, calves were
33 challenged with 4x10⁷ infected erythrocytes with *A. marginale* UFMG1. Clinical
34 parameters, such as rectal temperature, packed cell volume, rickettsemia and clinical
35 score were evaluated. Blood and plasma samples were collected for the cellular and
36 humoral response analysis. Calves from G3 showed significant reduction of the levels
37 of rickettsemia, moderate clinical score, better recovery capacity of the packed cell
38 volume and high levels of IgG2. These results suggest that the antigens combination
39 received by the G3 group was able to protect animals from severe score, allowing
40 further approaches to be performed using the inactivated vaccine produced *in vitro*
41 associated with rMSP1a.

42
43 **Keywords:** *Anaplasma marginale*, MSP1a, inactivated vaccine, carbon nanotubes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma representativo da divisão do trabalho..... 42
- Figura 2** – Fluxograma das coletas de sangue..... 48
- Figura 3 - (Fig. 1 - Artigo)** Median values of leukocyte counts at days 0 (pre-immunization), 21, 42 and 63. (*) Represent statistically significant differences within each group compared to day 0 ($p < 0.05$); (**) Statistically significant difference within group G2 compared to day 21, according to the Friedman test ($p < 0.05$). G1 = control group; G2 = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*; G3 = calves immunized with MWNT+rMSP1a; G4 = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro* associated with MWNT+rMSP1a (n=6)..... 72
- Figura 4 - (Fig. 2. - Artigo)** (A) Lymphocytes were identified as based on their size and granularity by flow cytometry. Analysis of CD335⁺ (NK cells) was performed within the selected lymphocyte region based on the relative fluorescence intensity observed in FL1 versus FL2 dot plot distributions (arrow). (B) Absolute number of CD335⁺ in whole-blood of calves at days 0 (pre-immunization), 42 and 63. (*) Represent statistically significant differences within each group compared to day 0, according to the Friedman test ($p < 0.05$). Letters represent statistically significant differences among groups according to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). G1 (a) = control group; G2 (b) = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*; G3 (c) = calves immunized with MWNT+rMSP1a; G4 (d) = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro* associated with MWNT+rMSP1a (n=6) 73
- Figura 5 - (Fig. 3. - Artigo)** Analysis of the lymphocytes in whole-blood of calves at days 0 (pre-immunization), 42 and 63. (A) Kinetics of the absolute number of CD4⁺ T lymphocytes, (B) CD8⁺ T lymphocytes, (C) CD21⁺ lymphocytes (B cells) and (D) CD25⁺ T lymphocytes (activated T lymphocytes). (*) Represent statistically significant differences within each group compared to day 0 ($p < 0.05$); (**) Statistically significant difference within group G3 compared to day 42, according to the Friedman test

($p < 0.05$). G1 = control group; G2= calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*; G3 = calves immunized with MWNT+rMSP1a; G4 = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro* associated with MWNT+rMSP1a (n=6) 74

Figura 6 - (Fig.4. - Artigo) Induction of the humoral response after immunizations. Measurements of antibodies (A) IgG anti-rMSP1a, (B) IgG1 anti-rMSP1a, (C) IgG2 anti-rMSP1a, (D) IgG anti-*A. marginale*, (E) IgG1 anti-*A. marginale* and (F) IgG2 anti-*A. marginale* by ELISA. Each bar represents the median value of each group (n=6). (*) Represent statistically significant differences within each group compared to day 0 (pre-immunization), according to the Friedman test ($p < 0.05$). Letters represent statistically significant differences among groups according to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). G1 (a) = control group; G2 (b) = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*; G3 (c) = calves immunized with MWNT+rMSP1a; G4 (d) = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro* associated with MWNT+rMSP1a.....76

Figura 7 - Dinâmica da temperatura retal ao longo do experimento. A seta indica o desafio com o isolado *A. marginale* UFMG1 no dia 63. (A) Valores medianos obtidos no grupo controle - G1. (B) Grupo G2 - MWNT+rMSP1a. (C) Grupo G3 - AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a. (D) Grupos G1, G2 e G3. (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). (...) Representa o valor considerado como hipertemia em bezerros (Campos, 1985). 88

Figura 8 - Dinâmica do VG ao longo do experimento. A seta indica o desafio com *A. marginale* UFMG1 no dia 63. (A) Valores medianos obtidos no grupo controle - G1. (B) Grupo G2 - MWNT+rMSP1a. (C) Grupo G3 - AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a. (D) Grupos G1, G2 e G3. (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). (...) Representa o limite inferior de normalidade (Radostits et al. 2007). (--) Representa o ponto limite de redução de VG para início do tratamento dos animais..... 90

Figura 9 - Níveis de riquetsemia detectados em esfregaços sanguíneos de cada grupo experimental ao longo do experimento. Os valores apresentados representam a mediana

de cada grupo. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). 93

Figura 10 - Dinâmica entre riquetsemia e VG ao longo do experimento. (A) Valores medianos obtidos no grupo controle - G1. (B) Grupo G2 - MWNT+rMSP1a. (C) Grupo G3 - AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a. (---) Representa o limite inferior de normalidade do VG (Radostits et al. 2007). 94

Figura 11 - Média de escore clínico obtida em cada grupo experimental no dia 87 (riquetsemia máxima) e no dia 89 (menor valor de VG). No grupo G2, o escore clínico foi realizado no dia 88 ao invés do dia 87. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0.05$). 96

Figura 12 - Número absoluto leucócitos presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 97

Figura 13 - Número absoluto de células NK ($CD335^+$) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 98

Figura 14 - Número absoluto de linfócitos T $CD4^+$ ativados ($CD4^+CD25^+$) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 99

Figura 15 - Número absoluto de células T $CD4^+$ regulatórias ($CD4^+CD25^+Fox^+$) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-

desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 100

Figura 16 - Número absoluto de linfócitos T CD8⁺ ativados (CD8⁺CD25⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 100

Figura 17 - Número absoluto de células B (CD21⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 101

Figura 18 - Cinética de anticorpos IgG (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) anti-rMSP1a induzidos em cada grupo após as imunizações e o desafio com isolado *A. marginale* UFMG1. (*) Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 0 do mesmo grupo e (**) diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 63 do mesmo grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 103

Figura 19 - Cinética de anticorpos IgG (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) anti-AmUFMG2 induzidos em cada grupo após as imunizações e o desafio com isolado *A. marginale* UFMG1. (*) Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 0 do mesmo grupo e (**) diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 63 do mesmo grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de imunização dos bezerros	47
Tabela 2 - (Table 1 - Artigo) Biochemical profile in the G1 group (non-carboxylated MWNTs / Control group), G2 (AmUFMG2), G3 (MWNT+rMSP1a) and G4 (AmUFMG2 associated with MWNT+rMSP1a).....	78
Tabela 3 - Classificação do escore clínico adotado para cada parâmetro.....	84
Tabela 4 - Interpretação do grau de evolução da anaplasose bovina, conforme o escore clínico.....	85
Tabela 5 - Evolução clínica dos bezerros imunizados após o desafio experimental com 4×10^7 eritrócitos infectados com <i>A. marginale</i> UFMG1.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem

< - sinal de menor

> - sinal de maior

≤ - menor ou igual

≥ - maior ou igual

°C - graus Celsius

μg – micrograma

μl – microlitro

μm – micrômetros

μM – micromolar

ALP - fosfatase alcalina

AmUFMG2 - antígeno bruto do isolado UFMG2 de *A. marginale*.

AST - aspartato aminotransferase

CD21⁺ - células B

CD25⁺ - linfócitos T ativados

CD335⁺ - células NK

CD4⁺ - linfócitos T helper

CD8⁺ - linfócitos T citotóxico

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

dpd - dias pós o desafio

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme Lynked Immunossorbent Assay*

FITC - isotiocianato de fluoresceína

g/L - gramas por litro

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HNO₃ – ácido nítrico

h – hora

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICEX - Instituto de Ciências Exatas

IDE8 – linhagem de células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis*

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G 1

IgG2 – Imunoglobulina G 2
IL - interleucina
kg - kilograma
mg - miligrama
MG – Minas Gerais
mL – mililitro
MSP – *major surface protein*
MWNT – nanotubos de carbono de paredes múltiplas
MWNT+rMSP1a – proteína rMSP1a ligada covalentemente aos MWNTs
NaHCO₃ - bicarbonato de sódio
NK - células natural killer
nm – nanômetro
nPCR - nested PCR
NTCs – nanotubos de carbono
OD – densidade ótica
PBS – *Phosphate Buffer Saline*
PBST – PBS 1x + 0,05% de Tween 20
PC - período de convalescência
PCR - reação em cadeia da polimerase
PE - ficoeritrina
pH – potencial hidrogeniônico
PI - período de incubação
PP - período de patência
rMSP1a – MSP1a recombinante
Th1 – resposta imune do tipo 1
Th2 – resposta imune do tipo 2
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFMG1 – isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade
UFMG2 – isolado de *A. marginale* altamente patogênico
VG - volume globular
X – vezes
xg – vezes gravidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 <i>Anaplasma marginale</i>	22
2.2 Transmissão	23
2.3 Ciclo de Desenvolvimento.....	24
2.4 Distribuição Geográfica e Prejuízos Econômicos	26
2.5 Controle	26
2.5.1 Vacina Viva.....	27
2.5.2 Vacina Inativada.....	28
2.6 MSP1a (<i>Major Surface Protein 1 alfa</i>)	30
2.7 Resposta Imune x <i>Anaplasma marginale</i>	32
2.8 Nanotubos de Carbono no Desenvolvimento de Vacinas.....	34
2.9 Toxicidade dos nanotubos de carbono	36
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVO GERAL	42
4. CAPÍTULO I - OBJETIVOS	44
4.1 Objetivo Geral.....	44
4.2 Objetivos Específicos	44
5. MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1 Locais dos experimentos.....	45
5.2 Produção da vacina inativada de <i>A. marginale</i> UFMG2 (AmUFMG2)	45
5.3 Produção da ferramenta MWNT+rMSP1a	46

5.4 Animais experimentais	46
5.5 Delineamento experimental	47
5.6 Monitoramento dos animais.....	48
5.7 Imunofenotipagem de linfócitos periféricos	48
5.8 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2	49
5.9 Parâmetros bioquímicos.....	50
5.10 Análise estatística	50
5.11 Metodologia de Apresentação	51
6. RESULTADOS	52
7. CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....	81
7.1 Objetivo Geral:	81
7.2 Objetivos Específicos:	81
8. MATERIAL E MÉTODOS	82
8.1 Locais dos experimentos.....	82
8.2 Delineamento experimental	82
8.3 Desafio com amostra UFMG1 de <i>A. marginale</i> e avaliação dos parâmetros clínicos	83
8.4 Análise da evolução clínica após desafio com isolado UFMG1 de <i>A. marginale</i>	83
8.5 Avaliação dos parâmetros celulares induzidos após desafio	85
8.6 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 induzidos após o desafio .	85
8.7 Análise estatística	86
9. RESULTADOS	87
9.1 Temperatura retal, VG, Riquetsemia e Escore clínico.....	87
9.1.1 Temperatura retal	87

9.1.2. Volume globular (VG)	89
9.1.3 Riquetsemia	92
9.1.4 Escore clínico	95
9.2 Perfil imunofenotípico de linfócitos circulantes de bezerros imunizados após o desafio com <i>A. marginale</i> UFMG1	96
9.3 Resposta humoral induzida após o desafio com o isolado <i>A. marginale</i> UFMG1	102
9.3.1 IgG, IgG1 e IgG2 anti-rMSP1a	102
9.3.2 IgG, IgG1 e IgG2 anti-AmUFMG2	104
10. DISCUSSÃO	107
11. CONCLUSÕES	114
12. PERSPECTIVAS	116
13. REFERÊNCIAS	118

I – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

2

3 Anaplasmose bovina, causada pela riquetsia intraeritrocitária *Anaplasma marginale*,
4 é uma das principais doenças transmitidas por carrapato e moscas hematófagas (Ducken
5 et al. 2015), sendo considerada como um importante fator de restrição para o
6 desenvolvimento da pecuária em muitos países (Kocan et al. 2010).

7 Infecção por *A. marginale* se manifesta como um quadro clínico conhecido
8 popularmente como “Tristeza Parasitária Bovina”, caracterizado como um complexo de
9 doenças causadas por vários hemoparasitas, tais como *A. marginale*, *Babesia bovis* e *B.*
10 *bigemina* (Ribeiro e Passos, 2002). Animais acometidos pela infecção por *A. marginale*
11 podem apresentar o desenvolvimento de anemia moderada a grave, causada pela
12 remoção de eritrócitos infectados por células do sistema mononuclear fagocitário
13 presentes no baço (Brown 2012). Além da anemia, outros sinais clínicos são
14 comumente observados, tais como a icterícia, febre, perda de peso, aborto, letargia,
15 baixa produção de leite e, frequentemente, morte de animais adultos não imunes (Ristic
16 & Carson 1977; Kuttler 1984).

17 Animais que se recuperam da infecção aguda permanecem infectados durante toda a
18 vida. Nesta fase, os animais apresentam riquetsemias flutuantes, que variam de 10^2 a
19 $>10^7$ riquetsias por microlitro de sangue, sendo que ambas as infecções, aguda ou
20 persistente, são caracterizadas por cargas relativamente elevadas de antígenos (Han et
21 al. 2010). Bovinos persistentemente infectados apresentam imunidade ao longo da vida
22 e, após desafio, desenvolvem baixo ou nenhum sinal clínico da doença (Kocan et al.
23 2010). Estes animais são considerados importantes na epidemiologia da infecção, uma
24 vez que atuam como reservatórios de *A. marginale*, possibilitando a transmissão da
25 riquetsia para um animal susceptível por meio da alimentação de vetores biológicos ou
26 mecânicos. A disseminação de *A. marginale* nos rebanhos ocorre por meio de carrapatos
27 e moscas hematófagas, podendo ainda ser transmitida de forma vertical e
28 iatrogenicamente (Guglielmone 1995; Kocan et al. 2003). Na América do Sul, o
29 carrapato *Rhipicephalus microplus* é considerado o vetor biológico de *A. marginale* e
30 em áreas onde a presença desse carrapato não é relatada, moscas hematófagas assumem
31 um importante papel na transmissão desta riquetsia (Guglielmone 1995).

1 No Brasil, em geral, as condições climáticas são favoráveis para o desenvolvimento
2 destes vetores, favorecendo a transmissão de *A. marginale* e, conseqüentemente,
3 estabelecendo uma área endêmica para a anaplasnose. No entanto, em algumas regiões
4 do País, as condições climáticas, ecológicas ou até mesmo o sistema de criação no qual
5 os animais são mantidos, contribuem para que os bezerros tenham pouco ou nenhum
6 contato com os vetores (Oliveira et al. 1992). Nestas regiões, caracterizadas como áreas
7 de instabilidade enzoótica, a maior parte dos animais se infecta tardiamente favorecendo
8 a ocorrência de surtos e casos clínicos da anaplasnose (Jonsson et al. 2012).

9 Em áreas endêmicas para a anaplasnose bovina, medidas de controle não visam
10 bloquear a infecção, mas sim reduzir a ocorrência de casos clínicos e a mortalidade de
11 animais, decorrentes da intensa riquetsemia e anemia provocada pelo *A. marginale*
12 (Ribeiro & Lima 1996; Kocan et al. 2000). Dentre as medidas de controle, a vacinação
13 de animais susceptíveis pode ser uma importante estratégia que visa induzir uma
14 resposta imune protetora e reduzir a ocorrência de casos clínicos da doença.

15 Para proteger animais jovens e adultos das manifestações clínicas causadas por *A.*
16 *marginale*, vacinas vivas e inativadas foram desenvolvidas utilizando eritrócitos
17 bovinos infectados como fonte de antígeno. No entanto, a utilização destas vacinas
18 apresenta algumas limitações, tais como: uso restrito em animais jovens (vacinas vivas),
19 indução de imunidade parcial contra amostras virulentas, alto custo de produção do
20 inóculo e a possibilidade de transmissão de outros patógenos (Garcia-Garcia et al. 2004;
21 Kocan et al. 2003, 2010). O cultivo de *A. marginale* em células IDE8 foi considerado
22 uma alternativa promissora para a produção de vacinas. Entretanto, a utilização da
23 vacina inativada de *A. marginale* produzida neste sistema foi incapaz de proteger os
24 animais vacinados devido ao fato das riquetsias produzidas nestas células não
25 expressarem a proteína MSP1a, necessária para a indução de uma resposta protetora
26 (Garcia-Garcia et al. 2004; Lasmar et al. 2012). Por conseguinte, atualmente não há uma
27 vacina inativada comercialmente disponível capaz de proteger animais adultos da
28 doença clínica. Além disso, a utilização de antibióticos para o controle da anaplasnose
29 bovina tem sido restringida por agências reguladoras e grupos de consumidores da
30 Europa e dos EUA (Coetzee et al. 2006; Meeusen et al. 2007), aumentando a
31 necessidade para o desenvolvimento de uma vacina eficiente. Tais fatores têm
32 estimulado a melhoria das técnicas utilizadas para a produção de vacina contra
33 anaplasnose bovina, e novas alternativas devem ser empregadas visando à identificação

1 de antígenos vacinais capazes de proteger animais susceptíveis das manifestações
2 clínicas da doença.

3

4 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

5

6 **2.1 *Anaplasma marginale***

7

8 Membros da família Anaplasmataceae são organismos intracelulares obrigatórios,
9 que se desenvolvem exclusivamente dentro de vacúolos parasitóforos ligados à
10 membrana da célula hospedeira, multiplicando-se tanto em hospedeiros vertebrados
11 quanto em invertebrados, tais como os carrapatos (Kocan et al. 2010). O gênero
12 *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez em 1910 por Sir Arnold Theiler, que
13 descreveu “pontos marginais”, encontrados em eritrócitos de bovinos doentes corados,
14 como o agente causador de uma doença específica (Theiler 1910, 1911). As inclusões
15 localizadas marginalmente haviam sido observadas frequentemente em células
16 vermelhas do sangue de animais anêmicos, muitas vezes naqueles que sofriam de
17 babesiose. Theiler, posteriormente, descreveu a espécie *A. centrale*, que é menos
18 patogênico e as inclusões localizam-se no centro dos eritrócitos.

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

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

1 ou alça (Kocan et al. 1984). O apêndice é visualizado por meio de microscopia de
2 contraste de fases, coloração pelo “novo azul de metileno” (Schalm 1964), por meio da
3 reação de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica. Amostras com essa
4 característica morfológica têm sido isoladas em diferentes estados da América do Norte
5 e no México (Smith et al. 1986).

6 No Brasil, Ribeiro et al. (1997) isolaram uma amostra de *A. marginale* com apêndice
7 (UFMG1), de um bezerro naturalmente infectado no estado de Minas Gerais. O isolado
8 UFMG1 é considerado uma amostra de baixa virulência, pois produz altos picos de
9 riquetsemia em animais esplenectomizados sem causar a morte dos mesmos (Bastos et
10 al. 2010). De maneira oposta, o isolado UFMG2 de *A. marginale* não possui apêndice e
11 é capaz de induzir alta morbidade e mortalidade de animais susceptíveis (Bastos et al.
12 2010). Outra amostra brasileira, o isolado UFMG3, obtido de um bezerro neonato no
13 estado de Minas Gerais, foi capaz de produzir baixos níveis de riquetsemia e diminuição
14 moderada do volume globular, sem a necessidade de tratamento dos animais inoculados
15 (Silvestre et al. 2015). Tais dados demonstram a presença de uma alta diversidade
16 genética de *A. marginale* em áreas endêmicas para a doença.

18 **2.2 Transmissão**

19
20 A transmissão de *A. marginale* pode ser efetuada biologicamente por carrapatos,
21 mecanicamente por moscas hematófagas e fômites contendo sangue contaminado ou
22 infecção vertical (Dikmans 1950; Kocan et al. 2003, 2004; Pypers et al. 2011).

23 Na transmissão biológica, os carrapatos da família Ixodidae (gêneros *Rhipicephalus*,
24 *Dermacentor* e *Ixodes*) têm sido incriminados como vetores de *A. marginale*.
25 Entretanto, o carrapato *Amblyomma* spp. não demonstrou estar envolvido na
26 transmissão dessa riquetsia (Dikmans 1950; Ewing 1981; Kocan et al. 2004). Este tipo
27 de transmissão pode ocorrer transestadialmente ou intraestadialmente, enquanto que a
28 transmissão transovariana não foi comprovada (Stich et al. 1989). A transmissão
29 transestadial é dada por ninfas ou adultos que se infectaram no estágio anterior, e a
30 intraestadial ocorre dentro do mesmo estágio. A transmissão intrastadial mostrou-se ser
31 efetiva por carrapatos machos, uma vez que estes se tornam persistentemente infectados
32 com *A. marginale* e podem transmiti-lo repetidamente durante a movimentação entre os

1 bovinos (Kocan et al. 1992a,b). Machos infectados podem ser um importante
2 mecanismo de transmissão do patógeno no caso de carrapatos de apenas um hospedeiro,
3 como *R. microplus* e *Dermacentor albipictus* (Kocan et al. 2003). No Brasil, o carrapato
4 *R. microplus* é considerado o principal vetor biológico da anaplasmosse bovina, e o
5 desenvolvimento de colônias de *A. marginale* nas células do intestino de fêmeas
6 ingurgitadas foi comprovado por Ribeiro & Lima (1996). Pesquisas recentes
7 documentaram que a transmissão biológica por carrapatos foi mais eficiente do que a
8 transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans*, a “mosca do estábulo” (Scoles et al.
9 2005). No entanto, alguns isolados de *A. marginale* não são infectantes ou
10 transmissíveis por carrapatos (Kocan et al. 2004).

11 A transmissão mecânica por moscas hematófagas tem sido relatada por dípteros
12 hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* e várias espécies de mosquitos (Potgieter
13 1979; Ewing 1981; Foil 1989). Esta forma de transmissão, provavelmente, é a principal
14 rota de disseminação de *A. marginale* em certas áreas dos Estados Unidos, América
15 Central e do Sul, e África onde os carrapatos vetores estão ausentes (Ewing 1981; Foil
16 1989) e onde o *R. microplus*, o carrapato tropical de bovinos, parece não ser um vetor
17 biológico do agente (Figueroa et al. 1998; Coronado 2001). Similarmente, a transmissão
18 mecânica associada com equipamentos cirúrgicos contaminados, pode dar origem a
19 casos clínicos fora da estação normal do vetor (Reeves & Swift 1977; Ewing 1981;
20 Smith et al. 1989). Já a transmissão vertical, determinada pela infecção de bezerros
21 neonatos ainda no útero de vacas infectadas com *A. marginale* (Aubry & Geale 2011),
22 causa infecções persistentes em bezerros, sugerindo a baixa virulência dessas amostras
23 (Ribeiro et al. 1995; Grau et al. 2013; Silvestre et al. 2015). No entanto, a anaplasmosse
24 clínica tem sido relatada em bezerros neonatos, sugerindo a ocorrência de diferenças na
25 virulência destes isolados (Benesi et al. 1999; Pypers et al. 2011; Pohl et al. 2013).

26

27 **2.3 Ciclo de Desenvolvimento**

28

29 Nos bovinos, *A. marginale* invade e replica dentro dos eritrócitos e, embora células
30 endoteliais tenham sido infectadas *in vitro* (Munderloh et al. 2004), não há provas da
31 infecção *in vivo* destas células (Wamsley et al. 2011). O ciclo parasitológico de *A.*
32 *marginale* inicia-se com a penetração dos corpos iniciais nos eritrócitos bovinos pelo

1 processo de rofecitose, que envolve a invaginação da membrana citoplasmática
2 formando o vacúolo parasitóforo.

3 No interior do vacúolo, os corpos iniciais multiplicam-se por divisão binária
4 formando até oito elementos. Os corpos iniciais saem dos eritrócitos por um processo de
5 rofecitose reversa, sem romper a membrana das hemácias, e iniciam novo ciclo ao
6 penetrar em novos eritrócitos (Ribeiro & Passos 2002). Durante a fase aguda, 70% ou
7 mais de eritrócitos podem ser parasitados. O período de incubação varia de sete a 60
8 dias, sendo observada uma média de 28 dias para o aparecimento dos sinais clínicos da
9 doença (Kocan et al. 2010).

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

16 O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* nos carrapatos é complexo e
17 coordenado com o ciclo de alimentação dos mesmos (Kocan et al. 1992a,b). Durante a
18 hematofagia, eritrócitos infectados com *A. marginale* são ingeridos pelo carrapato,
19 proporcionando a infecção das células intestinais. Após a penetração nas células do
20 intestino, *A. marginale* se multiplica por divisão binária, formando um vacúolo
21 contendo inúmeros corpúsculos. Após a lise do vacúolo, os corpúsculos caem na
22 hemolinfa infectando outros tecidos do carrapato, incluindo as glândulas salivares,
23 proporcionando a transmissão para bovinos susceptíveis (Ge et al. 1996; Kocan et al.
24 2004). A primeira forma de *A. marginale* observada dentro das colônias é a forma
25 reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que
26 podem conter centenas de organismos. As formas reticuladas, em seguida, transformam-
27 se em formas densas, que é a forma infectante, e podem sobreviver fora das células do
28 hospedeiro por um período de tempo limitado (Kocan et al. 2003). Bovinos tornam-se
29 infectados quando as formas densas são transmitidas (via glândulas salivares) durante a
30 alimentação do carrapato vetor.

31

2.4 Distribuição Geográfica e Prejuízos Econômicos

Anaplasmosse bovina apresenta distribuição mundial, atingindo principalmente bovinos de regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das principais restrições para a pecuária em muitos países (Kocan et al. 2010). *A. marginale* é endêmico nos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul, bem como, nas ilhas do Caribe, sendo enzoótica em todos os países da América Latina, com a exceção das áreas deserticas e certas cadeias de montanhas, como os Andes (Guglielmone 1995). A anaplasmosse 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 em 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, *A. marginale* é endêmico em todo o território, causando importantes problemas econômicos e sanitários.

A doença causa importantes perdas econômicas devido à alta morbidade e mortalidade em rebanhos susceptíveis. Estes prejuízos estão associados à baixa produtividade dos animais, aborto, além dos custos com o tratamento e controle da doença. Nos Estados Unidos, a perda anual causada pela anaplasmosse 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 por *A. marginale* são difíceis de calcular, não só pela morbidade e mortalidade, mas também pelos fatores ambientais, fatores intrínsecos de cada sistema de manejo, tais como o tipo de pastagem, a densidade animal e dos vetores, bem como, as medidas de controle adotadas em cada propriedade (Arteche et al. 1992; Silva & Fonseca 2013).

2.5 Controle

Medidas de controle para a anaplasmosse bovina incluem o controle de artrópodes, a administração profilática de antibióticos, a manutenção de rebanhos livres de

1 *Anaplasma* e a vacinação. A aplicação destes métodos é influenciada pela
2 disponibilidade, custo e viabilidade de aplicação (Kocan et al. 2000).

3 Dentre as medidas de controle existentes, a vacinação é considerada uma maneira
4 efetiva para proteger os animais susceptíveis contra a doença clínica. Nos últimos 60
5 anos o desenvolvimento de vacinas contra a anaplasnose tem recebido atenção
6 considerável, resultando na produção de vacinas vivas e inativadas (Kocan et al. 2000).
7 Ambas as vacinas utilizam eritrócitos bovinos infectados como fonte de antígeno e são
8 direcionadas para a prevenção de morbidade e mortalidade, tornando os animais
9 persistentemente infectados. No entanto, tais vacinas não impedem o animal de se
10 infectar após a exposição desafio (Kocan et al. 2003, 2010), além do alto custo de
11 produção e da possibilidade de transmissão de outros patógenos (Garcia-Garcia et al.
12 2004).

14 **2.5.1 Vacina Viva**

15
16 A utilização de vacinas vivas para o controle da anaplasnose foi iniciado por Sir
17 Arnold Theiler no início de 1900, por meio da utilização de *A. centrale*, uma espécie de
18 *Anaplasma* considerada menos patogênica e capaz de desenvolver resposta imune
19 protetora contra *A. marginale*. Atualmente, estratégias vacinais usando organismos
20 vivos incluem a utilização de vacinas vivas contendo cepas de baixa virulência de *A.*
21 *marginale*, infecção dos animais seguida de tratamento e vacinas vivas contendo cepas
22 de *A. centrale*.

23 Atenuação de cepas de *A. marginale* e a inoculação de bovinos com eritrócitos
24 infectados com *A. marginale* seguido de tratamento com tetraciclina (no início da
25 elevação da temperatura corporal ou da detecção da riquetsemia) tornam os animais
26 imunizados persistentemente infectados e podem falhar na prevenção da doença aguda
27 (Kocan et al. 2010). Além disso, estas estratégias de vacinação requererem o
28 monitoramento rigoroso dos animais por um médico veterinário, o que muitas vezes
29 torna inviável sua utilização em grandes rebanhos (Kuttler et al. 1988; Kocan et al.
30 2003).

1 A utilização de *A. centrale* é atualmente a estratégia mais empregada em vacinas
2 vivas para o controle da anaplasmoze bovina (Theiler 1911; Kocan et al. 2010). No
3 entanto, seu uso é restrito a animais jovens, uma vez que animais adultos são
4 considerados susceptíveis a infecção aguda devido à ausência de imunidade protetora.
5 Apesar de mais de um século de uso em campo, a base imunológica desta vacina viva
6 para a proteção dos animais contra cepas virulentas de *A. marginale* permanece
7 desconhecida (Kocan et al. 2003). Além disso, a possibilidade de transmissão de outros
8 patógenos deve ser considerada, uma vez que se trata de uma vacina viva proveniente
9 de sangue infectado. Este fato tem impedido sua comercialização nos Estados Unidos e
10 na União Européia (Agnes et al. 2010). Outra restrição para sua utilização é que a
11 imunidade protetora gerada pela vacina viva de *A. centrale* não é uniforme contra todos
12 os isolados de *A. marginale*, e surtos da doença têm sido relatados mesmo em
13 populações vacinadas (Wilson et al. 1980; Turton et al. 1998; Bock & de Vos 2001;
14 Shkap et al. 2002). Tais variações na resposta vacinal cruzada podem estar relacionadas
15 à diferença antigênica encontrada entre as cepas do desafio e as cepas utilizadas na
16 vacinação, quando isoladas de áreas geográficas muito distantes (Kocan et al. 2000).

17

18 **2.5.2 Vacina Inativada**

19

20 Vacinas inativadas de *A. marginale*, derivadas de eritrócitos infectados, foram
21 capazes de aumentar a resistência dos bovinos à infecção e diminuir o número de mortes
22 pela doença (Brock et al. 1965). Esta estratégia foi considerada uma alternativa para a
23 proteção de animais adultos não-imunes de áreas não endêmicas para o *A. marginale*.
24 No entanto, além do alto custo para a produção/purificação do inóculo, da falha na
25 proteção cruzada e do alto risco de transmissão de outro patógenos, bezerros nascidos
26 de mães vacinadas ocasionalmente apresentavam isoeritrolise neonatal, devido ao fato
27 dessa vacina estar contaminada com estroma dos eritrócitos (Kocan et al. 2003; Garcia-
28 Garcia et al. 2004). Tais fatores inviabilizaram a comercialização desta vacina nos
29 Estados Unidos no final da década de 90 (Kocan et al. 2000).

30 Nos últimos anos, a produção de vacinas inativadas de *A. marginale* provenientes de
31 cultura de células embrionárias de carrapato (células IDE8) tem sido pesquisada na
32 tentativa de se evitar os problemas das vacinas derivadas de eritrócitos. Esta alternativa

1 permite a obtenção de um inóculo de baixo custo, com maior facilidade na
2 padronização, além do fato de eliminar a necessidade de inoculação experimental em
3 animais para sua produção (Kocan et al. 2003). No entanto, estudos demonstraram que
4 *A. marginale* cultivado neste sistema foi incapaz de proteger os animais vacinados
5 contra desafio experimental, devido a regulação negativa da expressão do gene da
6 proteína de superfície MSP1a pelos organismos gerados neste sistema *in vitro* (Garcia-
7 Garcia et al. 2004; Lasmar et al. 2012). A ausência da proteína MSP1a no *A. marginale*
8 derivado da cultura de células IDE8 impediu que animais vacinados com este antígeno
9 fossem eficientemente protegidos da infecção, uma vez que esta proteína está
10 relacionada com a capacidade de adesão da riquetsia nos eritrócitos bovinos e na
11 indução de uma resposta imune protetora (Garcia-Garcia et al. 2004). Este fato impediu
12 a utilização e comercialização desta vacina inativada para o controle da anaplasose
13 bovina. Para tentar solucionar este problema, Munderloh et al. (2004) demonstraram a
14 infecção e propagação do *A. marginale* em linhagem de células endoteliais bovinas.
15 Porém, até o presente momento, não existem trabalhos relacionados a composição
16 gênica e expressão de proteínas de superfície (MSPs) nos organismos produzidos nesse
17 sistema, bem como, a sua utilização em ensaios vacinais.

18 Recentemente, abordagens moleculares e proteômicas permitiram um avanço na
19 identificação de potenciais alvos vacinais, nos quais podem ser empregados como
20 alternativa para induzir uma resposta imune eficiente, capaz de proteger animais
21 vacinados da doença clínica (Dark et al. 2011). Estudos realizados nas últimas décadas
22 têm contribuído para ampliar o conhecimento da composição antigênica do *A.*
23 *marginale*, bem como, identificar o papel das proteínas de membrana (MSPs) no
24 desenvolvimento da imunidade protetora contra a infecção (Palmer et al.
25 1986,1988,1989; Tebele et al. 1991; McGuire et al. 1994; de la Fuente et al. 2003;
26 Kocan et al. 2003; Silvestre et al. 2014). De acordo com Brown (2012) o meio mais
27 eficiente para induzir a imunidade protetora é a imunização de bovinos com frações da
28 membrana externa do *A. marginale*, na qual pode proteger os animais das manifestações
29 clínicas da anaplasose bovina.

30

31

2.6 MSP1a (*Major Surface Protein 1 alfa*)

A identificação de proteínas de superfície de *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: MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (Palmer & McGuire 1984; Visser et al. 1992). Estas proteínas são antigenicamente relacionadas e são responsáveis pela indução da produção da maioria dos anticorpos parasito-reativo nos animais que foram naturalmente infectados ou vacinados com corpúsculos iniciais de *A. marginale* (Tebele et al. 1991).

MSP1 é composta por dois peptídeos independentes covalentemente ligados: MSP1a e MSP1b. Ambas as proteínas mostraram estar envolvidas na adesão de *A. marginale* às células hospedeiras (Garcia-Garcia et al. 2004), sendo que 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. 1994; de la Fuente et al. 2001).

A proteína MSP1a apresenta uma região variável entre os isolados de *A. marginale* (região N-terminal) e outra conservada (C-terminal). Esta variação, observada na porção N-terminal da proteína, ocorre devido à variação no número de repetições de aminoácidos (conhecidas como repetições em tandem) presentes nos isolados de *A. marginale*. Cada repetição em tandem apresenta 28-29 aminoácidos e o número de repetições determina a massa molecular da MSP1a, que pode variar de 70-100 kDa, dependendo do isolado de *A. marginale*. Estas repetições de peptídeos são expostas na superfície de *A. marginale*, sendo necessárias e suficientes para a adesão de *A. marginale* às células hospedeiras (Palmer et al. 1987; McGarey et al. 1994; McGarey & Allred 1994; de la Fuente et al. 2001, 2003).

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; Dark et al. 2011; Brown 2012) e em carrapatos persistentemente infectados (de la Fuente & Kocan 2001).

1 A atividade dessas proteínas está ligada ao mecanismo de evasão da resposta imune e a
2 persistência do microrganismo no hospedeiro (French et al. 1998; Palmer et al. 2000;
3 Brown 2012). A MSP4 e MSP5 são proteínas codificadas por genes de cópia única.
4 Embora estas proteínas sejam altamente conservadas entre os isolados e apresentar parte
5 da sua seqüência homóloga com polipeptídeos da MSP2 (Palmer et al. 1994; de la
6 Fuente et al. 2003, 2004), informações sobre suas funções não estão bem esclarecidas.

7 As MSPs de *A. marginale*, citadas acima, derivadas de cultura de células de carrapato
8 e de eritrócitos bovinos infectados, têm-se mostrado conservadas à nível de expressão
9 (Barbet et al. 1999), exceto a MSP1a que se mostrou diferencialmente expressa em
10 eritrócitos bovinos e cultura de células de carrapato (Kocan et al. 2001; de la Fuente et
11 al. 2002; Garcia-Garcia et al. 2004). Uma resposta diferencial de anticorpos contra a
12 MSP1a foi observada em bovinos imunizados com *A. marginale* derivado de eritrócitos
13 bovinos ou cultura de células de carrapato (Kocan et al. 2001; de la Fuente et al. 2002;
14 Garcia-Garcia et al. 2004). Essa diferença foi encontrada como resultado da alta
15 expressão da MSP1a pelo *A. marginale* de eritrócitos bovinos e da ausência da
16 expressão da MSP1a por organismos derivados de culturas de células de carrapato
17 (Garcia-Garcia et al. 2004), não protegendo os animais contra desafios experimentais
18 (Lasmar et al. 2012). Como resultado, bovinos imunizados com *A. marginale* derivado
19 de eritrócitos desenvolveram uma resposta preferencial à MSP1a, enquanto que bovinos
20 imunizados com *A. marginale* derivado de cultura de células de carrapato responderam
21 preferencialmente contra a MSP1b (Kocan et al. 2001; de la Fuente et al. 2002; Garcia-
22 Garcia et al. 2004).

23 A ausência da proteína MSP1a nos corpúsculos de *A. marginale* cultivados em
24 células IDE8 tornaram este sistema impróprio para a utilização como vacina inativada.
25 O uso da MSP1a em ensaios vacinais vem sendo bastante estudado, devido ao fato desta
26 proteína estar associada ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Palmer
27 et al. 1986,1988,1989; McGuire et al. 1994; Brown et al. 1998, 2001, 2002; de la Fuente
28 et al. 2003; Kocan et al. 2003; Silvestre et al. 2014) e a capacidade de *A. marginale* em
29 aderir aos eritrócitos bovinos, iniciando a infecção (Garcia-Garcia et al. 2004). Novos
30 estudos vêm sendo realizados visando a aumentar a taxa de candidatos vacinais (Junior
31 et al. 2010) e uma série de novos genes de proteínas da membrana externa de *A.*
32 *marginale* foram encontrados (Brayton et al. 2006; Lopez et al. 2005; Suttén et al.
33 2010). Estas proteínas localizadas ou associadas com a membrana externa de *A.*

1 *marginale* (incluindo a MSP1a) são consideradas imunógenos potenciais, uma vez que
2 estimulam mecanismos celulares responsáveis pelo controle e eliminação de *A.*
3 *marginale* (Lopez et al. 2007).

4

5 **2.7 Resposta Imune x *Anaplasma marginale***

6

7 Durante a infecção por *A. marginale* mecanismos imunológicos da resposta celular e
8 a produção de anticorpos específicos anti-*A. marginale* são ativados pelo sistema imune
9 do hospedeiro, tais como linfócitos T CD4, células B, secreção de IFN- γ e a produção
10 de IgG2. Linfócitos T CD4 são necessários para as células B realizarem a mudança de
11 isotipo para IgG de alta afinidade, que promova a opsonização da riquetsia e, por meio
12 da secreção de IFN- γ , desempenhar um papel importante na ativação de macrófagos
13 para produzir moléculas capazes de eliminar a riquetsia, tais como o óxido nítrico
14 (revisado por Kocan et al. 2003). Em bovinos, a secreção de IFN- γ por células T CD4
15 antígeno-estimuladas fornece condição ideal às células B para a produção de IgG2
16 (Estes et al. 1994; Brown et al. 1999). Os anticorpos produzidos durante a infecção pelo
17 *A. marginale* agem na neutralização da riquetsia extracelular, no processo de invasão a
18 novos eritrócitos, ou por meio da opsonização de *A. marginale* que, então, são alvos da
19 fagocitose por macrófagos (Brown 2012).

20 As MSPs de *A. marginale* são capazes de estimular a resposta imune específica nos
21 animais (Tebele et al. 1991). Durante o ciclo de desenvolvimento e multiplicação no
22 hospedeiro, *A. marginale* sofre variações antigênicas nas proteínas de superfície MSP2
23 e MSP3 (Brayton et al. 2003; Palmer & Brayton 2007) e anticorpos IgG2 específicos a
24 cada variação são produzidos (French et al. 1999). Este fato sugere que a resposta de
25 IgG2 controla novos surgimentos de variações, porém, não consegue eliminar *A.*
26 *marginale* devido ao escape contínuo da resposta imune pelas novas variantes (Brown
27 2012). Esta incapacidade para proteger bovinos contra a infecção por *A. marginale*
28 sugere que outros mecanismos também contribuam para a proteção ou que os anticorpos
29 para o domínio variante da MSP2 não conseguem evitar o surgimento de novas variantes
30 antigênicas de *A. marginale* (Brown 2012), impossibilitando o controle da infecção.
31 Abbott et al. (2005) observaram que bezerros desafiados com *A. marginale*,
32 expressando a mesma variante da MSP2 utilizada para imunização dos animais,

1 apresentaram uma rápida regulação negativa de células T CD4 MSP2-específicas antes
2 do pico de riquetsemia. Essa imunorregulação foi determinada pela perda da capacidade
3 proliferativa e secreção de células que secretam IFN- γ , detectado por testes de
4 ELISPOT. Esta resposta antígeno-específica permaneceu indetectável por um ano após
5 a infecção. Supõe-se que esta perda da resposta de células T CD4 induzidas após a
6 imunização e a falha para o estabelecimento de uma resposta forte de células T CD4 de
7 memória são resultados de uma alta carga de antígeno, levando a apoptose de células T
8 (Abbott et al. 2005; Han et al. 2008, 2010). No entanto, esta regulação negativa de
9 células T CD4⁺ poderia impedir a inflamação sistêmica prolongada no hospedeiro
10 infectado por meio da participação de células T regulatórias (Han et al. 2010).

11 Han et al. (2010) realizaram um monitoramento da resposta imune em bovinos
12 infectados com *A. marginale*, revelando uma forte resposta de IgG1 e IgG2 que flutua
13 ao longo do curso da infecção aguda e persistente, mantendo títulos de 3.000 a 100.000.
14 A resposta foi dirigida contra a proteína imunodominante e antigenicamente variável
15 MSP2, embora outras MSPs também foram detectadas em imunoblots (Palmer et al.
16 1994; Lopez et al. 2005). Em um estudo *in vitro*, anticorpos anti-MSP1 opsonizaram
17 corpúsculos de *A. marginale* proporcionando a fagocitose da riquetsia mediada por
18 macrófagos ativados (Cantor et al. 1993). A proteína MSP1a foi reconhecida por células
19 T CD4⁺ de memória em bovinos imunizados com o complexo MSP1 de *A. marginale*
20 (Brown et al. 2001), impedindo o desenvolvimento da riquetsemia após desafio
21 homólogo e heterólogo (Palmer et al. 1989). Esta proteção indica a conservação de
22 epítomos de células T entre os diferentes isolados de *A. marginale*, capazes de estimular
23 a resposta imune protetora dos animais (Brown et al. 2002).

24 Pesquisas sobre *A. marginale* em bovinos imunizados com vacinas protetoras são
25 consistentes em identificar células T CD4⁺, secreção de IFN, ativação de isotipos de
26 IgG específicos para a neutralização e opsonização como elementos determinantes da
27 imunidade protetora (Brown et al. 1998; Palmer et al. 1999; Dark et al. 2011). O
28 controle dessa resposta imune tem sido bastante estudado devido à enorme capacidade
29 do patógeno em gerar variantes antigênicos, promovendo assim a evasão da resposta
30 imune do hospedeiro.

31 Durante o curso da infecção, *A. marginale* induz uma forte resposta de células T,
32 seguido por uma eventual perda de células T CD4 *A. marginale*-específicas. Essa perda
33 da resposta de células T específicas ocorre devido à exaustão/apoptose destas células em

1 função da alta carga de antígeno observada nas infecções aguda e persistente (Brown et
2 al. 2002; Han et al. 2008). Essa imunossupressão também é relatada nas infecções por
3 *A. phagocytophilum*. No entanto, *A. phagocytophilum* induz uma imunossupressão
4 generalizada, enquanto que na infecção por *A. marginale* essa imunossupressão é
5 antígeno-específica (Abbott et al. 2005; Han et al. 2008). Os mecanismos que os
6 patógenos do gênero *Anaplasma* apresentam para impedir a ação da resposta imune
7 inata e adaptativa incluem a variação antigênica de proteínas de superfície
8 imunodominantes para evadir das respostas imunes específicas e a subversão da
9 resposta imune adaptativa. Ambos *A. marginale* e *A. phagocytophilum* não possuem
10 genes que codificam vias biossintéticas para LPS e peptidoglicano, dois importantes
11 padrões moleculares de patógenos associados e expressos pela maioria de bactérias
12 gram negativas que ativam receptores TLR e NOD (Ulevitch et al. 2004; Sorbara &
13 Philpott 2011). Assim, as ausências de LPS e peptidoglicano permitem a *A. marginale*
14 e *A. phagocytophilum* saírem do radar de sensores importantes da resposta inata.

15 Considerando a resposta elucidada durante a infecção por *A. marginale*, bem como
16 os mecanismos utilizados pela riquetsia para evadir do sistema imune do hospedeiro, a
17 identificação de antígenos considerados protetores continua sendo a principal limitação
18 para o desenvolvimento de vacinas (Ducken et al. 2015). Assim, novas estratégias são
19 necessárias para auxiliar tanto na identificação de antígenos potenciais, como também
20 na via da apresentação desse antígeno ao sistema imune, visando o estabelecimento de
21 uma resposta imune eficiente capaz de reduzir/eliminar a infecção por *A. marginale*.

23 **2.8 Nanotubos de Carbono no Desenvolvimento de Vacinas**

24
25 Nos últimos anos a nanobiotecnologia, ciência que estuda as interrelações entre
26 nanocompostos e o sistema biológico, vem apresentando um constante crescimento.
27 Considerando que o carbono é o elemento base de todas as formas de vida conhecidas
28 (Hennrich et al. 2006), os nanotubos de carbono (NTCs) têm se destacado na utilização
29 como biosensores, dispositivos eletrônicos, carreador de fármacos, dispositivos de
30 diagnóstico, transporte intracelular e intranuclear de drogas e genes, e carreadores de
31 proteínas com objetivo vacinal (Sinha & Yeow 2005; Hennrich et al. 2006).

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

6 Estas nanopartículas podem ser produzidas por meio de três técnicas diferentes:
7 descarga por arco elétrico (Iijima 1991; Sinha & Yeow 2005; Joselevick et al. 2008),
8 ablação a laser ou deposição química de vapor (Joselevich et al. 2008). Em qualquer
9 uma das técnicas utilizadas, os NTCs recém-sintetizados possuem impurezas oriundas
10 do processo de síntese, como por exemplo, partículas de metais catalíticos, carbono
11 amorfo, fuligem e fragmentos de grafite (Helland et al. 2007). Essas impurezas podem
12 ocasionar problemas de toxicidade quando NTCs são utilizados *in vivo* (Smart et al.
13 2006). Por isso, diferentes métodos de purificação são conduzidos para se obter NTCs
14 com a maior pureza possível.

15 Para a eliminação do carbono amorfo utiliza-se a etapa de oxidação com ácido
16 nítrico, que também contribui para a solubilização dos NTCs em solução aquosa (Rosca
17 et al. 2005). O desenvolvimento de protocolos de oxidação abriu a possibilidade de ligar
18 grupos funcionais às paredes laterais dos nanotubos aumentando sua solubilidade em
19 solventes orgânicos e soluções aquosas. Esta modificação fornece sítios múltiplos para
20 ligação de drogas, ácidos nucleicos, açúcares, DNA, oligonucleotídeos, peptídeos,
21 proteínas ou enzimas (Pantarotto et al. 2003a; Foldvari & Bagonluri 2008), abrindo a
22 possibilidade da utilização dos NTCs como transportadores e biosensores. No entanto,
23 várias questões fundamentais ainda continuam em aberto. Uma delas é o mecanismo
24 que regula a entrada e a internalização dos NTCs. Kam et al. (2004) propõem que os
25 SWNTs atravessam a membrana celular por endocitose, enquanto Pantarotto et al.
26 (2004) sugerem um mecanismo não endocítico que envolve a inserção e difusão dos
27 NTCs através da bicamada lipídica da membrana celular.

28 Vários esforços têm sido realizados para desenvolver um sistema inovador capaz de
29 transportar peptídeos antigênicos utilizando a nanotecnologia (Foldvari & Bagonluri
30 2008). Atualmente existem trabalhos que mostram que NTCs ligados a antígenos
31 possuem um grande potencial de gerar uma resposta imune protetora por meio da
32 produção de anticorpos neutralizantes (Pantarotto et al. 2003b; Bianco et al. 2005;

1 Yandar et al. 2008) e uma resposta celular eficiente (Pantarotto et al. 2003a; Zeinali et
2 al. 2009).

3 Um importante parâmetro a considerar é a manutenção da conformação do antígeno,
4 necessária para indução da resposta humoral com alta afinidade. Pantarotto et al.
5 (2003b) demonstraram que a funcionalização de nanotubos de carbono com peptídeos
6 antigênicos mantém o epítipo de células B conservado. No entanto, é importante que os
7 NTC incorporados não apresentem imunogenicidade intrínseca, e, por conseguinte,
8 desencadeie uma resposta imune (Foldvare & Bagonluri 2008). Em um estudo recente
9 com a proteína rMSP1a de *A. marginale*, Silvestre et al. (2014) demonstraram que a
10 conformação da rMSP1a foi mantida após funcionalização com MWNT, uma vez que
11 anticorpos IgG produzidos por camundongos após a imunização com MWNT
12 funcionalizado com rMSP1a foram dirigidos apenas para a proteína rMSP1a e nenhuma
13 resposta cruzada contra os nanotubos foi observada.

14 Outro fator importante é a solubilidade dos NTCs em sistema biológicos. Várias
15 metodologias têm sido aplicadas para aumentar a solubilidade dos NTCs por meio de
16 ligações covalentes ou não-covalentes de moléculas na sua superfície. A melhor
17 estabilidade foi alcançada por meio de ligações covalentes entre NCTs e proteínas
18 (Jiang et al. 2003), utilizando um agente acoplante intermediário que proporcionou a
19 ligação entre NTCs e a proteína alvo. Esse procedimento, denominado funcionalização,
20 permite que as moléculas aderidas sirvam como pontos de ancoragem para grupos
21 funcionais de interesse (Pompeo & Resasco 2002). Nanotubos de carbono
22 funcionalizados a proteínas são hábeis em atravessar a membrana celular, tornando esta
23 ferramenta um vetor potencial para o transporte de diversos antígenos (Pantarotto et al.
24 2003a, 2004; Kam et al. 2004).

25

26 **2.9 Toxicidade dos nanotubos de carbono**

27

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

1 Um dos primeiros estudos que investigaram a toxicidade de NTCs foi publicado em
2 2003 por Shvedova et al., que investigaram a citotoxicidade de SWNTs brutos (não-
3 funcionalizados) em queratinócitos epidérmicos humanos. Seus resultados mostraram
4 que a exposição aos SWNTs resultou em stress oxidativo acelerado, indicado pela
5 formação de radicais livres e de acúmulo de produtos peroxidativos, esgotamento total
6 de reservas de antioxidantes, e uma perda de viabilidade celular. A preparação dos
7 NTCs possuía grande proporção de metal catalisador (ferro e níquel), o que contribuiu
8 significativamente para o stress oxidativo e diminuição da viabilidade celular.

9 Estudos subsequentes utilizando NTCs mais purificados, porém, ainda no estado
10 bruto, também indicaram toxicidade celular, resultando em apoptose e necrose das
11 células (Ding et al. 2005; Manna et al. 2005). Magrez et al. (2006) e Tian et al. (2006)
12 também mostraram que outros materiais baseados em carbono, tais como as
13 nanopartículas de carbono, nanofibras de carbono, fuligem e carbono ativo, parecem ser
14 mais tóxico para as células do que MWNTs. Entre os tipos de nanotubos de carbono os
15 SWNTs parecem ser mais tóxicos do que os MWNTs.

16 *In vivo*, algumas evidências indicam toxicidade relativamente leve dos nanotubos de
17 carbono via oral, dérmica e sistêmica (Sato et al. 2005). Trabalhos realizados através da
18 administração intravenosa de SWNT demonstraram que estes compostos são
19 rapidamente eliminados da corrente sanguínea através de excreção renal, sem apresentar
20 efeito patogênico evidente (Singh et al. 2006). A toxicidade pulmonar por inalação é
21 uma preocupação, uma vez que partículas nanométricas são consideradas mais tóxicas
22 do que partículas de tamanho maior. Porém, informações atuais sobre a toxicidade dos
23 NTCs neste órgão parecem contraditórias (Warheit et al. 2004; Foldvare & Bagonluri
24 2008). Todas estas controvérsias podem estar relacionadas as características dos NTCs
25 utilizados, técnicas de síntese e nível de purificação no qual NTCs foram submetidos
26 antes da exposição aos animais.

27 Considerando que os efeitos tóxicos induzidos pelos NTCs em sistemas *in vivo*
28 permanecem desconhecidos, novos estudos devem ser realizados visando a avaliação da
29 toxicidade induzida após o uso desta ferramenta como sistema carreador de antígenos
30 em ensaios vacinais. Tais estudos *in vivo* são importantes, uma vez que a utilização de
31 NTCs como moléculas carreadora vem apresentando resultados animadores quanto a
32 indução de uma resposta imune mais eficiente do que o antígeno livre (Pantarotto et al.
33 2003a; Zeinali et al. 2009; Silvestre et al. 2014).

II – JUSTIFICATIVA

1 **2. JUSTIFICATIVA**

2

3 Vacinas inativadas de *A. marginale* têm sido desenvolvidas para proteger os animais
4 adultos da doença clínica. No entanto, as vacinas inativadas produzidas a partir do
5 sangue de animais infectados foram retiradas do mercado devido aos casos de
6 isoeritrólise neonatal ocasionada pela contaminação da vacina com o estroma dos
7 eritrócitos, além do alto risco de transmissão de outros patógenos (Kocan et al. 2003;
8 Garcia-Garcia et al. 2004). Como alternativa, vacinas inativadas provenientes de células
9 IDE8 foram utilizadas em ensaios vacinais com bovinos. No entanto, tais vacinas
10 fracassaram em proteger da doença clínica animais imunizados com este antígeno
11 devido a ausência da expressão da proteína MSP1 α , considerada importante para a
12 indução de uma resposta imune protetora (Garcia-Garcia et al. 2004; Lasmar et al.
13 2012). Apesar de inúmeros esforços, atualmente não há uma vacina inativada,
14 comercialmente disponível, capaz de proteger animais adultos das manifestações da
15 anaplasrose bovina. Por conseguinte, alternativas são necessárias visando o
16 desenvolvimento de uma nova geração de vacinas, capazes de proteger os animais
17 adultos da doença clínica.

18 Sequenciamento genômico e as ferramentas de bioinformática têm fornecido um
19 conjunto abrangente de proteínas de superfície e alvos potenciais para o
20 desenvolvimento de vacinas, tais como a MSP1 α . Estudos recentes utilizando a MSP1 α
21 recombinante (rMSP1 α) em ensaios vacinais apresentaram resultados promissores na
22 indução de resposta humoral e celular em bovinos e animais de laboratório (Santos et al.
23 2013; Silvestre et al. 2014; Torina et al. 2014). Entretanto, ensaios de imunização com
24 proteínas recombinantes são complexos devido a muitas variáveis que podem
25 influenciar o resultado, tais como o adjuvante, o tamanho da partícula do antígeno, uma
26 potencial perda da estrutura imunogênica da proteína, a via de imunização e a via/dose
27 do desafio (Noh et al. 2013).

28 Sabe-se que proteínas exógenas, quando administradas isoladamente no organismo,
29 podem ser rapidamente eliminadas ou degradadas, apresentarem baixa biodistribuição e
30 solubilidade, além da possibilidade de sofrerem mudanças conformacionais indesejadas
31 (Bianco et al. 2005; Klumpp et al. 2006). A utilização de sistemas carreadores, capazes

1 de transportar o peptídeo na concentração e local desejado, seria uma alternativa para
2 aumentar a eficiência da distribuição e a apresentação do antígeno ao sistema imune
3 (Foldvare & Bagonluri 2008). Recentemente, nanotubos de carbono de paredes
4 múltiplas (MWNT) foram utilizados como molécula carreadora da rMSP1a do isolado
5 UFMG2 de *A. marginale* (Silvestre et al. 2014). Nesse trabalho, camundongos Balb/c
6 imunizados com rMSP1a funcionalizada covalentemente aos MWNTs
7 (MWNT+rMSP1a) produziram resposta celular e humoral significativa se comparado
8 com camundongos que receberam apenas a rMSP1a, gerando assim uma nova
9 possibilidade para a utilização deste imunógeno como componente da vacina inativada
10 para bovinos. Logo, foi proposto no presente trabalho avaliar os parâmetros
11 imunológicos, clínicos e a proteção induzida após o desafio experimental de bezerros
12 previamente imunizados com MWNT+rMSP1a associado com a vacina inativada de *A.*
13 *marginale* produzida *in vitro*.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

III – OBJETIVO GERAL

3. OBJETIVO GERAL

2

3 Avaliar o efeito da imunização de bezerros com a rMSP1a funcionalizada à MWNT,
4 associado com a vacina inativada de *A. marginale* produzida *in vitro*, na indução da
5 resposta imunológica, no controle da riquetsemia e no desenvolvimento da doença
6 clínica após desafio experimental com amostra heteróloga *A. marginale* UFMG1.

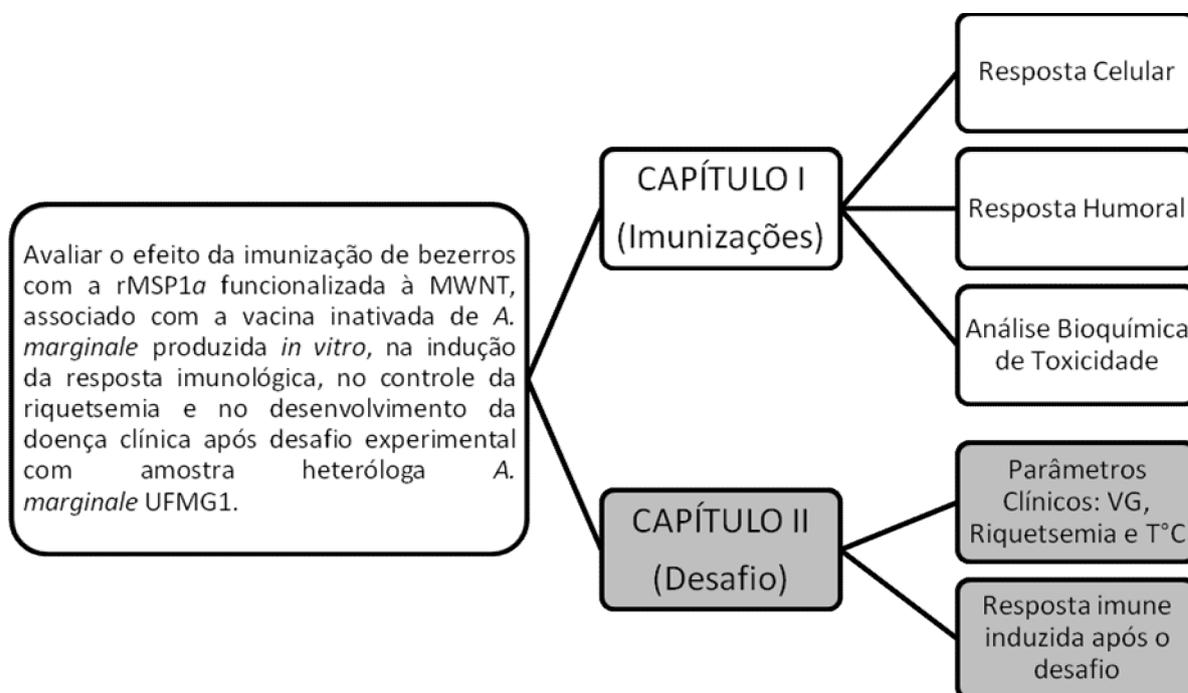
7

8

3.1 Divisão do Trabalho

10

11 O presente estudo foi dividido em dois Capítulos (Capítulo I e II), conforme
12 demonstrado na Figura 1.



13

14

15 **Figura 1** - Fluxograma representativo da divisão do trabalho.

16

IV – CAPÍTULO I

1 **4. CAPÍTULO I - OBJETIVOS**

2

3 **4.1 Objetivo Geral**

4

5 Avaliar a resposta humoral e celular de bezerros imunizados com a rMSP1a
6 funcionalizada à MWNT, associada com a vacina inativada de *A. marginale* produzida
7 *in vitro*.

8

9 **4.2 Objetivos Específicos**

10

11 1) Avaliar o perfil fenotípico dos linfócitos circulantes em bezerros imunizados
12 com MWNT+rMSP1a, associado com a vacina inativada de *A. marginale*
13 produzida *in vitro*, e seus respectivos controles;

14

15 2) Avaliar a cinética de produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 reativos a
16 rMSP1a e ao antígeno bruto de *A. marginale*, em bovinos imunizados com
17 com MWNT+rMSP1a associado com a vacina inativada de *A. marginale*
18 produzida *in vitro*, e seus respectivos controles;

19

20 3) Avaliar os efeitos da vacinação com MWNT sobre a função renal e hepática
21 dos animais imunizados.

1 **5. MATERIAL E MÉTODOS**

2

3 **5.1 Locais dos experimentos**

4

5 A fase experimental foi realizada nas instalações da Clínica de Ruminantes do
6 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária – UFMG. As
7 análises laboratoriais e a produção dos imunógenos foram realizadas no Laboratório de
8 Protozoologia Veterinária e no Laboratório de Parasitologia Molecular do
9 Departamento de Parasitologia do ICB – UFMG. As análises de marcação *ex vivo* foram
10 realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro
11 de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas.

12

13 **5.2 Produção da vacina inativada de *A. marginale* UFMG2 (AmUFMG2)**

14

15 A produção do antígeno bruto de *A. marginale* foi realizada por meio do cultivo *in*
16 *vitro* do isolado UFMG2 de *A. marginale* em células IDE8, denominado vacina
17 AmUFMG2 (Bastos et al. 2009). O isolado UFMG2 de *A. marginale* induz alta
18 morbidade e mortalidade de animais susceptíveis (Bastos et al. 2010), sendo
19 considerado de alta virulência.

20 Os corpúsculos iniciais de *A. marginale* produzidos neste sistema *in vitro* foram
21 purificados segundo Lasmar et al. (2012) e, posteriormente, submetidos a cinco ciclos
22 de sonicação de 30 segundos cada (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole Parmer[®]), com
23 30% de amplitude, em banho de gelo. Um coquetel inibidor de proteases (P8465,
24 Sigma-Aldrich[®]) foi adicionado aos corpúsculos antes do processo de sonicação, com
25 objetivo de inibir a degradação do antígeno. Após a ruptura dos corpúsculos uma
26 alíquota do material foi utilizada para quantificação das proteínas, utilizando o método
27 de Bradford (1976), e o restante do material armazenado em freezer -20°C até o
28 momento da imunização.

29

30

1 **5.3 Produção da ferramenta MWNT+rMSP1a**

2
3 O fragmento recombinante da MSP1a utilizado neste trabalho pertence ao isolado
4 UFMG2 de *A. marginale* (GenBank EU676175.1) e representa a região N-terminal da
5 proteína. As etapas de expressão e purificação da rMSP1a foram realizadas segundo
6 Silvestre et al. (2014). Para isso, a sequência nucleotídica da rMSP1a (340 pb, 113 aa,
7 11.61 MW) foi clonada em vetor de expressão *pJexpress414* (DNA2.0[®] MenloPark,
8 USA), expressa em bactérias *Escherichia coli* BL21 e purificada por meio de
9 cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando colunas de Níquel Sepharose High
10 Performance *HisTrap* HP[®] (GE Healthcare, UK).

11 Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) foram sintetizados utilizando a
12 técnica de descarga por arco elétrico, no Laboratório de Crescimento de Cristais do
13 Departamento de Física, ICEX/UFMG, apresentando 500 nm de comprimento por 40
14 nm de diâmetro. Após a solubilização em ácido nítrico (HNO₃) (Rosca et al. 2005), os
15 MWNTs foram funcionalizados à rMSP1a, na proporção de 1:3 (Silvestre et al. 2014).
16 Esta etapa de funcionalização consiste na ligação covalente entre os radicais
17 carboxílicos presentes na superfície dos MWNTs e os radicais amínicos da proteína, por
18 meio da reação de amidação ativada por diimida (Jiang et al. 2003). A ferramenta
19 MWNT+rMSP1a foi produzida no dia anterior a cada imunização e armazenada à 4°C
20 até o momento do uso.

22 **5.4 Animais experimentais**

23
24 Foram utilizados 24 bezerros machos da raça holandesa, com idade entre 120 a 130
25 dias, livres da infecção por *A. marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* (confirmados por
26 meio da nPCR), provenientes de uma fazenda de gado leiteiro localizada no município
27 de Inhaúma-MG (19° 29' 27" Sul e 44° 23' 24" Oeste). Para determinar a ausência de
28 infecção por estes hemoparasitos, amostras de sangue total coletadas ao longo das
29 imunizações foram utilizadas para extração de DNA (kit Wizard Genomic DNA
30 Purification, Promega[®]) e, posteriormente, submetidas a testes moleculares de nested
31 PCR (nPCR), segundo Silveira et al. (2013).

Os animais receberam colostro após o nascimento e foram mantidos em sistema de confinamento do tipo *tie stall*, em galpão telado. A fim de mantê-los livres de carrapatos e oscaras hematófagas os animais foram pulverizados semanalmente com cipermetrina (Flytick®, Vallée). Durante o período experimental (dezembro/2014 a julho/2014) os animais foram alimentados com leite em pó (Itambé® Food Service, MG, Brasil), ração comercial e água *ad libitum*. Os procedimentos realizados durante o período experimental foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMG, sob o número de protocolo 351/2013.

5.5 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de seis animais e submetidos a três imunizações (volume final de 2 ml), via subcutânea, nos dias 0 (zero), 21 e 42 do experimento, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo de imunização dos bezerros

GRUPO	DOSE
G1	PBS + MWNT não-carboxilados + Adjuvante Emulsigen® (grupo Controle)
G2	Vacina AmUFMG2 produzida <i>in vitro</i> (400 µg/animal) + Adjuvante Emulsigen®
G3	MWNT+rMSP1a (200 µg/animal) + Adjuvante Emulsigen®
G4	Vacina AmUFMG2 produzida <i>in vitro</i> (400 µg/animal) + MWNT+rMSP1a (200 µg/animal) + Adjuvante Emulsigen®

1 As imunizações dos bezerros com as diferentes formulações da vacina foram
2 emulsionadas em adjuvante oleoso Emulsigen[®] (MVP Technologies, EUA). De acordo
3 com Hiszczynska-Sawicka et al. (2010), esse adjuvante é capaz de estimular a resposta
4 imune de forma mais rápida no início da imunização, quando comparado com
5 adjuvantes convencionais.

7 **5.6 Monitoramento dos animais**

8
9 Durante o período experimental os bezerros foram avaliados e monitorados
10 diariamente por um médico veterinário, por meio de exame clínico. Amostras de sangue
11 foram coletadas através de punção da veia jugular, em tubos com EDTA e sem
12 anticoagulante, nos dias 0 (pré-imunização), 21, 42 e 63. As amostras coletadas foram
13 utilizadas para a avaliação da resposta celular e humoral, contagem global de leucócitos
14 e para análise bioquímica de toxicidade (Figura 2).



15
16 **Figura 2** – Fluxograma das coletas de sangue

18 **5.7 Imunofenotipagem de linfócitos periféricos**

19
20 Alíquotas de 40 µl de sangue total, coletados nos dias 0, 42 e 63, foram
21 transferidos para tubos de poliestireno de 5 ml e incubados com anticorpos monoclonais
22 anti-CD4 bovino-específicos (clone CC8, FITC, diluição 1:10), anti-CD8 (clone CC63,
23 FITC, 1:10), anti-CD21 (clone CC21, FITC, 1:5 - células B, Naessens et al., 1990).
24 Também foram utilizados anticorpos anti-CD335 (clone AKS1, PE, 1:10 - células NK,
25 Storset et al., 2004), e anti-CD25 (clone IL-A111, FITC, 1:10 - linfócitos T ativados,
26 Maślanka & Jaroszewski 2012), todos adquiridos na AbD Serotec[®] (Bio-Rad, EUA).
27 As células e os anticorpos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente e
28 protegidos da luz. Após o período de incubação, 2 ml de solução de lise eritrocitária

1 (FACS™ Lysing Solution) foram adicionados e as amostras incubadas por 10 minutos à
2 temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 600g, 18°C por
3 sete minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 2 ml
4 de PBS 1x e novamente centrifugadas a 600g, 18°C por sete minutos. O sobrenadante
5 foi desprezado e as células fixadas com 250 µl de solução fixadora para citometria –
6 Max Fax Fix (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto
7 de sódio, pH 7,2). As células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACScan (Becton
8 Dickinson, EUA), a população de linfócitos foi selecionada e 30.000 eventos foram
9 analisados. A análise fenotípica foi realizada utilizando o software FlowJo 7.6.1 (Tree
10 Star, EUA).

11 Os valores celulares absolutos foram gerados a partir dos percentuais obtidos na
12 citometria de fluxo e combinados com os dados de leucograma obtidos de cada animal.
13 A contagem global de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, usando o fluido
14 de Thomas como diluente, e expresso em nº de células/µl de sangue (Benesi et al.
15 2012).

16

17 **5.8 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2**

18

19 A análise de anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2 anti-rMSP1a e anti-*A.*
20 *marginale* foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), como
21 descrito por Silvestre et al. (2014). A proteína rMSP1a e o extrato solúvel de *A.*
22 *marginale* UFMG2 produzido *in vitro* (AmUFMG2), utilizados para a imunização dos
23 animais, foram empregados como antígenos da reação.

24 Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc MaxiSorp®) foram sensibilizadas com
25 0.1 µg/poço (IgG) ou 0.5 µg/poço (IgG1/IgG2) do antígeno rMSP1a ou AmUFMG2,
26 diluído em tampão carbonato (0.05 M NaHCO₃, pH 9.6), a 4°C por 18 horas. Após a
27 etapa de sensibilização, a placa foi lavada três vezes com PBST (tampão fosfato - PBS
28 1x + Tween20 0.05%), e incubada com 100 µl/poço da solução de bloqueio (PBS + 2%
29 caseína), por duas horas a 25°C. A placa foi novamente lavada com PBST e, em
30 seguida, amostras de plasma de bovinos obtidas nos dias 0, 21, 42 e 63 foram diluídas
31 1:2000 (IgG) ou 1:400 (IgG1/IgG2) em PBST 0.25% caseína, e incubadas a 25°C por 1
32 hora (100 µl/poço). Após nova etapa de lavagem, anticorpo anti-imunoglobulina bovina

1 conjugado com peroxidase foram diluídos 1:40000 (IgG, Sigma[®]) ou 1:2000 (IgG1,
2 BioRad[®]; IgG2, Sigma[®]) em PBST 0.25% caseína e incubados por 1 hora à 25°C, ao
3 abrigo da luz (100 µl/poço). Em seguida, a placa foi lavada com PBST e incubada com
4 100 µl/poço do substrato enzimático TMB (Tetrametilbenzidina, BD OptEIA[™]) por 15
5 minutos à 25°C. A reação foi interrompida com a adição de 100 µl/poço de ácido
6 sulfúrico 2M (H₂SO₄). A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas
7 com filtro de 450 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek[®]) e os valores de
8 absorvância obtidos foram analisados e plotados em gráficos de barras.

9

10 **5.9 Parâmetros bioquímicos**

11

12 Alíquotas de plasma e soro, obtidas nos dias 0, 21, 42 e 63 foram utilizadas para a
13 avaliação das funções hepática e renal dos animais, com o objetivo de verificar se o uso
14 de nanotubos de carbono em ensaios vacinais tem efeitos nocivos à saúde do animal. Os
15 testes bioquímicos realizados incluíram glicose, creatinina, albumina, fosfatase alcalina
16 (ALP), proteína total, gama glutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT)
17 e aspartato aminotransferase (AST). A dosagem dos parâmetros bioquímicos foi
18 realizada em aparelho Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems[®]), pelo método
19 colorimétrico enzimático, utilizando reagentes do kit Kovalent (Biosys[®], Brazil),
20 seguindo as informações do fabricante.

21

22 **5.10 Análise estatística**

23 Os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors para a determinação da
24 normalidade das amostras. A análise estatística foi realizada utilizando o software
25 InfoStat (versão 2014). Considerando a natureza não paramétrica dos dados, as análises
26 entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. O teste de Friedman foi
27 realizado para avaliar a existência de diferenças entres os pontos de tempo dentro de
28 cada grupo (Sampaio 2010). As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente
29 significativas para valor de $p < 0.05$. Para a detecção de possíveis outliers, os dados
30 foram submetidos ao teste *Graphpad QuickCalcs Outlier Calculator*
31 (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

1 **5.11 Metodologia de Apresentação**

2

3 A metodologia utilizada para a apresentação dos Resultados referente ao Capítulo I,
4 assim como a Discussão e a Conclusão dos dados obtidos, será apresentada por meio de
5 um artigo científico disposto na seção “Resultados”.

6

1 **6. RESULTADOS**

2
3 Status = Artigo submetido à Veterinary Microbiology

4
5
6 **Multi-walled carbon nanotubes functionalized the rMSP1a of *Anaplasma***
7 ***marginale* induces an increase in the cellular and humoral response in calves**
8 **immunized, without generating hepatic and renal toxicity.**

9
10
11 Bruna T. Silvestre^a, Júlia A.G. Silveira^a, Elias J. Facury-Filho^b, Antônio U. Carvalho^b,
12 Alice F. Versiani^c, Letícia G.T.M. Estevam^a, Márcio S.S. Araújo^d, Olindo A. Martins-
13 Filho^d, Deborah A. Negrão-Corrêa^a, Múcio F.B. Ribeiro^{a,*}.

14
15
16 ^a Department of Parasitology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
17 Minas Gerais, Brazil

18 ^b Department of Clinical and Veterinary Surgery, Universidade Federal de Minas
19 Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

20 ^c Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
21 Minas Gerais, Brazil

22 ^d Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas
23 René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

24
25
26
27
28
29
30 * Corresponding author. Address: Departamento de Parasitologia, ICB – UFMG, Minas
31 Gerais, Brasil Tel.: +55 31 34092842; Fax: +55-31-34092970. E-mail address:
32 muciofbr@gmail.com (M.F.B. Ribeiro)

1 **ABSTRACT**

2

3 Vaccination against *Anaplasma marginale* has been considered an important control
4 strategy of bovine anaplasmosis. Inactivated vaccine produced *in vitro* failed due to
5 absence of the MSP1a expression in the cultured rickettsia. Recently, mice immunized
6 with rMSP1a, linked to carbon nanotubes (MWNT), showed significant immune
7 responses, generating a new possibility for use of inactivated vaccine in cattle. The
8 objective of this study was to investigate the cellular and humoral responses in calves
9 immunized with MWNT+rMSP1a, associated with inactivated vaccine of *A. marginale*
10 produced *in vitro*, and evaluate the toxic effects of the vaccinations with MWNT in the
11 renal and hepatic function. rMSP1a was covalently linked to MWNT. Inactivated
12 vaccine (AmUFMG2) was produced by cultivating *A. marginale* in IDE8 cells. Twenty
13 four holstein calves were divided into four groups and immunized subcutaneously with:
14 PBS and non-carboxylated MWNTs (control, G1), AmUFMG2 (G2), MWNT+rMSP1a
15 (G3), and AmUFMG2 with MWNT+rMSP1a (G4). Blood samples were collected for
16 total leukocyte counts, biochemical profile and evaluation of the humoral and cellular
17 response. Immunization of calves with MWNT+rMSP1a induced an increase in the
18 total leukocyte, in the number of circulating NK cells and in the lymphocyte
19 populations (CD4⁺, CD8⁺, B cells and activated T lymphocytes). Calves immunized
20 with MWNT+rMSP1a showed higher levels of IgG, IgG1 and IgG2 antibodies
21 compared to calves immunized only with AmUFMG2. Furthermore, the immunization
22 with MWNT did not induce changes in the biochemical profile of calves immunized.
23 These data indicates that immunization with MWNT+rMSP1a was able to induce the
24 cellular and humoral responses more efficiently than AmUFMG2, without generate
25 toxicity.

26

27 **Keywords:** *Anaplasma marginale*; MSP1a; inactivated vaccine; carbon nanotubes

28

1 **1. Introduction**

2
3 *Anaplasma marginale* is an obligate intraerythrocytic rickettsia
4 (Rickettsiales:Anaplasmataceae) that affects cattle in the tropical and subtropical
5 regions causing severe global economic losses (Kocan et al., 2010). Various strategies
6 have been tried in order to develop a vaccine to reduce the impact of bovine
7 anaplasmosis (Aubry and Geale, 2011).

8 Inoculation of blood containing a live and less virulent strain of *A. centrale* is the
9 vaccine of choice in many parts of the world (Kocan et al., 2003). Disadvantages
10 include the restricted use in young animals and the high risk of transmitting other blood-
11 borne organisms (Rodríguez et al., 2000). Moreover, reported outbreaks indicated that it
12 confers only partial protection against virulent strains of *A. marginale* (Bell-Sakyi et al.,
13 2015).

14 Inactivated vaccines from *A. marginale* were developed to protect adult bovine
15 against clinical disease. However, they were withdrawn due to the difficulty in
16 purifying rickettsia, maintenance of *A. marginale*-free calves for antigen production, the
17 frequent booster applications and the production of isoantibodies in newborn calves of
18 vaccinated dams (Kocan et al., 2000; Rodríguez et al., 2000). Establishment of *A.*
19 *marginale* growth in embryonic cells from the *Ixodes scapularis* tick (IDE8) was
20 considered a promising alternative in the production of inactivated vaccine. However,
21 this vaccine failed to fully protect adult cattle from clinical disease (Garcia-Garcia et al.,
22 2004; Lasmar et al., 2012). One possible reason for the failure could be related to the
23 absence of the *Major Surface Protein 1a* (MSP1a) expression in this system, due to
24 down-regulation of the *mSP1a* gene in *A. marginale* derived from cultured tick cells
25 (Garcia-Garcia et al., 2004). Therefore, efforts towards the development of a new
26 generation of vaccines are warranted to protect adult animals from the clinical disease.

27 Genomic sequencing and bioinformatics tools have provided a comprehensive
28 set of surface proteins of *A. marginale* and therefore potential targets for vaccine
29 development. Among them, MSP1a plays an important role in the infection by *A.*
30 *marginale*, being associated with the adhesion capacity of rickettsia to the bovine
31 erythrocytes and tick cells (Garcia-Garcia et al., 2004) and it has been shown to trigger
32 protective immune response (Brown et al., 1998, 2001). Recent studies using

1 recombinant MSP1a (rMSP1a) in immunization trials of cattle and laboratory animal
2 models demonstrated induction of the humoral and cellular immune responses
3 associated with the upregulation of pro-inflammatory cytokines (Santos et al., 2013;
4 Silvestre et al., 2014), suggesting the possibility of its usage in immunization protocols.

5 Immunization experiments with recombinant proteins are complex due to the
6 many variables that may influence the result, such as the particulate size of the antigen,
7 a potential lack of immunogenic structure of the protein and the route/dose of challenge
8 (Noh et al., 2013). Carrier systems are an alternative way to increase the efficiency of
9 distribution and the presentation of the antigen to the immune system; among them,
10 carbon nanotubes have been widely used as novel delivery agents for drugs, antigens
11 and genes (Foldvari and Bagonluri, 2008; Bianco et al., 2011). Recently, we used multi-
12 walled carbon nanotubes (MWNT) as a carrier molecule for the rMSP1a from *A.*
13 *marginale* strain UFMG2 and found that mice produced a significant humoral and
14 cellular response (Silvestre et al., 2014). Thus, the aim of the present study was to
15 investigate the cellular and humoral responses elicited in calves immunized with
16 rMSP1a, using MWNT as carrier molecule, associated with the inactivated vaccine of
17 *A. marginale* produced *in vitro*. In addition, were evaluated the toxic effects of the
18 vaccinations with MWNT on the renal and hepatic function.

20 **2. Materials and methods**

22 2.1 Production of multi-walled carbon nanotubes functionalized to the rMSP1a 23 (MWNT+rMSP1a)

25 The rMSP1a used in this study comprises the N-terminal repeat of the protein
26 and belongs to *A. marginale* strain UFMG2 (GenBank EU676175.1). Expression and
27 purification steps of the rMSP1a were performed as described (Silvestre et al., 2014).

28 MWNTs (500nm long and 40nm diameter) were solubilized in nitric acid
29 (HNO₃) (Rosca et al., 2005) and the rMSP1a immobilization on MWNTs was
30 performed at a 1:3 ratio (v/v) (Silvestre et al., 2014). The MWNT+rMSP1a was
31 produced one day before immunization and stored at 4°C.

1 2.2 Inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*

2
3 The production of crude antigen was carried out by cultivating *A. marginale*
4 (UFMG2) in IDE8 cells (Bastos et al., 2009). Initial bodies produced *in vitro* were
5 purified (Lasmar et al., 2012), thereafter the sample was sonicated (Ultrasonic
6 Homogenizer 4710, Cole Parmer®), an aliquot used for protein quantification (Bradford,
7 1976) and the remaining sample stored at -20°C.

8
9 2.3 Experimental animals and immunization

10
11 Twenty four holstein calves, 120-130 days of age, free of *A. marginale*, *Babesia*
12 *bovis* and *B. bigemina* (confirmed by nPCR), were kept in a *tie stall* barn and fed with
13 powdered
14 milk, commercial feed and water *ad libitum*. Calves were kept free of ticks and biting
15 flies by weekly applications of cypermethrin (Flytick®, Vallée).

16 Calves were randomly divided into four groups with six animals. Calves from
17 the first group (G1 - control group) were immunized with PBS and non-carboxylated
18 MWNTs (66 µg/calf); calves from group 2 (G2) were immunized with inactivated
19 vaccine of *A. marginale* produced *in vitro* (400 µg/calf); animals from the group 3 (G3)
20 were immunized with MWNT+rMSP1a (200 µg/calf); and group 4 (G4) were
21 immunized with inactivated vaccine produced *in vitro* (400 µg/calf) and
22 MWNT+rMSP1a (200 µg/calf). The inoculations were emulsified in oil adjuvant
23 (Emulsigen®, USA) and administered subcutaneously at days 0, 21 and 42.

24 Throughout the experimental period, all calves were evaluated and monitored
25 daily by clinical examination, including body temperature, heart and respiratory rates
26 and possible adverse reactions in the site of the inoculation. Blood samples were
27 collected in EDTA tubes on days 0 (pre immunization), 42 and 63 for evaluation of the
28 cellular response, and on days 0, 21, 42 e 63 for total leukocyte counts, biochemical
29 profile, and humoral response. Absence of infection by *A. marginale* was confirmed by
30 nPCR (Silveira et al., 2013). All experimental procedures were approved by the Ethics
31 Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais (CEUA/UFMG,
32 n° protocol 351/2013).

1 2.4 Immunophenotyping of peripheral lymphocytes

2
3 The blood were collected on days 0, 42 and 63 in tube (4 ml, EDTA), and after 2
4 to 3 hours the Immunophenotyping protocol was performed as follows: aliquots of 40 μ l
5 of whole blood were incubated with the following monoclonal bovine-specific
6 antibodies: anti-CD4 (clone CC8, 1:10 dilution), anti-CD8 (clone CC63, 1:10), anti-
7 CD21 (clone CC21, 1:5 - B cells, Naessens et al., 1990) associated with anti-CD335
8 (clone AKS1, 1:10 - bovine natural killer cells, Storset et al., 2004), or anti-CD25 (clone
9 IL-A111, 1:10 - activated T lymphocytes, Maślanka and Jaroszewski 2012) and isotype
10 control (Mouse IgG2a, 1:10 - Negative Control Antibody, MCA929F) conjugated with
11 FITC (fluorescein isothiocyanate) or PE (phycoerythrin), purchased from AbD
12 Serotec® (Bio-Rad, USA). Phenotypic labeling of leukocytes was performed as
13 described (Dorneles et al., 2015). The cells were collected by FACScan flow cytometry
14 (Becton Dickinson, USA) with gate selection for the lymphocyte population, and
15 acquisition of 30.000 events. Phenotypic analysis was performed using the FlowJo 7.6.1
16 software (Tree Star, USA). In order to be converted into absolute values, percentage
17 data obtained by cytometry were combined with leukogram data from each animal.
18 Leukocyte counts were performed in a Neubauer chamber, using Thomas fluid as the
19 diluent, and expressed in thousands of cell/ μ l of blood (Benesi et al., 2012).

20
21 2.5 Evaluation of IgG, IgG1 and IgG2 antibodies levels

22
23 Evaluation of anti-rMSP1a and anti-*A. marginale* IgG, IgG1 and IgG2 antibodies
24 was performed by ELISA test, as described (Silvestre et al., 2014). The rMSP1a protein
25 and the antigen of *A. marginale* UFMG2 produced *in vitro* used for immunization of
26 calves were also utilized as antigens for the assay (0.1 μ g/well - IgG or 0.5 μ g/well -
27 IgG1/IgG2).

28 Plasma samples (100 μ l/well) obtained at days 0, 21, 42 and 63 were diluted
29 1:2000 (IgG) or 1:400 (IgG1 and IgG2). Horseradish peroxidase-conjugated antibodies
30 anti-bovine were diluted 1:40000 (IgG, Sigma®) or 1:2000 (IgG1, BioRad®; IgG2,
31 Sigma®). The OD₄₅₀ was measured in a microplate reader (Epoch Microplate
32 Spectrophotometer, Biotek®) and the data obtained were plotted in bar graphs.

1 2.6 Biochemical profile

2
3 Plasma and serum samples obtained on days 0 (pre immunization), 21, 42 and 63
4 were used for evaluate the renal and hepatic function of the calves in order to verify the
5 impact of the immunization with carbon nanotubes on animal health. Serological
6 biochemical parameters including glucose, creatinine, albumin, alkaline phosphatase
7 (ALP), total protein, gamma-glutamyl transferase (GGT), alanine transaminase (ALT)
8 and aspartate transaminase (AST) were evaluated using Cobas Mira Plus (Roche
9 Diagnostic Systems[®]) and diagnostic kits manufactured by Kovalent (Biosys[®], Brazil),
10 following the manufacturer's information.

11
12 2.7 Statistical analysis

13
14 Lilliefors test was used to determine the normality of the data. For analyzes among
15 groups at each time point we used the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test.
16 Friedman test was performed to assess the existence of differences between the time
17 points in each group (Sampaio, 2010). Statistical analysis was performed using the
18 software InfoStat[®] (version 2008) and median values were considered statistically
19 significant at P-value < 0.05. For detection of possible outliers, the data were submitted
20 to the *Graphpad QuickCalcs Outlier Calculator*
21 (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

22
23 **3. Results**

24
25 3.1 Immunization of calves with MWNT+rMSP1 α induced an increase of the cellular
26 response

27
28 Our data showed that calves from the control group (G1) presented no change in
29 the total number of circulating leukocytes during the experiment (Fig.1). In contrast, on
30 day 42, calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* associated with
31 MWNT+rMSP1 α (G4) showed significantly higher values of leucocytes compared to
32 G1, G2 and G3 groups (p<0.05). In the same period (day 42), calves from G2,

1 immunized only with inactivated vaccine of *A. marginale*, showed significant decrease
2 of these cells compared to values obtained on day 21 of the same group. After third
3 immunization (day 63), the total leukocyte counts of the G2, G3 and G4 were
4 considered statistically higher compared to the control group (G1) ($p<0.05$). Calves
5 from the G2 and G3 were statistically higher when compared to the G4 group at day 63
6 ($p<0.05$).

7 No significant difference was observed in the number of circulating CD335⁺
8 cells (NK cells – Fig. 2) in the G1 and G4 throughout the experiment ($p>0.05$). At day
9 42, calves from the G2 showed significant decrease of these cells in comparison to
10 values observed on day 0 ($p<0.05$). Animals immunized with MWNT+rMSP1 α (G3)
11 had a significant increase in the number of circulating CD335⁺ cells at day 63 in
12 comparison to day 0 of the same experimental group and this increase was considered
13 significantly higher in comparison to all the other experimental groups ($p<0.05$) (Fig.
14 2).

15 The behavior of circulating lymphocyte populations after the different
16 immunization protocols is illustrated in Fig. 3. Once again, the number of circulating
17 CD4⁺ T cells in the G1 showed no significant differences among all the evaluated days,
18 while animals from the G2 showed a significant reduction after second immunization
19 (day 42), followed by a significant increase of these cells at day 63 ($p<0.05$) (Fig. 3a).
20 At day 42, calves from the G3 and G4, which received the MWNT+rMSP1 α , showed
21 statistically higher numbers of CD4⁺ T cells when compared to the G2 ($p<0.05$). After
22 third immunization (day 63), only G3 group was considered upper to the control group
23 (G1) ($p<0.05$) (Fig. 3a).

24 Regarding the effect of different vaccination protocols on the absolute number of
25 circulating CD8⁺ T lymphocytes, calves from G1, G2 or G3 showed an increase in the
26 CD8⁺ T lymphocytes circulating at day 63 in comparison to day 0 of the same
27 experimental group ($p<0.05$) (Fig. 3b). On the other hand, the absolute number of CD8⁺
28 T cells in the calves from G4 showed no significant variations along the experiment
29 ($p>0.05$) (Fig. 3b). To determine the existence of significant differences among the
30 immunization protocols, the values obtained in each group were compared each other in
31 each point time. At day 63, calves from the G3 showed significant increase in the

1 number of CD8⁺ T lymphocytes circulating in comparison with G1, G2 and G4
2 (p<0.05).

3 No significant difference was observed in the number of circulating B cells
4 (CD21⁺ – Fig. 3c) in calves from the G1 among all time points evaluated, while animals
5 from the G2 and G3 showed a significant increase in the absolute number of B cells
6 after third immunization (day 63) in comparison to day 0 (p<0.05). In the calves from
7 the G4 this increase was observed earlier, starting from second immunization (day 42)
8 (Fig. 3c). At day 42, the number of B cells circulating observed in the G4 group was
9 superior when compared to calves from the G1 and G2 (p<0.05). On the other hand, at
10 day 63, the median values for G3 were considered statistically higher than G2 and G4
11 groups (p<0.05).

12 All the groups showed an increase in the absolute numbers of activated T
13 lymphocytes (CD25⁺) at days 42 and 63 in relation to day 0 (pre-immunization)
14 (p<0.05). Interestingly, however, only the animals that received MWNT+rMSP1a (G3)
15 showed a significant increase of this marker between the second and the third dose
16 (days 42 and 63, respectively) (p<0.05) (Fig. 3d). Furthermore, the increase in the
17 number of CD25⁺ cells observed in the calves from the G3, after third dose (day 63),
18 was considered significant when compared to the other groups (p<0.05).

19

20 3.2 MWNT+rMSP1a induced high levels of IgG, IgG1 and IgG2 antibodies

21

22 To evaluate the effect of different vaccination protocols on the levels of
23 antibodies produced, plasma samples were used to detect IgG, IgG1 and IgG2 anti-
24 rMSP1a and anti-*A. marginale*. As observed in Fig. 4, the G1 did not produce
25 antibodies against rMSP1a or the crude extract of *A. marginale* throughout the
26 experiment. Moreover, calves that received only the rMSP1a (G3) did not respond to
27 the antigen of inactivated vaccine (Fig. 4d-f) and calves that received only inactivated
28 vaccine (G2) did not recognize the rMSP1a protein (Fig. 4a-c).

29 Fig. 4a shows the median absorbance values of IgG anti-rMSP1a obtained in
30 each experimental time for each group. After the second and third immunizations (days
31 42 and 63, respectively) both G3 and G4 presented statistically higher levels of this
32 antibody compared to the animals from the G1 and G2 (p<0.05). However, at day 63 the

1 levels of IgG anti-rMSP1a found in the G3 were statistically higher than those observed
2 in the calves from the G4 ($p < 0.05$). Furthermore, we observed that levels of IgG anti-
3 rMSP1a in the calves from G4 showed no increase between second (day 42) and the
4 third immunization (day 63) as observed in the G3 (Fig. 4a).

5 In the analyses of IgG1 anti-rMSP1a, the absorbance values were statistically
6 higher in the G3 in comparison to the control group as early as 21 days after first
7 immunization, while that in G4 this increase was observed only after the second
8 immunization (day 42) ($p < 0.05$). No statistical differences were detected between the
9 G3 and G4 regarding the levels of IgG1 anti-rMSP1a at all time points analysed (Fig.
10 4b).

11 Regarding IgG2 anti-rMSP1a, calves from the G3 and G4 showed statistically
12 higher levels of this antibody from day 21 onwards in comparison to the G1 ($p < 0.05$)
13 (Fig. 4c). As expected, levels of IgG2 anti-rMSP1a in the G3 were statistically higher
14 than in the G2 from the first immunization (day 21) onwards ($p < 0.05$). In contrast,
15 calves from G4 group were considered statistically superior to G2 only on day 42 of the
16 experiment ($p < 0.05$). No statistical differences were detected regarding the levels of
17 IgG2 anti-rMSP1a between G3 and G4 at all time points.

18 The median absorbance values of IgG anti-*A. marginale* obtained from each
19 group are illustrated in Fig. 4d. From day 21, calves from the G4 showed significantly
20 higher levels of this antibody than the G1 and G3 ($p < 0.05$). Group G2 showed
21 significantly higher levels of IgG anti-*A. marginale* in comparison to the G3 at day 21
22 ($p < 0.05$). At days 42 and 63 this difference was also observed in comparison to the G1
23 ($p < 0.05$). No statistical differences were detected between G2 and G4 at all time points.

24 In the analysis of IgG1 anti-*A. marginale* we observed a significant increase of
25 this antibody from the day 21 in the G4 in comparison to animals from the G1 and G3
26 ($p < 0.05$) (Fig. 4e). In the G2, this significant increase was observed only from the day
27 42 ($p < 0.05$). Figure 4f shows that, from the day 21, the calves from the G2 and G4
28 presented levels of IgG2 anti-*A. marginale* significantly higher than G1 and G3
29 ($p < 0.05$). No statistical differences were detected regarding the levels of IgG1 and IgG2
30 anti-*A. marginale* between G2 and G4 at all time points (Fig. 4e-f).

31
32

1 3.3 MWNT did not induce changes in the biochemical profile of calves immunized

2
3 Throughout experimental period the calves no showed clinical changes and no
4 evidence of reaction was observed at the vaccination sites. In order to evaluate whether
5 the immunization of the calves with MWNT induced renal and hepatic disorders,
6 plasma and serum samples obtained after the immunizations were used for biochemical
7 profile analyses. Comparative analysis among groups demonstrated that calves that
8 received MWNT (G1, G3 and G4) did not show significant change in the biochemical
9 profile in comparison with animals from the G2 that did not receive MWNT ($p>0.05$)
10 (Table 1). In comparison to the reference values established for cattle, all groups
11 showed at day 63 higher values of albumin, total protein and GGT, including calves
12 from the G2 group (MWNT non-immunized) (Table 1).

13
14 **4. Discussion**

15
16 Development of vaccines is a powerful alternative to control *A. marginale* while
17 reducing the use of pharmaceuticals and their residues in the human food chain (Kocan
18 et al., 2003). Whereas it is already known that antigen carrier systems have the ability to
19 deliver small antigenic molecules efficiently (Foldvari and Bagonluri, 2008), here we
20 evaluate the cellular and humoral responses elicited in calves immunized with
21 MWNT+rMSP1a associated with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*,
22 as well as the toxic effects of the MWNT in the renal and hepatic function of the calves
23 immunized.

24 Immunization of calves with MWNT+rMSP1a induced changes in the cellular
25 response parameters analyzed. In the total leukocyte count, calves immunized with
26 MWNT+rMSP1a (G3 and G4) showed increase of these cells when compared with
27 calves from the control group. This increase was observed, in the G4 group, from the
28 second immunization (day 42), and in the G3 after the third dose (day 63).

29 As for the number of circulating NK cells, at day 63 calves that received only
30 MWNT+rMSP1a (G3) were higher than other experimental groups. Although animals
31 from the G4 received the same amount of MWNT+rMSP1a, they also received the
32 crude extract of *A. marginale* produced *in vitro*, which may have interfered in the

1 production of NK cells as observed in the animals from the G2, through an unknown
2 mechanism. NK cells are part of the innate immune system and provide an initial
3 defense against intracellular bacteria through IFN- γ production, before the development
4 of acquired immunity mediated by T lymphocytes (Boysen and Storset, 2009). IFN- γ
5 plays an important role in the control of *A. marginale* through the activation of
6 macrophages that eliminate the rickettsia by phagocytosis and nitric oxide production
7 (Brown, 2012). Activation of NK cells is regulated by MHC I molecules and infected
8 erythrocytes with *A. marginale* do not express MHC. However, Chen et al. (2014)
9 demonstrated that NK cells play a critical role in controlling of the intraerythrocytic
10 parasite *Plasmodium falciparum* in immune mice. Although the role of NK cells in the
11 infection by *A. marginale* is not known, the results presented here indicate that the
12 immunization with MWNT+rMSP1a can elicited an increase of NK cells population.

13 Calves immunized with MWNT+rMSP1a (G3 and G4) showed, after second
14 immunization (day 42), significantly increased in the CD4⁺ T lymphocytes population
15 in comparison to the animals immunized with inactivated vaccine alone (G2). However,
16 only G3 was considered statistically higher when compared with the control group (G1)
17 at day 63. Control of infection and induction of a protective response against *A.*
18 *marginale* have been shown to require an increase in the population of CD4⁺ T cells.
19 These cells secrete IFN- γ that activates macrophages by inducing them to produce
20 several antibacterial substances, and stimulates the production of neutralizing antibodies
21 by B cells, which are able to opsonize *A. marginale* and trigger phagocytosis of the
22 pathogen by macrophage (Brown, 2012).

23 Analysis of CD8⁺ T lymphocytes did reveal that animals receiving the
24 MWNT+rMSP1a alone (G3) showed significantly higher levels of this marker at day 63
25 in comparison to the other groups. Although the role of CD8⁺ T cells in the infection by
26 *A. marginale* is not known (Walker and Dumler, 2015), these cells feature a crucial
27 function in the control and in the elimination of infection by other rickettsias (Walker et
28 al., 2001).

29 Immunization of calves with MWNT+rMSP1a also induced a significant
30 increase on the number of B cells. After the second immunization, calves from the G4
31 showed a number of B cells higher than calves from the control group (G1) and from
32 calves that received inactivated vaccine (G2). In the calves that received only

1 MWNT+rMSP1a (G3) this increase was observed after third immunization in relation
2 the G2 and G4. Elimination of different pathogens, as such *A. marginale*, requires the
3 participation of several effector mechanisms, including activation of B cells and
4 secretion of different isotypes of antibodies. IFN- γ secreted by *A. marginale*-stimulated
5 CD4⁺ T cells is the main molecular propellant to induce B cells to undergo the heavy
6 chain switching process that promotes the production of IgG2 (Estes et al., 1994; Kocan
7 et al., 2003). IgG2 produced during infection neutralizes the process of erythrocyte
8 invasion or opsonizes rickettsia to be targeted to phagocytosis by macrophages (Brown,
9 2012). Sequencing rMSP1a (UFMG2) used in the immunization of calves of the current
10 study (G3 and G4) showed three linear B cell epitopes (SSSASGQQQ) (Silvestre et al.,
11 2014), suggesting that the MSP1a-UFMG2 may be able to stimulate the activation of
12 these cells and the production of IgG2 antibody.

13 Expression of CD25⁺ marker by CD4⁺ T cells and their consequent activation is
14 crucial for infection control by *A. marginale* (Kocan et al., 2003). Between the second
15 and third immunizations, calves that received only MWNT+rMSP1a (G3) showed an
16 increase on number of activated T lymphocytes (CD25⁺). Furthermore, after third
17 immunization (day 63), the number of activated T lymphocytes circulating was
18 considered significantly higher in the G3 when compared to G1, G2 and G4 groups.
19 Recently, we observed that mice immunized with MWNT+rMSP1a showed an efficient
20 adaptive immune response, through of the increase in the lymphoproliferative response
21 and high percentage of activated T lymphocytes (Silvestre et al., 2014). Taken together,
22 these data suggest that rMSP1a functionalized with MWNT was able to efficiently
23 stimulate the adaptive immune response in calves immunized with this tool.

24 Since it is already known that the protective immunity against the *A. marginale*
25 requires the activation of cell response and the involvement of neutralizing antibodies
26 (Brown, 2012), humoral response was assessed in this study. Immunization of calves
27 with MWNT+rMSP1a induced a strong antibody response of IgG, IgG1 and IgG2 anti-
28 rMSP1a. Although both G3 and G4 have received the same amount of rMSP1a during
29 immunizations, calves that received only MWNT+rMSP1a (G3) showed IgG anti-
30 rMSP1a response higher compared to animals from the G4. Despite of the G3 showed,
31 at day 63, levels of IgG1 and IgG2 anti-rMSP1a high to calves from the G4, no
32 significant difference was observed between both. The difference between G3 e G4

1 observed in the IgG-rMSP1 α antibody occurred, probably, due to maintain of the levels
2 of antibodies after second and third doses observed in the calves from the G4 group.
3 Similar levels of antibodies IgG, IgG1 and IgG2 anti-*A. marginale* were observed in
4 calves from the G2 and G4, immunized with the inactivated vaccine of *A. marginale*. In
5 cattle, the production of IgG1 is IL-4-dependent, whereas IFN- γ induces production of
6 IgG2 (Estes et al., 1994, 1995). Despite the fact that IFN- γ levels have not been
7 measured in this study, we observed that calves immunized only with MWNT+rMSP1 α
8 (G3) showed increase in the IgG2 anti-rMSP1 α levels compared with calves that
9 received inactivated vaccine.

10 The decrease in production of the IgG, IgG1 and IgG2 anti-rMSP1 α observed in
11 the calves from the G4 may be related to the presence of immunomodulatory antigens in
12 the inactivated vaccine produced *in vitro*. This immunomodulation has been reported in
13 previous studies, in which was observed that *A. marginale* induces the evasion of innate
14 and adaptive immune responses due to high loading of antigens and the presence of
15 immunomodulatory antigens (Brown, 2012; Turse et al., 2014). These results indicate
16 that the immunization of calves only with MWNT+rMSP1 α was able to induce a
17 humoral response more efficiently than in association with the crude antigen of *A.*
18 *marginale*.

19 Carbon nanotubes are promising nanomaterials with great potential in the field
20 of nanomedicine; however the investigation of the toxicity is needed to determine the
21 potential danger of exposure to nanoparticles (Bianco et al., 2011). Here we evaluate the
22 biochemical profile of calves immunized with MWNT, in order to verify possible
23 renal and hepatic disorders. No significant change in the biochemical profile was
24 observed in the calves immunized with MWNT (G1, G3 and G4) in comparison with
25 animals from the G2 group that have not received MWNT, suggesting that the
26 concentration of MWNT used in this study did not alter the analyzed parameters.
27 Changes observed in the albumin, total protein and GGT levels, observed at day 63,
28 may be associated with several factors that may influence in the increase of this
29 markers, such as the weaning, the increase of the consumption of concentrate feed,
30 dehydration, age and the establishment of an effective ruminal microbiota due to
31 adaptation to new metabolic status of the calves (Contreras, 2000; Kurz e Willett,
32 1991). Variations in the albumin, total protein and GGT levels were reported in

1 previous studies, in which no hepatic disorders signs were observed. According to
2 Bouda et al. (1980), GGT levels for cattle of up to 32,1 U/L are considered within the
3 limit of normality, being related to a mature and metabolically active liver; Contreras
4 (2000) and Miranda (2013) observed the increase of albumin and total protein levels
5 soon after weaning and the consequent increase in the consumption of concentrate feed
6 by calves, that led to greater production of albumin hepatic which contributed to the
7 higher concentration of total protein. Thus, analysis of the renal and hepatic function is
8 one important parameter for the evaluation of the animal health submitted to the
9 subsequent vaccinations, being used to evaluate the toxic effects of vaccinations,
10 dosages and immunization periods (Kaneko et al., 2000).

11

12 **5. Conclusions**

13

14 Results presented here indicate that the immunization of calves with
15 MWNT+rMSP1 α was able to induce, in general, an increase in the total leukocyte
16 counts, in the number of circulating NK cells (CD335⁺), in the lymphocyte populations
17 (CD4⁺, CD8⁺, B cells - CD21⁺, and activated T lymphocytes - CD25⁺) and induced
18 humoral response through expression of high levels of IgG, IgG1 and IgG2 antibodies.
19 Furthermore, no significant change in the biochemical profile was observed in calves
20 immunized with MWNT, suggesting that the MWNT did not induce toxicity. Therefore,
21 further studies should be performed to define the role of these immunological markers,
22 stimulated by MWNT+rMSP1 α , in the infection control and in the immunopathology of
23 bovine anaplasmosis, in order to identify the combination of antigens necessary for
24 protect susceptible animals from clinical disease.

25

26 **Acknowledgements**

27

28 The authors wish to thank Dr. Élide Mara Leite Rabelo and Dr. Flávio G. da
29 Fonseca for assistance with work. This manuscript was reviewed by a professional
30 science editor and by a native English-speaking copy editor to improve readability. This
31 research did not receive any specific grant from funding agencies in the public,
32 commercial, or not-for-profit sectors.

1 **References**

2
3 Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg.*
4 *Dis.* 58, 1-30.

5
6 Bastos, C.V., Passos, L.F.M., Vasconcelos, M.M.C., Ribeiro, M.F.B., 2009. *In vitro*
7 establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with
8 appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz. J. Microb.* 9, 399-403.

9
10 Bell-Sakyi, L., Palomar, A.M., Bradford, E.L., Shkap, V., 2015. Propagation of the
11 Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Vet. Microbiol.* 179(3),
12 270-276.

13
14 Benesi, F.J., Teixeira, C., Leal, M.L., Lisboa, J.A., Mirandola, R., Shecaira, C.L.,
15 Gomes, V., 2012. Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of
16 life. *Pesq. Vet. Bras.* 32(4), 352-356.

17
18 Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M., 2011. Making carbon nanotubes biocompatible
19 and biodegradable. *Chemical. Communications.* 47(37), 10182-10188.

20
21 Boysen, P., Storset, A.K., 2009. Bovine natural killer cells. *Vet. Immunol.*
22 *Immunopathol.* 130(3), 163-177.

23
24 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
25 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72,
26 248-254.

27
28 Brown, W.C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T.C., Tuo, W., McElwain, T.F., Palmer,
29 G.H., 1998. CD4⁺ T lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves
30 immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against
31 homologous challenge. *Infect. Immun.* 66, 5406–5413.

- 1 Brown, W.C., Palmer, G.H., Lewin, H.A., McGuire, T.C., 2001. CD4⁽⁺⁾ T lymphocytes
2 from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a
3 heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a
4 carboxyl terminus that is conserved among strains. Infect. Immun. 69(11), 6853-6862.
5
- 6 Brown, W.C., 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune
7 dysregulation: implications for bacterial persistence. Comp. Immunol. Microbiol. Infect.
8 Dis. 35(3), 241-252.
9
- 10 Chen, Q., Amaladoss, A., Ye, W., Liu, M., Dummler, S., Kong, F., Wong, H.L., Loo,
11 H.L., Loh, E., Tane, S.Q., Tane, T.C., Chang, K.T.E., Dao, M., Suresh, S., Preiser, P.R.,
12 Chen, J., 2014. Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by
13 eliminating infected red blood cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111(4), 1479-1484.
14
- 15 Contreras, P.A., 2000. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis
16 metabólicos de rebanhos. In: González, F.H.D., Barcellos, J.O., Patiño, H.O., Ribeiro,
17 L.A.O. (Eds.), Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças
18 nutricionais. UFRGS, Porto Alegre, pp 23-30.
19
- 20 Dorneles, E.M., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M.S., Sriranganathan, N., Lage, A.P.,
21 2015. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or
22 vaccination. Vaccine. 33(31), 3659-3666.
23
- 24 Estes, D.M., Closser, N.M., Allen, G.K., 1994. IFN- γ stimulates IgG2 production from
25 bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. Cell. Immunol. 154(2), 287-295.
26
- 27 Estes, D.M., Hirano, A., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A., Brown, W.C., 1995.
28 Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant
29 bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in*
30 *vitro*. Cell. Immunol. 163(2), 268-279.
31

- 1 Foldvari, M., Bagonluri, M., 2008. Carbon nanotubes as functional exipients for
2 nanomedicines: II Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine*. 4(3), 183-
3 200.
- 4
- 5 Garcia-Garcia, J.C., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Johnson, T.J., Halbur, T., Onet, V.C.,
6 Saliki, J.T., Kocan, K.M., 2004. Differential expression of the MSP1 alpha gene
7 of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Vet. Microbiol.*
8 98(3-4), 261-272.
- 9
- 10 Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. Clinical biochemistry of domestic
11 animals, 6th edn. Elsevier Academic Press publications, USA, pp. 932.
- 12
- 13 Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F., 2000. Anaplasmosis control - Past, present,
14 and future. In: *Tropical Veterinary Diseases: Control and Prevention in the Context of*
15 *the New World Order*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 501-509.
- 16
- 17 Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Melendez, R.D., 2003. Antigens and
18 alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbio. Ver.*
19 16(4), 698-712.
- 20
- 21 Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010. The
22 natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167(2-4), 95-107.
- 23
- 24 Kurz, M.M. and Willett, L.B., 1991. Carbohydrate, Enzyme, and Hematology
25 Dynamics in Newborn Calves. *J. Dairy. Sci.* 74, 2109-2118.
- 26
- 27 Lasmar, P.V.F., Carvalho, A.U., Facury-Filho, E.J., Bastos, C.V., Ribeiro, M.F.B.,
28 2012. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale*
29 derived from tick cell culture. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 112-117.
- 30
- 31 Maślanka, T., Jaroszewski, J.J., 2012. *In Vitro* effects of dexamethasone on bovine
32 CD25⁺ CD4⁺ and CD25⁻ CD4⁺ cells. *Res. Vet. Sci.* 93(3), 1367-1379.

- 1 Miranda, D.A., 2013. Perfil metabólico e desempenho de bezerros holandeses
2 alimentados com diferentes quantidades de sucedâneo de leite e concentrado de
3 diferentes granulometrias. Federal University of Minas Gerais. Dissertation, pp. 97.
4
- 5 Naessens, J., Newson, J., McHugh, N., Howard, C.J., Parsons, K., Jones, B., 1990.
6 Characterization of a bovine leucocyte differentiation antigen of 145,000 MW restricted
7 to B lymphocytes. *Immunology*. 69(4), 525-530.
8
- 9 Noh, S.M., Turse, J.E., Brown, W.C., Norimine, J., Palmer, G.H., 2013. Linkage
10 between *Anaplasma marginale* outer membrane proteins enhances immunogenicity but
11 is not required for protection from challenge. *Clin. Vaccine. Immunol.* 20(5), 651-656.
12
- 13 Rodríguez, S.D., Ortiz, M.G., Salgado, G.H., Cerda, N.S., Torres, R.A., Alarcón, G.C.,
14 2000. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous
15 challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23(4), 239-252.
16
- 17 Rosca, I.D., Watari, F., UO, M., Akasaka, T., 2005. Oxidation of multiwalled carbon
18 nanotubes by nitric acid. *Carbon*. 43, 3124–3131.
19
- 20 Sampaio, I.B.M., 2010. Estatística aplicada à experimentação animal, 3rd edn.
21 FEPMVZ, Belo Horizonte, pp. 264.
22
- 23 Santos, P.S., Sena, A.A., Nascimento, R., Araújo, T.G., Mendes, M.M., Martins,
24 J.R., Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., Goulart, L.R., 2013. Epitope-based vaccines with
25 the *Anaplasma marginale* MSP1a functional motif induce a balanced humoral and
26 cellular immune response in mice. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0060311.
27
- 28 Silveira, J.A.G., Rabelo, E.M.L., Lacerda, A.C.R., Borges, P.A.L., Tomás, W.M.,
29 Pellegrin, A.O., Tomich, R.G.P., Ribeiro, M.F.B., 2013. Molecular detection and
30 identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus,
31 1758) from the Pantanal Brazil. *Ticks. Tick-borne. Dis.* 4, 341-345.
32

- 1 Silvestre, B.T., Rabelo, É.M., Versiani, A.F., da Fonseca, F.G., Silveira, J.A., Bueno,
2 L.L., Fujiwara, R.T., Ribeiro, M.F.B., 2014. Evaluation of humoral and cellular
3 immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1 α
4 from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Vaccine*.
5 32(19), 2160-2166.
6
- 7 Storset, A.K., Kulberg, S., Berg, I., Boysen, P., Hope, J.C., Dissen, E., 2004. NKp46
8 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur. J.*
9 *Immunol.* 34(3), 669-676.
10
- 11 Turse, J.E., Scoles, G.A., Deringer, J.R., Fry, L.M., Brown, W.C., 2014. Immunization-
12 Induced *Anaplasma marginale*-Specific T-Lymphocyte Responses Impaired by *A.*
13 *marginale* Infection Are Restored after Eliminating Infection with Tetracycline. *Clin.*
14 *Vaccine. Immunol.* 21(9), 1369-1375.
15
- 16 Walker, D.H., Dumler, J.S., 2015. The role of CD8 T lymphocytes in rickettsial
17 infections. *Semin. Immunopathol.* 37(3), 289-299.
18
- 19 Walker, D.H., Olano, J.P., Feng, H.M., 2001. Critical role of cytotoxic T lymphocytes
20 in immune clearance of rickettsial infection. *Infect. Immun.* 69, 1841–1846.
21
22

1 **Figure captions:**

2

3 **Figura 3 -**

4 **Fig. 1** Median values of leukocyte counts at days 0 (pre-immunization), 21, 42 and 63.

5 (*) Represent statistically significant differences within each group compared to day 0

6 ($p < 0.05$); (**) Statistically significant difference within group G2 compared to day 21,

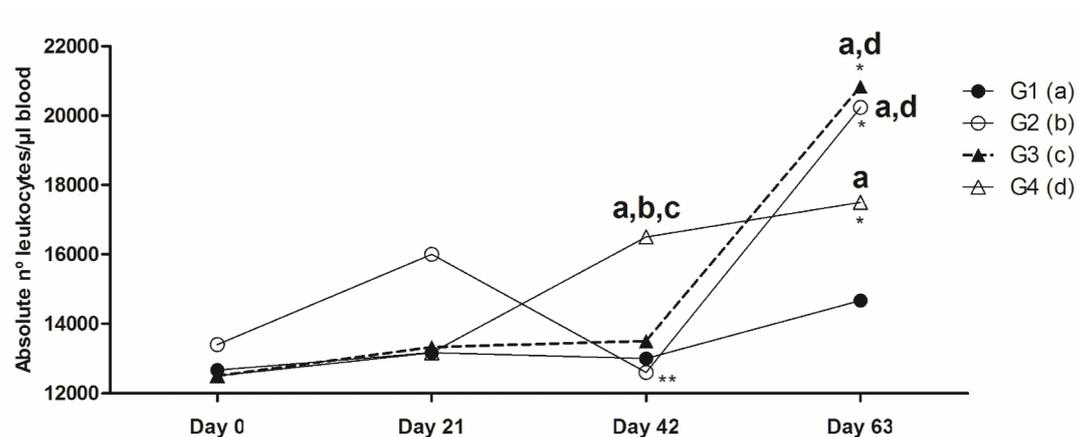
7 according to the Friedman test ($p < 0.05$). G1 = control group; G2 = calves immunized

8 with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*; G3 = calves immunized

9 with MWNT+rMSP1a; G4 = calves immunized with inactivated vaccine of *A.*

10 *marginale* produced *in vitro* associated with MWNT+rMSP1a (n=6)

11



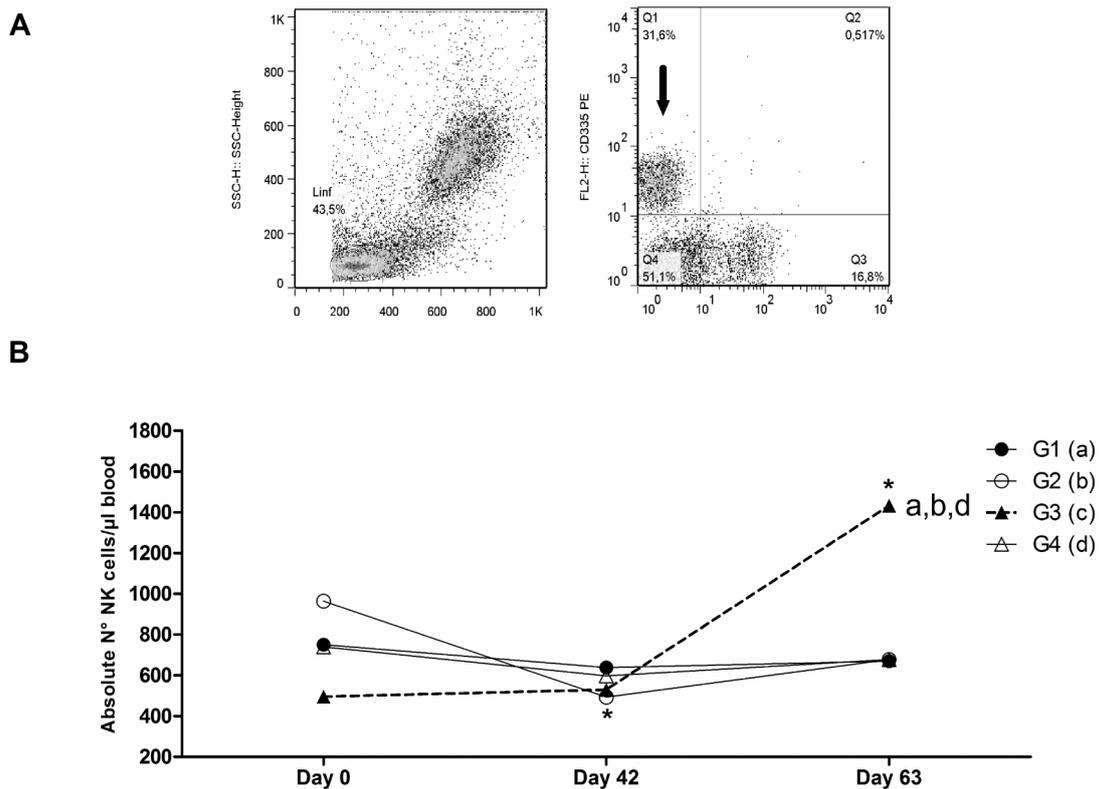
12

1 **Figura 4 -**

2

3 **Fig. 2.** (A) Lymphocytes were identified as based on their size and granularity by flow
 4 cytometry. Analysis of CD335⁺ (NK cells) was performed within the selected
 5 lymphocyte region based on the relative fluorescence intensity observed in FL1 versus
 6 FL2 dot plot distributions (arrow). (B) Absolute number of CD335⁺ in whole-blood of
 7 calves at days 0 (pre-immunization), 42 and 63. (*) Represent statistically significant
 8 differences within each group compared to day 0, according to the Friedman test
 9 (p<0.05). Letters represent statistically significant differences among groups according
 10 to the Kruskal-Wallis test (p<0.05). G1 (a) = control group; G2 (b) = calves immunized
 11 with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*; G3 (c) = calves immunized
 12 with MWNT+rMSP1a; G4 (d) = calves immunized with inactivated vaccine of *A.*
 13 *marginale* produced *in vitro* associated with MWNT+rMSP1a (n=6)

14



15

16

1 **Figura 5 -**

2

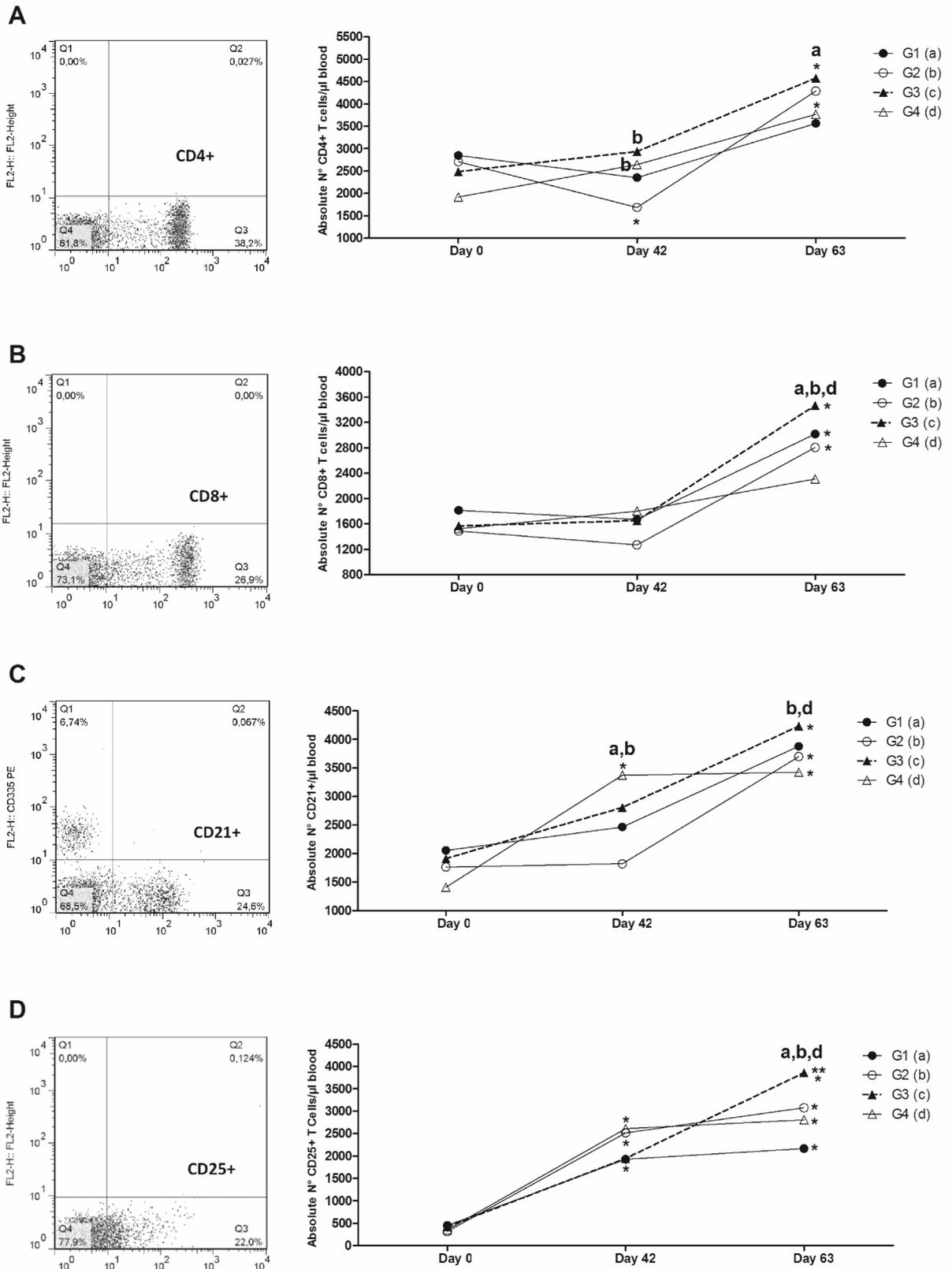
3 **Fig. 3.** Analysis of the lymphocytes in whole-blood of calves at days 0 (pre-
4 immunization), 42 and 63. (A) Kinetics of the absolute number of CD4⁺ T lymphocytes,
5 (B) CD8⁺ T lymphocytes, (C) CD21⁺ lymphocytes (B cells) and (D) CD25⁺ T
6 lymphocytes (activated T lymphocytes). (*) Represent statistically significant
7 differences within each group compared to day 0 (p<0.05); (**) Statistically significant
8 difference within group G3 compared to day 42, according to the Friedman test
9 (p<0.05). G1 = control group; G2= calves immunized with inactivated vaccine of *A.*
10 *marginale* produced *in vitro*; G3 = calves immunized with MWNT+rMSP1 α ; G4 =
11 calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro* associated
12 with MWNT+rMSP1 α (n=6)

13

14

15

1 Fig. 3.



2

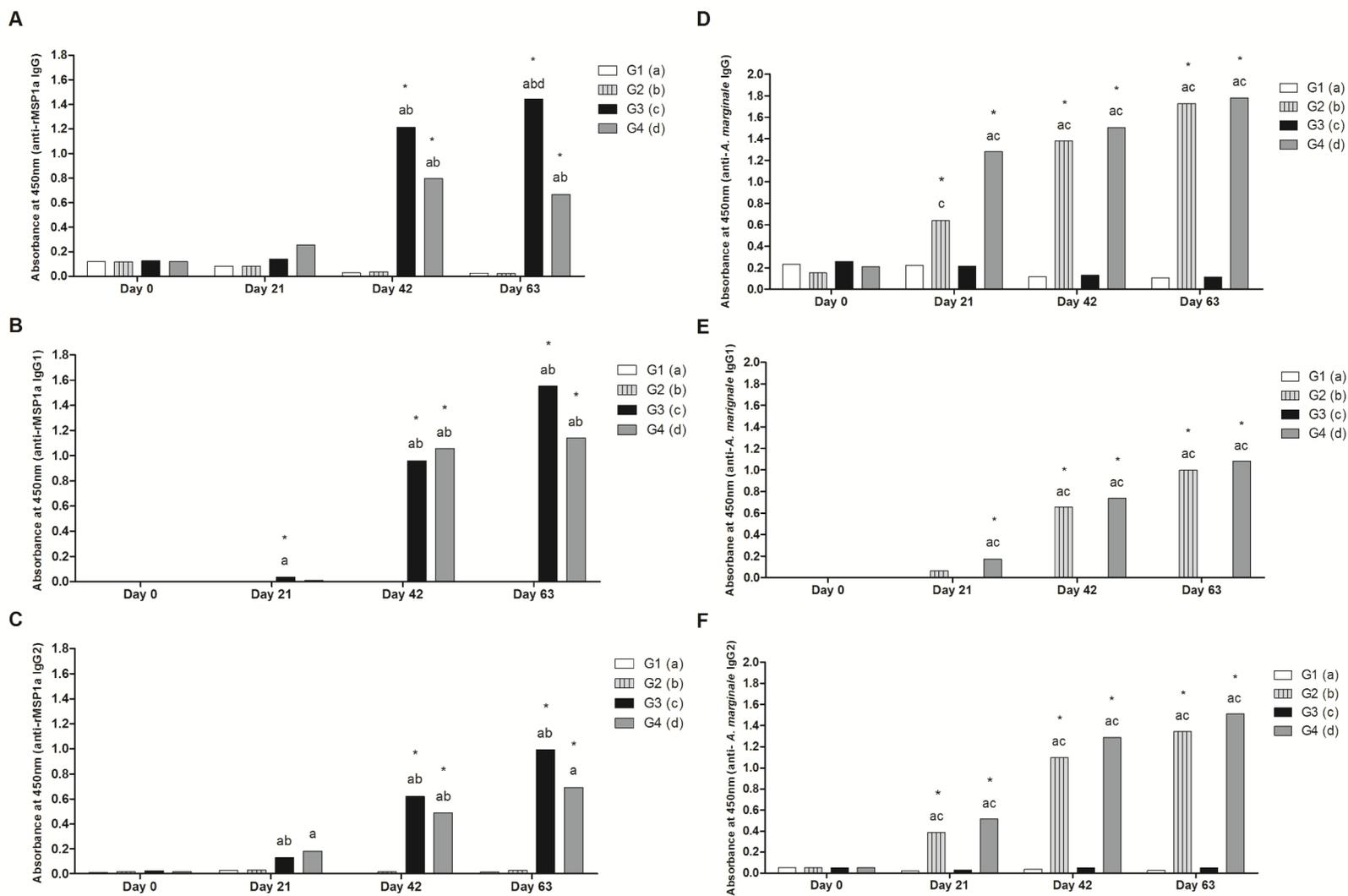
3

1 **Figura 6 -**

2

3 **Fig.4.** Induction of the humoral response after immunizations. Measurements of
4 antibodies (A) IgG anti-rMSP1a, (B) IgG1 anti-rMSP1a, (C) IgG2 anti-rMSP1a, (D)
5 IgG anti-*A. marginale*, (E) IgG1 anti-*A. marginale* and (F) IgG2 anti-*A. marginale* by
6 ELISA. Each bar represents the median value of each group (n=6). (*) Represent
7 statistically significant differences within each group compared to day 0 (pre-
8 immunization), according to the Friedman test ($p < 0.05$). Letters represent statistically
9 significant differences among groups according to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). G1
10 (a) = control group; G2 (b) = calves immunized with inactivated vaccine of *A.*
11 *marginale* produced *in vitro*; G3 (c) = calves immunized with MWNT+rMSP1a; G4 (d)
12 = calves immunized with inactivated vaccine of *A. marginale* produced *in vitro*
13 associated with MWNT+rMSP1a

Fig. 4.



1 **Table captions**

2

3 **Tabela 2 -**

4 **Table 1.** Biochemical profile in the G1 group (non-carboxylated MWNTs / Control
5 group), G2 (AmUFMG2), G3 (MWNT+rMSP1a) and G4 (AmUFMG2 associated with
6 MWNT+rMSP1a).

7

Table 1

PARAMETERS	Reference Values Bovine*	GROUP 1 (Control)				GROUP 2 (AmUFMG2)				GROUP 3 (MWNT+rMSP1a)				GROUP 4 (AmUFMG2 and MWNT+rMSP1a)			
		Day 0	Day 21	Day 42	Day 63	Day 0	Day 21	Day 42	Day 63	Day 0	Day 21	Day 42	Day 63	Day 0	Day 21	Day 42	Day 63
Glucose mg/dL	40 - 100	57,14	65,98	82,34	103,30	61,23	56,61	83,79	98,96	55,29	64,13	84,72	95,39	49,09	60,04	77,46	102,82
Creatinine mg/dL	0,5 - 2,2	1,06	1,42	1,32	1,72	0,96	1,44	1,22	1,74	1,06	1,37	1,18	1,49	1,29	1,49	1,23	1,62
Albumin g/dL	2,5 - 3,8	2,74	2,78	2,48	4,09	2,57	2,56	2,41	4,05	2,61	2,66	2,47	3,84	2,64	2,66	2,42	3,96
ALP U/L	0 - 488	164,80	177,33	157,87	278,45	240,67	253,97	186,74	311,67	170,15	158,44	142,78	189,68	175,76	180,12	178,24	289,33
Total Protein g/dL	6,7 - 7,5	7,46	7,31	6,83	9,22	7,40	7,30	6,86	9,04	7,64	7,79	7,12	9,46	7,23	7,39	6,86	9,44
GGT U/L	6 - 17,4	16,25	24,24	18,43	26,52	12,04	18,92	10,37	23,94	13,04	20,25	12,42	23,11	14,40	16,28	16,37	21,60
ALT U/L	11 - 40	18,62	19,74	24,80	32,56	23,20	20,86	25,30	40,20	22,03	19,74	26,71	35,48	20,06	22,27	27,65	40,50
AST U/L	60 - 125	57,71	48,67	77,33	82,51	68,60	52,34	68,52	95,33	62,86	52,06	73,88	92,58	63,60	57,51	68,89	94,71

Values represent the median of each group.

Statistical analysis among groups did not show significant change between calves immunized with MWNT (G1, G3 and G4) and calves from G2 group (MWNT non-immunized) (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$).

*Reference values bovine according to Kaneko et al. (2000).

VII – CAPÍTULO II

1 **7. CAPÍTULO II - OBJETIVOS**

2

3 **7.1 Objetivo Geral:**

4

5 Avaliar os parâmetros clínicos, imunológicos e a proteção induzida em bezerros
6 imunizados com MWNT+rMSP1a, associado com a vacina inativada de *A. marginale*
7 produzida *in vitro*, após o desafio experimental com a amostra heteróloga *A. marginale*
8 UFMG1.

9

10 **7.2 Objetivos Específicos:**

11

12 1) Avaliar os parâmetros clínicos de bezerros previamente imunizados com
13 MWNT+rMSP1a, associado com a vacina inativada de *A. marginale*
14 produzida *in vitro*, após desafio com 4×10^7 eritrócitos infectados com
15 isolado UFMG1 de *A. marginale*;

16

17 2) Avaliar os parâmetros da resposta celular de bezerros previamente
18 imunizados com MWNT+rMSP1a, associado com a vacina inativada de *A.*
19 *marginale* produzida *in vitro*, após desafio com 4×10^7 eritrócitos infectados
20 com isolado UFMG1 de *A. marginale*;

21

22 3) Avaliar a cinética de produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 reativos a
23 rMSP1a e ao antígeno bruto de *A. marginale*, em bovinos imunizados com
24 MWNT+rMSP1a associado com a vacina inativada de *A. marginale*
25 produzida *in vitro*, após desafio com 4×10^7 eritrócitos infectados com
26 isolado UFMG1 de *A. marginale*.

1 **8. MATERIAL E MÉTODOS**

2

3 **8.1 Locais dos experimentos**

4

5 A fase experimental foi realizada nas instalações da Clínica de Ruminantes do
6 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária – UFMG. As
7 análises laboratoriais e a produção dos imunógenos foram realizadas no Laboratório de
8 Protozoologia Veterinária e no Laboratório de Parasitologia Molecular do
9 Departamento de Parasitologia do ICB – UFMG. As análises de marcação *ex vivo* foram
10 realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro
11 de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas.

12

13 **8.2 Delineamento experimental**

14

15 A partir dos dados e conclusões obtidas no Capítulo I deste trabalho, 15 bezerros
16 machos da raça holandesa, livres da infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*
17 (confirmados por meio da nPCR), foram divididos em três grupos de cinco animais
18 cada. Os bezerros foram mantidos nas mesmas condições citadas no item 5.4 deste
19 trabalho, durante o período de julho/2015 a maio/2016.

20 O grupo G1 (controle) foi imunizado com PBS e MWNT não-carboxilados, o grupo
21 G2 imunizado com MWNT+rMSP1 α (200 μ g/animal) e animais do G3 foram
22 imunizados com Vacina AmUFMG2 produzida *in vitro* (400 μ g/animal) e
23 MWNT+rMSP1 α (200 μ g/animal). Conforme descrito no Capítulo I, todos os inóculos
24 foram emulsionados em adjuvante oleoso Emulsigen[®] (MVP Technologies, EUA). Os
25 animais receberam três imunizações, via subcutânea, nos dias 0, 21 e 42 do
26 experimento.

27

28

1 **8.3 Desafio com amostra UFMG1 de *A. marginale* e avaliação dos parâmetros**
2 **clínicos**

3
4 No dia 63 do experimento (21 dias após a terceira imunização), os animais foram
5 submetidos ao desafio com 4×10^7 eritrócitos infectados com isolado UFMG1 de *A.*
6 *marginale*, via endovenosa. O inóculo de *A. marginale* UFMG1 foi anteriormente
7 submetido a duas passagens em bezerros esplenectomizados livres de outros
8 hemoparasitos. Esta estratégia tinha como objetivo garantir a viabilidade e infectividade
9 do inóculo.

10 Durante todo o experimento os animais foram avaliados clinicamente por um médico
11 veterinário. Amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular, em
12 tubos com EDTA e utilizadas para a avaliação da resposta celular e humoral. A avaliação
13 dos parâmetros clínicos foi realizada por meio da temperatura retal, volume globular
14 (VG) e avaliação da riquetsemia. A determinação do VG foi realizada por meio da
15 técnica de microhematócrito (Schalm et al. 1975); a temperatura retal foi mensurada
16 utilizando um termômetro digital e temperaturas $\geq 39.5^\circ\text{C}$ foram classificadas como
17 hipertermia (Campos 1985). A riquetsemia foi realizada por meio da análise de 40
18 campos microscópicos de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa (IICA 1987).

19 Após o desafio, a temperatura retal, o VG e o esfregaço sanguíneo foram realizados
20 inicialmente a cada 48hs até a detecção da riquetsemia. Posteriormente, tais
21 parâmetros foram realizados diariamente até o final do experimento, quando os valores
22 de VG atingiram a 24%, considerado como limite inferior de normalidade (Radostits et
23 al. 2007). Animais que apresentaram alterações clínicas da anaplasmoze bovina
24 (mucosas anêmicas, anorexia, riquetsemia patente e hematócrito $\leq 14\%$) foram tratados
25 com enrofloxacina na dose de $7,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal, via intramuscular, dose
26 única (Facury Filho et al. 2012).

27
28 **8.4 Análise da evolução clínica após desafio com isolado UFMG1 de *A. marginale***

29
30 Para determinar a evolução da doença nos animais desafiados, foram avaliados o
31 período de incubação - PI (definido como o intervalo de tempo entre a inoculação de *A.*
32 *marginale* UFMG1 e o início da riquetsemia), o período de patência - PP (período entre

1 a detecção da riquetsemia e o dia de menor VG) e o período de convalescência - PC
 2 (intervalo entre o dia de menor VG e a recuperação, ou seja, VG 24%). Além disso, foi
 3 criado um escore numérico para facilitar a interpretação e análise dos parâmetros
 4 analisados (temperatura retal, VG e riquetsemia) (Tabela 3). Os valores obtidos para
 5 cada parâmetro clínico foram somados, criando um escore único para cada animal. A
 6 interpretação da pontuação obtida foi realizada a partir do valor médio de cada grupo, e
 7 este valor foi utilizado para determinar o grau de evolução da doença clínica, conforme
 8 a classificação apresentado na Tabela 4.

9
10
11

Tabela 3 - Classificação do escore clínico adotado para cada parâmetro

PARÂMETROS	CLASSIFICAÇÃO
Temperatura Retal	0 = $\leq 39.4^{\circ}\text{C}$ 1 = 39.5°C 2 = 39.6°C a 40.0°C 3 = $\geq 40.1^{\circ}\text{C}$
VG	0 = $\geq 25\%$ 1 = 24% 2 = 23 a 20% 3 = 19 a 14% 4 = 13 - 10% 5 = $\leq 9\%$
Riquetsemia	0 = 0% 1 = 0.01% a 0.05% 2 = 0.06 a 1% 3 = 1.01 a 2% 4 = 2.01 a 3% 5 = 3.01 a 4% 6 = 4.01 a 5% 7 = $\geq 5.01\%$
Recuperação (VG $\geq 24\%$)	0 = sem tratamento 1 = após tratamento 3 = não recuperou (óbito)

12
13

Tabela 4 - Interpretação do grau de evolução da anaplasmoze bovina, conforme o escore clínico.

Grau de Evolução	Min - Máx	Normal	Discreto	Moderado	Intenso
Escore clínico	0 – 18	0 – 1	2 - 5	6 - 11	12 - 18

8.5 Avaliação dos parâmetros celulares induzidos após desafio

Alíquotas de sangue total (40 µl), coletados nos dias 0, 63, 88 e 108 foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 ml e incubados com anticorpos monoclonais bovino-específicos para anti-CD4 (clone CC8, FITC, diluição 1:10) associado com anti-CD25 (clone IL-A111, PE, 1:5 - linfócitos T ativados, Maślanka & Jaroszewski 2012) e anti-FoxP3 (clone 7627, A647, 1:10 - células T regulatórias, Maślanka et al. 2012), anti-CD8 (clone CC63, FITC, 1:10) associado com anti-CD25, anti-CD21 (clone CC21, FITC, 1:5 - células B, Naessens et al. 1990) e anti-CD335 (clone AKS1, FITC, 1:10 - células natural killer, Storset et al. 2004), adquiridos pela AbD Serotec® (Bio-Rad, EUA). A marcação fenotípica dos linfócitos, a aquisição e a análise das amostras foram realizadas conforme descrito no item 5.7 do Capítulo I.

Para a obtenção de valores celulares absolutos, os percentuais obtidos na citometria de fluxo foram combinados com os dados de leucograma obtidos de cada animal. A contagem global de leucócitos foi realizada com amostras de sangue coletados nos dias 0, 21, 42, 63, 77, 88, 96 e 108, utilizando câmara de Neubauer e o fluído de Thomas como diluente. Os valores obtidos foram expressos em nº de células/µl de sangue (Benesi et al. 2012).

8.6 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 induzidos após o desafio

Amostras de plasma obtidas nos dias 0, 21, 42, 63, 77, 84, 88, 96 e 108 foram utilizadas para a avaliação dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-rMSP1a/anti-AmUFMG2, por meio do teste de ELISA. As concentrações de antígeno, plasma e conjugado, bem como a execução de todos os passos da técnica, foram utilizadas conforme descrito no item 5.8 do Capítulo I.

1 **8.7 Análise estatística**

2

3 A análise estatística foi realizada utilizando o software InfoStat (versão 2014). Os
4 dados foram submetidos ao teste de Lilliefors para a determinação da normalidade das
5 amostras. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para verificar a existência de
6 diferenças estatísticas entre os grupos. Para avaliar a existência de diferenças entres os
7 pontos de tempo, dentro de cada grupo, foi utilizado o teste de Friedman (Sampaio
8 2010). Para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos em relação
9 ao escore clínico, os valores médios obtidos de cada grupo foram submetidos ao teste de
10 análise de variância (ANOVA). As diferenças obtidas foram consideradas
11 estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor do que 0.05. Para a
12 detecção de possíveis outliers, os dados foram submetidos ao teste *Graphpad*
13 *QuickCalcs Outlier Calculator* (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>)

14 .

1 9. RESULTADOS

2 9.1 Temperatura retal, VG, Riquetsemia e Escore clínico

3

4 Após o desafio experimental com 4×10^7 eritrócitos infectados com isolado UFMG1
5 de *A. marginale*, os animais foram avaliados quanto à temperatura retal, variação do VG
6 e detecção da riquetsemia. Os bezerros foram monitorados por um período total de 45
7 dias após o desafio (dia 108 do experimento), período no qual todos os animais
8 retornaram aos valores de normalidade de VG ($\geq 24\%$). Durante este período, todos os
9 15 bezerros apresentaram sinais clínicos da anaplasiose bovina, como hipertermia, VG
10 $\leq 14\%$, riquetsemia patente, letargia, redução do apetite e icterícia, sendo necessária a
11 utilização de tratamento com enrofloxacina ($7,5 \text{ mg kg}^{-1}$).

12

13 9.1.1 Temperatura retal

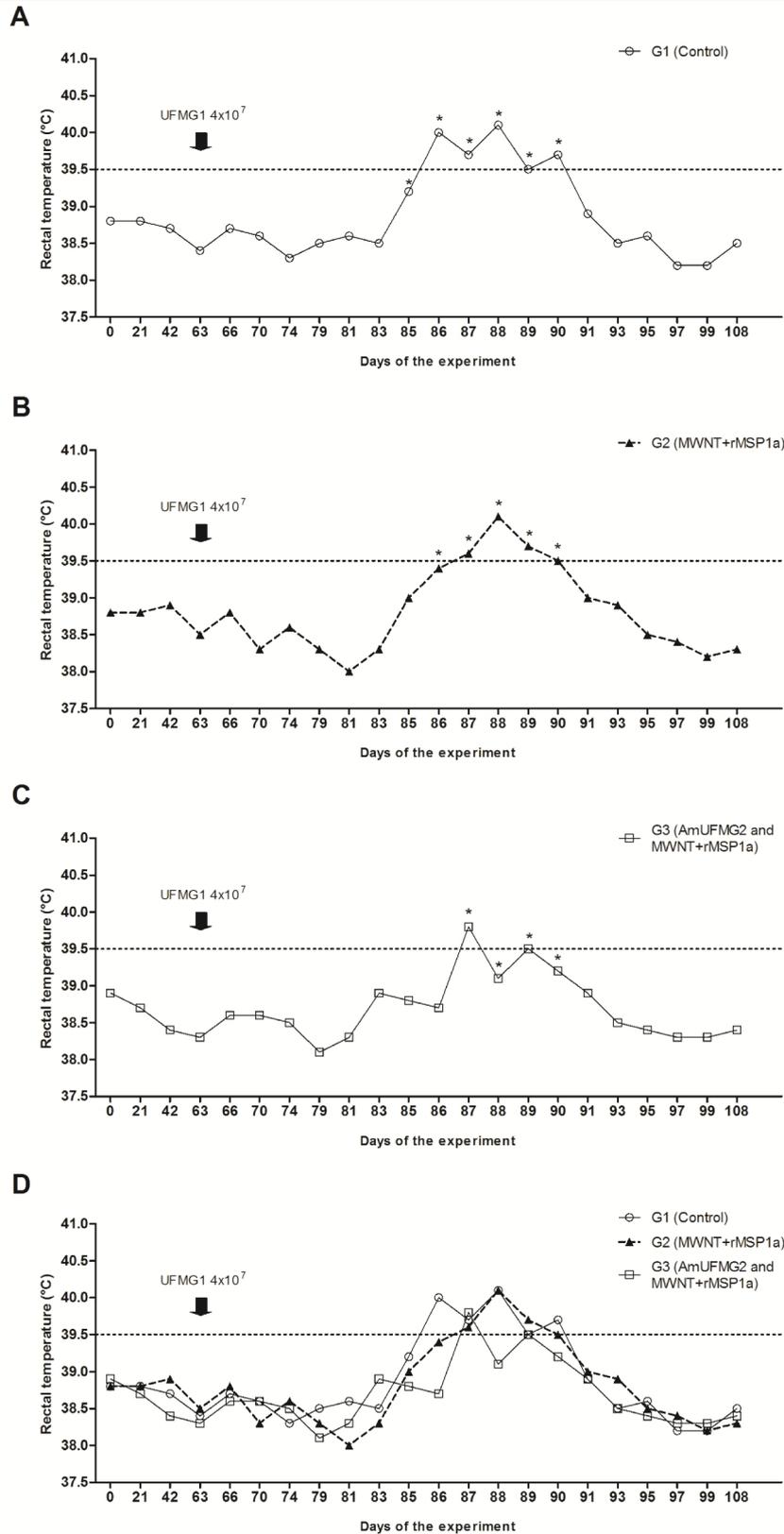
14

15 A figura 7 apresenta os valores medianos de temperatura retal obtidos de cada grupo
16 experimental ao longo do experimento. A partir do dia 85, animais do grupo controle
17 (G1- não imunizado e desafiados com *Anaplasma*) apresentaram uma elevação da
18 temperatura, atingindo a máxima de 40.1°C no dia 88 (25 dias após o desafio). Estes
19 animais apresentaram hipertermia durante cinco dias (Figura 7A). No grupo G2
20 (imunizados com MWNT+rMSP1a e desafiados) o aumento da temperatura retal foi
21 observado a partir do dia 87 (39.6°C), com máxima de 40.1°C no dia 88. O período de
22 hipertemia observado nesse grupo foi de quatro dias (Figura 7B). Animais do grupo G3
23 (imunizados com AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a e desafiados) apresentaram
24 hipertermia somente no dia 87 do experimento (39.8°C), sendo este o valor mediano
25 máximo encontrado neste grupo (Figura 7C).

26

27 Para determinar a frequência relativa de hipertermia em cada grupo, cada registro de
28 febre observado foi dividido pelo número de animais do grupo ($n=5$) e os valores
29 obtidos foram transformados em porcentagem. Apesar do grupo G3 apresentar
30 temperaturas $\geq 39.5^\circ\text{C}$ nos dias analisados, os animais deste grupo apresentaram a
31 menor frequência relativa de hipertermia em comparação com os animais dos grupos G1
32 e G2 (G1 = 52.9%, G2 = 47.5% e G3 = 37.5%).

32



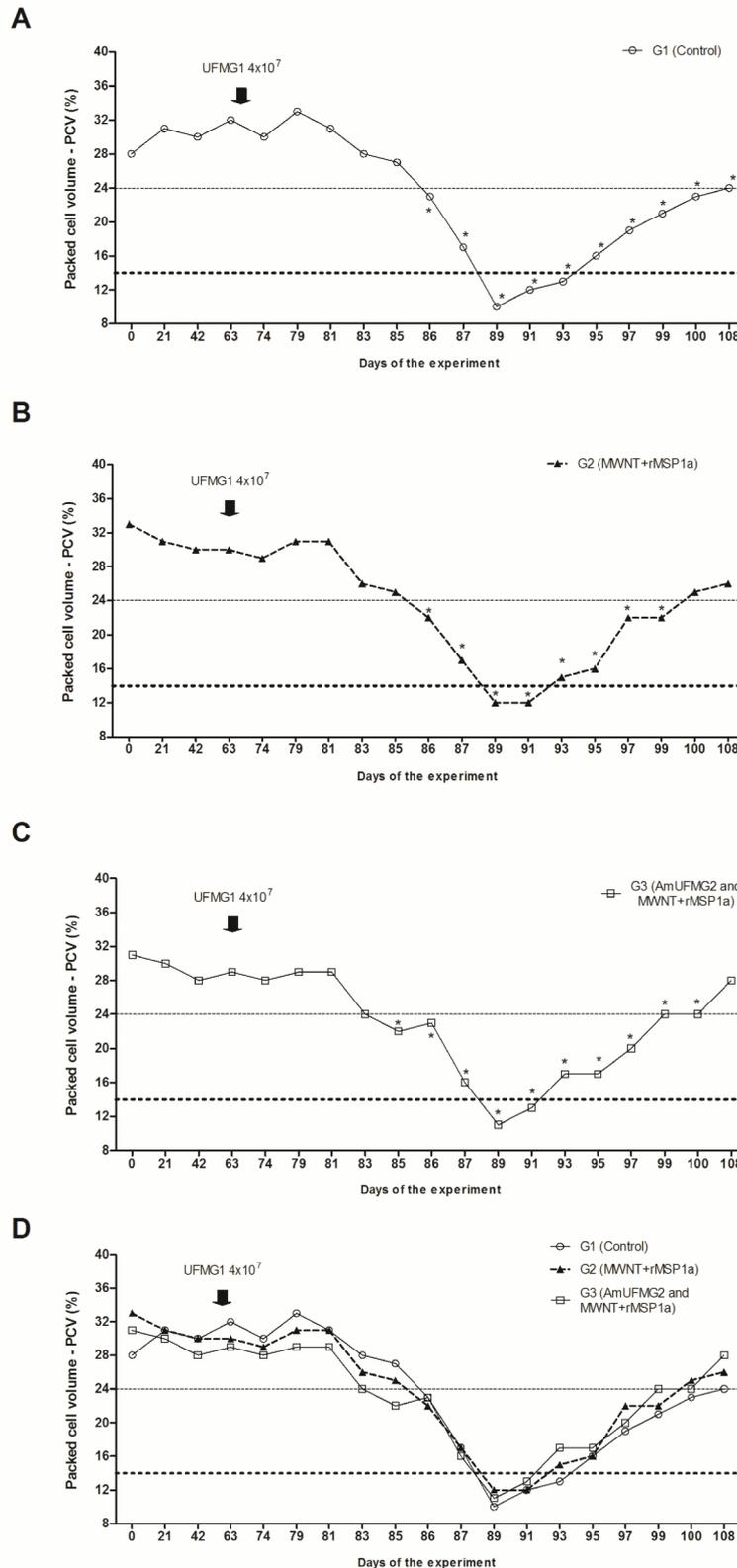
1

2 **Figura 7** - Dinâmica da temperatura retal ao longo do experimento. A seta indica o desafio com o isolado
3 *A. marginale* UFMG1 no dia 63. (A) Valores medianos obtidos no grupo controle - G1. (B) Grupo G2 -
4 MWNT+rMSP1a. (C) Grupo G3 - AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a. (D) Grupos G1, G2 e G3. (*)
5 Representa diferenças estatísticas significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste
6 de Friedman ($p < 0.05$). (...) Representa o valor considerado como hipertemia em bezerros (Campos,
7 1985).

1 **9.1.2. Volume globular (VG)**

2
3 A figura 8 apresenta a cinética do VG observado em cada grupo ao longo do período
4 experimental. Animais do grupo não imunizado e desafiado (G1) apresentaram valores
5 medianos de hematócrito (VG = 23%) abaixo do limite inferior de normalidade, a partir
6 do dia 86, ou seja 23 dias pós desafio (dpd) com o isolado *A. marginale* UFMG1
7 (Figura 8A). No dia 89 (26 dpd), estes bezerros apresentaram o menor valor de VG
8 registrado no grupo (VG = 10%), o que corresponde a uma taxa de redução de 68.75%
9 do hematócrito em comparação com o valor observado no pré-desafio (dia 63) (Tabela
10 5). Após tratamento com enrofloxacina, um bezerro do grupo G1 (1/5) apresentou
11 condições clínicas desfavoráveis a recuperação, necessitando de transfusão sanguínea
12 (dia 89, 26 dpd) e o outro animal veio a óbito no dia 90 (27 dpd) (1/5). Os outros três
13 animais do grupo controle (3/5) apresentaram melhora clínica, com elevação gradual do
14 VG, atingindo a normalidade no dia 108 do experimento (VG = 24%). O período de
15 convalescência (PC) do grupo G1 foi de 19 dias (Tabela 5). A análise estatística dos
16 dados revelou que, a partir do dia 86, animais do G1 apresentaram uma redução
17 significativa dos valores medianos de VG em comparação com o dia 63, pré-desafio
18 ($p < 0.05$) (Figura 8A).

19 Bezerros imunizados apenas com MWNT+rMSP1a (G2) apresentaram, a partir do
20 dia 86 (23 dpd), valores de VG inferiores ao limite de normalidade (VG = 22%),
21 atingindo no dia 89 (26 dpd) o menor valor de VG do grupo (VG = 12%) (Figura 8B).
22 Esse valor corresponde a uma taxa de redução de 60.00% do hematócrito em
23 comparação com os dados observados no dia 63 do mesmo grupo (Tabela 5). Após
24 tratamento com enrofloxacina, todos os animais do grupo G2 (5/5) apresentaram
25 melhora clínica, com elevação gradual do VG, atingindo a normalidade no dia 100 do
26 experimento (VG 25%). O PC observado no grupo G2 foi de 11 dias (Tabela 5). A
27 análise estatística dos dados revelou que entre os dias 86 e 99, bezerros do G2
28 apresentaram uma redução significativa dos valores medianos de VG em comparação
29 com o dia 63, pré-desafio ($p < 0.05$) (Figura 8B).



1
2
3
4
5
6
7
8

Figura 8 - Dinâmica do VG ao longo do experimento. A seta indica o desafio com *A. marginale* UFMG1 no dia 63. (A) Valores medianos obtidos no grupo controle - G1. (B) Grupo G2 - MWNT+rMSP1a. (C) Grupo G3 - AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a. (D) Grupos G1, G2 e G3. (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$). (...) Representa o limite inferior de normalidade (Radostits et al. 2007). (--) Representa o ponto limite de redução de VG para início do tratamento dos animais.

1 **Tabela 5** - Evolução clínica dos bezerros imunizados após o desafio experimental com 4×10^7 eritrócitos
2 infectados com *A. marginale* UFMG1.
3

	G1 (Controle)	G2 (MWNT+rMSP1a)	G3 (AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a)
Deteção riquetsemia	Dia 79 (16 dpd)	Dia 80 (17 dpd)	Dia 80 (17 dpd)
Riquetsemia máxima (mediana)	5.92% (Dia 87 - 24 dpd)	5.70% (Dia 88 - 25 dpd)	2.72% (Dia 87 - 24 dpd)
VG Pré-desafio (Dia 63)	32%	30%	29%
Menor valor de VG (mediana)	10% (Dia 89 - 26 dpd)	12% (Dia 89 - 26 dpd)	11% (Dia 89 - 26 dpd)
Tx Redução do VG (mediana)	68.75% (53.85 - 69.70%)	60.00% (50.00 - 65.38%)	62.07% (38.46 - 65.52%)
Escore clínico	Intenso	Intenso	Moderado
Temperatura Retal Máxima (mediana)	40.1°C (Dia 88 - 25 dpd)	40.1°C (Dia 88 - 25 dpd)	39.8°C (Dia 87 - 24 dpd)
PI	16 dias	17 dias	17 dias
PP	10 dias	9 dias	9 dias
PC	19 dias	11 dias	9 dias
Tratamento (VG 14% → Enrofloxacina 7.5 mg kg⁻¹)	Dia 87 = 1 Dia 88 = 1 Dia 89 = 2 Dia 92 = 1 (Total = 5) 100% Tratado	Dia 87 = 1 Dia 89 = 2 Dia 90 = 2 (Total = 5) 100% Tratado	Dia 87 = 1 Dia 88 = 1 Dia 89 = 1 Dia 90 = 2 (Total = 5) 100% Tratado
Transfusão sanguínea	1 animal (Dia 89 - 26 dpd)	***	***
Óbito	1 animal (Dia 90 - 27 dpd)	***	***

4 dpd = Dias pós desafio com o isolado *A. marginale* UFMG1
5 PI = Período de Incubação (intervalo de tempo entre o desafio e o início da riquetsemia)
6 PP = Período de Patência (período entre a detecção da riquetsemia e o dia de menor VG)
7 PC = Período de Convalescência (intervalo entre o dia de menor VG e a recuperação - VG 24%)
8

1 Animais do grupo G3, que receberam AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α durante as
2 imunizações, apresentaram a partir do dia 85 (22 dpd) valores medianos de VG abaixo
3 do limite de normalidade (VG = 22%), sendo que no dia 89 (26 dpd) o grupo apresentou
4 o menor valor de hematócrito (11%). Esses dados correspondem a uma taxa de redução
5 de 62.07% do VG em comparação com os valores apresentados pelo grupo no pré-
6 desafio (dia 63) (Tabela 5). Após tratamento com enrofloxacina, todos os animais do G3
7 (5/5) apresentaram melhora clínica, com elevação gradual do VG, atingindo a
8 normalidade no dia 99 do experimento (VG = 24%). O PC dos bezerros do grupo G3 foi
9 de nove dias (Tabela 5). A análise estatística dos dados revelou que entre os dias 85 e
10 100 bezerros do G3 apresentaram uma redução significativa dos valores medianos de
11 VG em comparação com o dia 63, pré-desafio ($p < 0.05$) (Figura 8C). Apesar do G3 ter
12 apresentado a redução do hematócrito um dia antes dos demais grupos, o período de
13 recuperação foi menor (nove dias) e a taxa de redução do hematócrito foi inferior ao
14 observado no grupo controle (62.07% e 68.75%, respectivamente). Entretanto,
15 diferenças estatísticas não foram observadas entre os animais do G3 e G1 (controle)
16 ($p > 0.05$).

17

18 9.1.3 Riquetsemia

19

20 A análise dos dados de riquetsemia revelou pontos importantes sobre a dinâmica da
21 infecção nos grupos vacinados e o não vacinado. Apesar de todos os animais terem
22 apresentado riquetsemia patente, níveis mais baixos de corpúsculos de *A. marginale*
23 foram visualizados em esfregaços sanguíneos do grupo G3, imunizados com
24 AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α : grupo G1 (controle) apresentou riquetsemia máxima
25 de 5.92%, seguido pelo grupo G2 com 5.70%; no G3 o valor mediano máximo
26 observado foi de 2.72% (Figura 9). Entre os dias 84 e 90 (21 e 27 dpd, respectivamente)
27 as taxas de riquetsemia detectadas nos animais do grupo G3 foram estatisticamente
28 inferiores ao observado no G1 ($p < 0.05$).

29

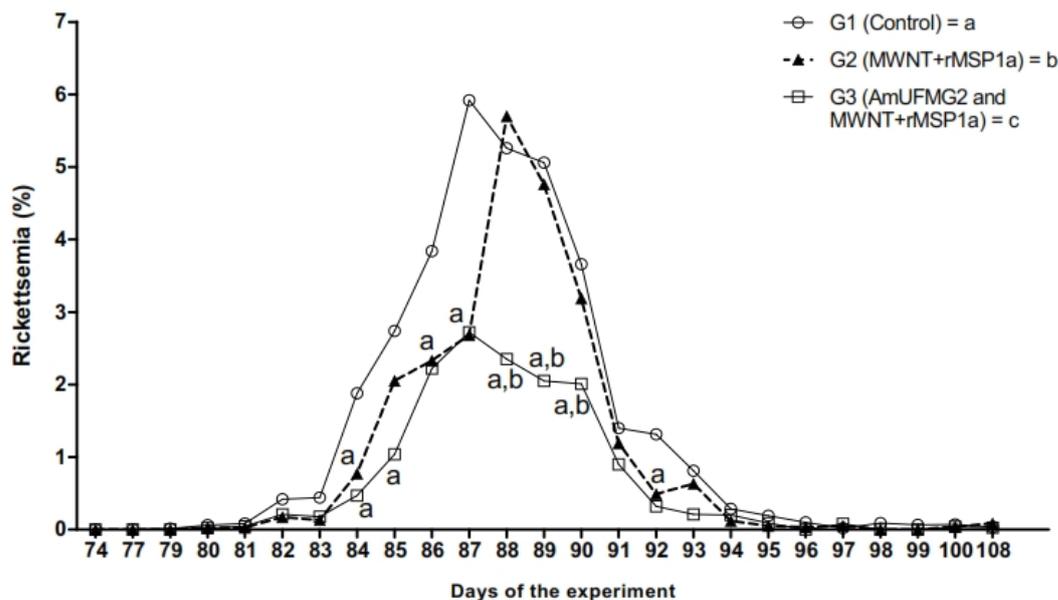
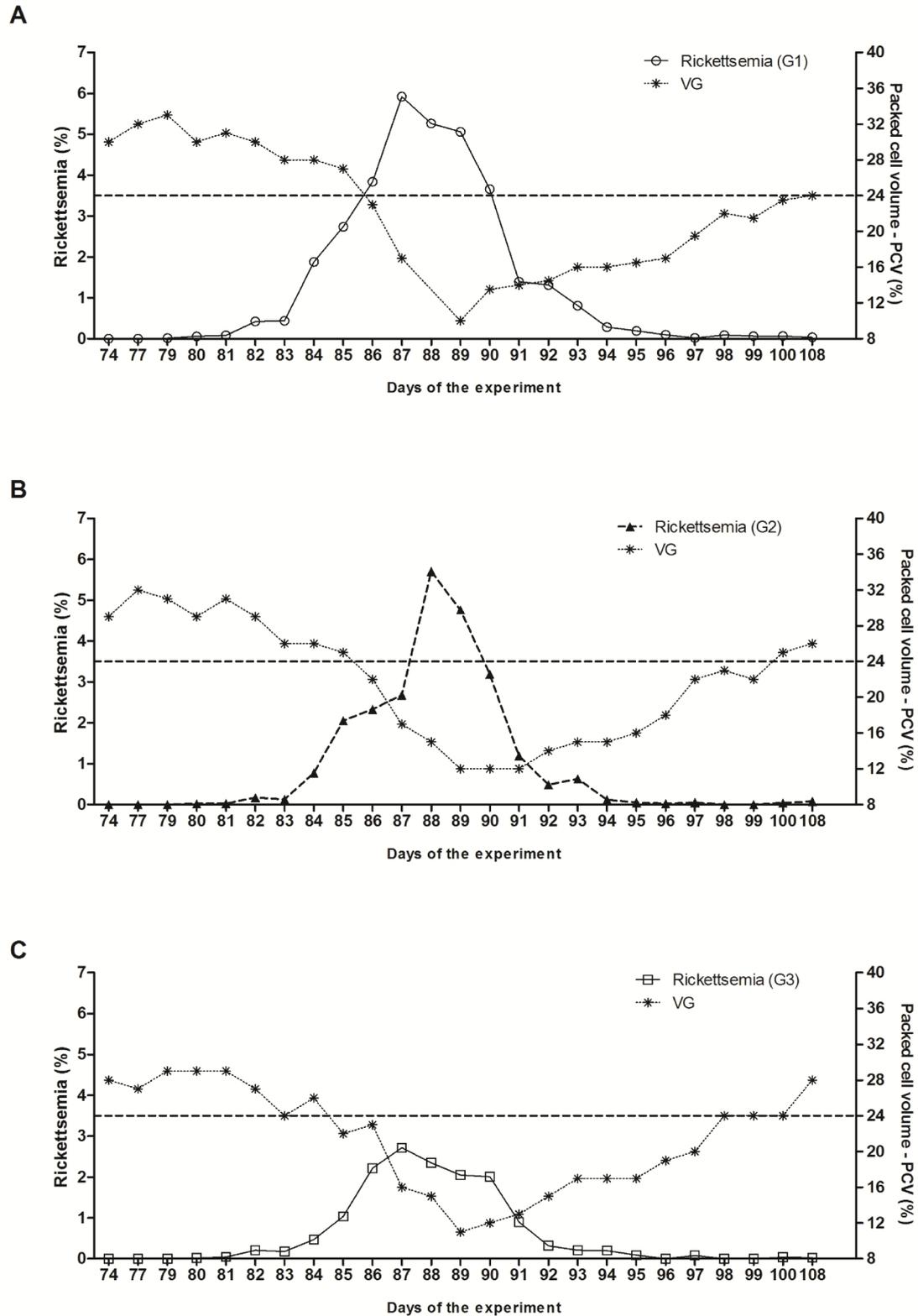


Figura 9 - Níveis de ricketsemia detectados em esfregaços sanguíneos de cada grupo experimental ao longo do experimento. Os valores apresentados representam a mediana de cada grupo. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

A fim de avaliar períodos pontuais da ricketsemia, bem como sua dinâmica em relação à variação do hematócrito, os valores medianos de ricketsemia e VG foram analisados simultaneamente dentro de cada grupo (Figura 10). No grupo G1 as primeiras hemácias infectadas foram observadas no dia 79, o que corresponde a um PI de apenas 16 dias. O pico máximo de ricketsemia observado foi de 5.92% no dia 87 do experimento (24 dpd), seguido por uma queda acentuada de ricketsemia observada no dia 91 (1.4%) (Figura 10A). Após este período, a ricketsemia dos bezerros somente desafiado se manteve baixa, sendo que no dia 108 a ricketsemia mediana no grupo controle foi de 0.04%. Essa redução está relacionada com o início do tratamento dos animais que apresentaram mucosas anêmicas, anorexia, letargia e hematócrito $\leq 14\%$. O menor valor de VG observado no grupo controle (dia 89, 10%) foi sucedido ao pico de ricketsemia observado no dia 87 (Figura 10A). Após o tratamento e o controle da ricketsemia, os níveis de VG foram restabelecidos a normalidade (VG = 24% no dia 108). O período entre a detecção da ricketsemia e o dia de menor VG (PP) foi de 10 dias no grupo controle (Tabela 5).



1
2 **Figura 10** - Dinâmica entre ricketsemia e VG ao longo do experimento. (A) Valores medianos obtidos no
3 grupo controle - G1. (B) Grupo G2 - MWNT+rMSP1 α . (C) Grupo G3 - AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α .
4 (---) Representa o limite inferior de normalidade do VG (Radostits et al. 2007).
5

1 Nos bezerros imunizados com MWNT+rMSP1 α (G2) os primeiros corpúsculos de *A.*
2 *marginale* foram observados no dia 80 do experimento, o que corresponde a um PI de
3 17 dias. No dia 85 um pico inicial de 2.05% foi observado, atingindo posteriormente um
4 pico máximo de 5.70% no dia 88 (25 dpd) (Figura 10B). Essa ascensão da riquetsemia
5 foi seguida por uma redução acentuada no dia 92, onde os níveis de eritrócitos
6 infectados alcançaram 0.49%. A partir daí, níveis basais de riquetsemia foram
7 observados. No dia 108 a riquetsemia mediana no grupo G2 foi de 0.08%, reflexo do
8 tratamento com enrofloxacina. O menor valor de VG observado no grupo G2 (dia 89,
9 12%) ocorreu logo em seguida ao aumento da riquetsemia observado entre os dias 84 e
10 88 (Figura 10B). Após o tratamento e o controle da riquetsemia, os níveis de VG foram
11 restabelecidos aos padrões normais (VG = 26% no dia 108). Conforme os dados
12 apresentados na Tabela 5, o grupo G2 apresentou um PP de nove dias.

13 A riquetsemia nos animais do grupo G3 (AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α) foi
14 primeiramente detectada no dia 80 do experimento, o que corresponde a um PI de 17
15 dias. O pico máximo de riquetsemia observado neste grupo foi de 2.72% no dia 87 (24
16 dpd). Estes valores foram mantidos até o dia 90, onde a mediana de eritrócitos
17 infectados foi de 2.01% (Figura 10C). Após o tratamento com enrofloxacina foi
18 observado uma redução acentuada da riquetsemia (0.32%). A partir daí, níveis basais de
19 corpúsculos de *A. marginale* foram observados. No dia 108 a riquetsemia mediana no
20 grupo G3 foi de 0.03%. O menor valor de VG observado nos animais do G3 (dia 89,
21 11%) ocorreu dois dias após o pico de 2.72% de riquetsemia (Figura 10C). Após o
22 tratamento e o controle da infecção, os níveis de VG foram restabelecidos a
23 normalidade (VG = 28% no dia 108). Semelhante ao grupo G2, o PP do G3 foi de nove
24 dias (Tabela 5).

25

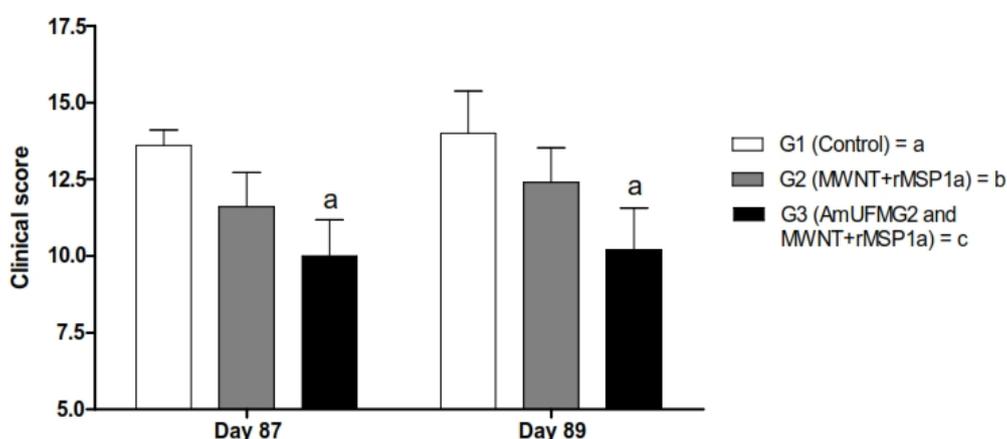
26 **9.1.4 Escore clínico**

27

28 A figura 11 apresenta os valores médios de escores clínicos obtidos em cada grupo
29 experimental no dia de riquetsemia máxima (dia 87 = G1 e G3; dia 88 = G2) e no dia de
30 menor valor de VG (dia 89). Em ambos os dias analisados, o escore clínico apresentado
31 pelo G3 foi estatisticamente inferior ao observado nos animais do grupo somente
32 desafiado - G1 ($p < 0.05$). De acordo com o critério de classificação da doença utilizado

1 neste trabalho os grupos G1 e G2 apresentaram escore clínico considerado como de
2 grau intenso, enquanto que no grupo G3 o escore foi moderado (G1 = 13.6 e 14; G2 =
3 11.6 e 12.4; G3 = 10 e 10.2).

4 Após a análise conjunta dos dados clínicos foi possível observar que o grupo G1
5 apresentou sinais clínicos mais intensos em relação aos grupos G2 e G3. Entretanto,
6 bezerros imunizados com AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a (G3) apresentaram quadro
7 clínico menos grave, com menor frequência relativa de hipertermia, maior capacidade
8 de recuperação do VG (período de convalescência menor do que os demais grupos),
9 níveis de riquetsemia estatisticamente inferiores e um escore clínico moderado.
10



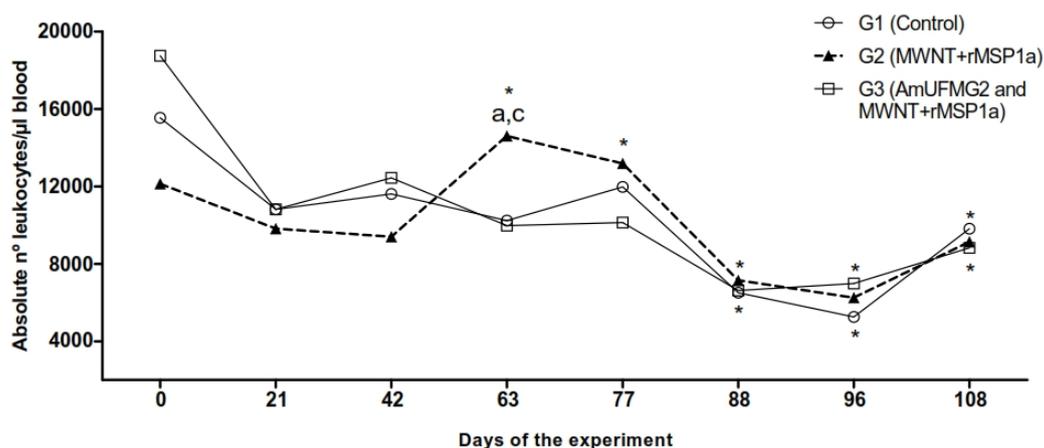
11
12 **Figura 11** - Média de escore clínico obtida em cada grupo experimental no dia 87 (riquetsemia máxima)
13 e no dia 89 (menor valor de VG). No grupo G2, o escore clínico foi realizado no dia 88 ao invés do dia
14 87. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0.05$).
15
16

17 9.2 Perfil imunofenotípico de linfócitos circulantes de bezerros imunizados após o 18 desafio com *A. marginale* UFMG1

19
20 Amostras de sangue coletadas ao longo do experimento foram utilizadas para a
21 contagem global de leucócitos e para a avaliação de células NK ($CD335^+$), linfócitos T
22 $CD4^+$ ativados ($CD4^+CD25^+$), células T $CD4^+$ regulatórias ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$),
23 linfócitos T $CD8^+$ ativadas ($CD8^+CD25^+$) e células B ($CD21^+$).

24 Ao final das imunizações (dia 63), a contagem de leucócitos nos animais do grupo
25 G2 apresentou valores medianos superiores estatisticamente ao grupo controle (G1) e ao
26 G3 ($p < 0.05$). Entretanto, após o desafio com amostra *A. marginale* UFMG1 foi

1 observada uma redução de leucócitos totais, principalmente entre os dias 63 e 88,
2 coincidindo com o período de aumento da riquetsemia (Figura 12). Esta redução
3 leucocitária também foi observada nos animais do G1 e G3. Após o dia 96, todos os
4 grupos apresentaram um aumento discreto na contagem de leucócitos, sendo que neste
5 período níveis basais de riquetsemia também foram observados em decorrência do
6 tratamento com enrofloxacina.



7
8 **Figura 12** - Número absoluto leucócitos presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-
9 imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras
10 representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis
11 ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo,
12 segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$).
13

14
15 A figura 13 apresenta o número absoluto de células NK ($CD335^+$) presente em cada
16 microlitro de sangue analisado nos dias 0 (pré-imunização), 63 (pré-desafio), 88 (25
17 dpd) e 108 (45 dpd). Ao longo das imunizações, o grupo G2 apresentou aumento de
18 células NK ($p < 0.05$), sendo que no dia 63 (pré-desafio) o número absoluto deste
19 marcador foi superior estatisticamente aos valores apresentados pelos animais dos
20 grupos controle (G1) e G3 ($p < 0.05$). Após o desafio com o isolado *A. marginale*
21 UFMG1, todos os grupos (G1, G2 e G3) apresentaram valores absolutos similares entre
22 si e estatisticamente inferiores ao observado no dia 0 ($p < 0.05$), indicando uma redução
23 desse marcador após a infecção e multiplicação de *A. marginale*. Um pequeno aumento
24 de $CD335^+$ foi observado entre os dias 88 e 108 em todos os grupos (Figura 13),
25 coincidindo com o período no qual níveis basais de riquetsemia foram observados
26 devido ao tratamento com enrofloxacina.
27

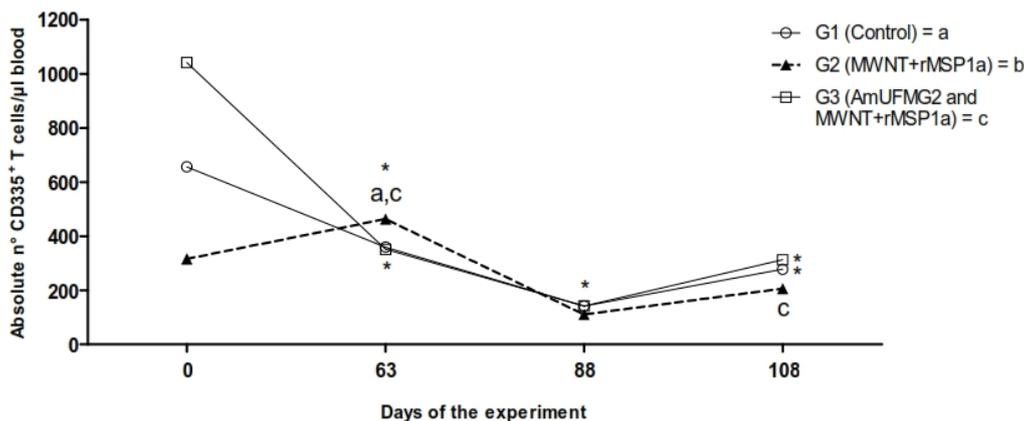


Figura 13 - Número absoluto de células NK (CD335⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$).

A análise da população de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD4⁺CD25⁺) demonstrou que bezerros que receberam MWNT+rMSP1a (G2) apresentaram aumento significativo deste marcador ao longo das imunizações ($p < 0.05$) (Figura 14). No dia 63 (pré-desafio) o número absoluto de CD4⁺CD25⁺ no grupo G2 foi superior estatisticamente ao observado nos animais do grupo controle (G1) e G3 ($p < 0.05$). Após o desafio (entre os dias 63 e 88), uma redução acentuada deste marcador foi observada nos grupos G2 e G3 (redução de 47.3% e 50.7%, respectivamente). Esta redução ocorreu no mesmo período em que os animais destes grupos apresentaram um aumento substancial dos níveis de riquetsemia (Figura 10B-C). No dia 88, o valor mediano de CD4⁺CD25⁺ obtido no grupo G3 foi o menor valor do grupo observado ao longo do experimento (542 células/μl sangue). Após o tratamento e controle da riquetsemia (entre os dias 88 e 108), um pequeno aumento de linfócitos T CD4⁺ ativados foi novamente observado nos grupos G2 e G3. Animais do grupo G1 não apresentaram alterações significativas após o desafio (Figura 14).

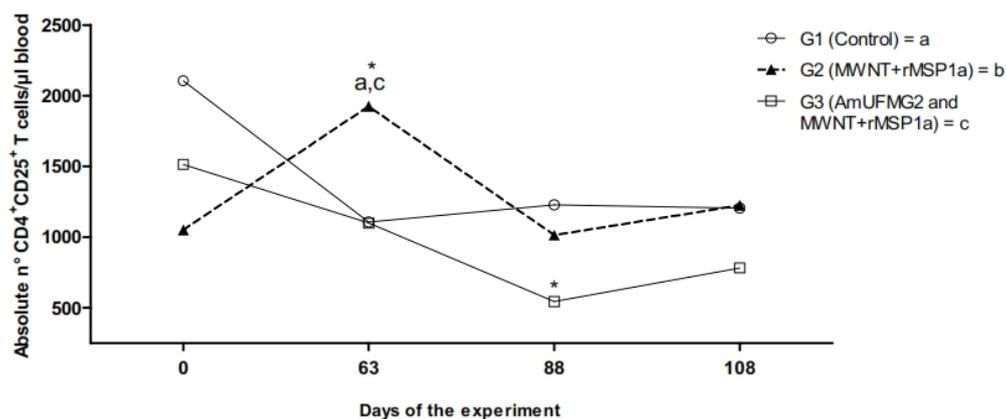


Figura 14 - Número absoluto de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD4⁺CD25⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$).

A figura 15 apresenta os valores medianos de células T CD4⁺ regulatórias (CD4⁺CD25⁺Fox⁺) avaliadas durante o experimento. No dia 63 (pré-desafio), o número absoluto deste marcador no grupo controle (G1) foi considerado superior estatisticamente aos valores obtidos nos grupos G2 e G3 ($p < 0.05$). Após o desafio (entre os dias 63 e 88), apenas o grupo G2 apresentou aumento desse marcador (aumento de 26.6%), porém, não foi estatisticamente significativo ($p > 0.05$). Ambos os grupos G1 e G3 apresentaram uma redução no número absoluto destas células, sendo que no grupo G1 o valor mediano observado no dia 88 foi inferior estatisticamente ao dia 0 ($p < 0.05$). No dia 108, todos os grupos apresentaram valores similares de CD4⁺CD25⁺Fox⁺ em relação à coleta anterior ($p > 0.05$).

Ao longo das imunizações foi possível observar um aumento crescente de linfócitos T CD8⁺ ativados (CD8⁺CD25⁺) em todos os grupos analisados ($p < 0.05$) (Figura 16). Entretanto, no dia 63 (pré-desafio) o valor absoluto deste marcador no grupo G2 foi superior estatisticamente aos valores encontrados nos grupos controle (G1) e G3 ($p < 0.05$). Após o desafio (entre os dias 63 e 88), todos os grupos apresentaram uma redução nos níveis de CD8⁺CD25⁺, sendo que esta redução ocorreu no mesmo período em que níveis elevados de riquetsemia foram detectados. Após o tratamento e controle da riquetsemia (entre os dias 88 e 108), um pequeno aumento de linfócitos T CD8⁺ ativados foi novamente observado (Figura 16).

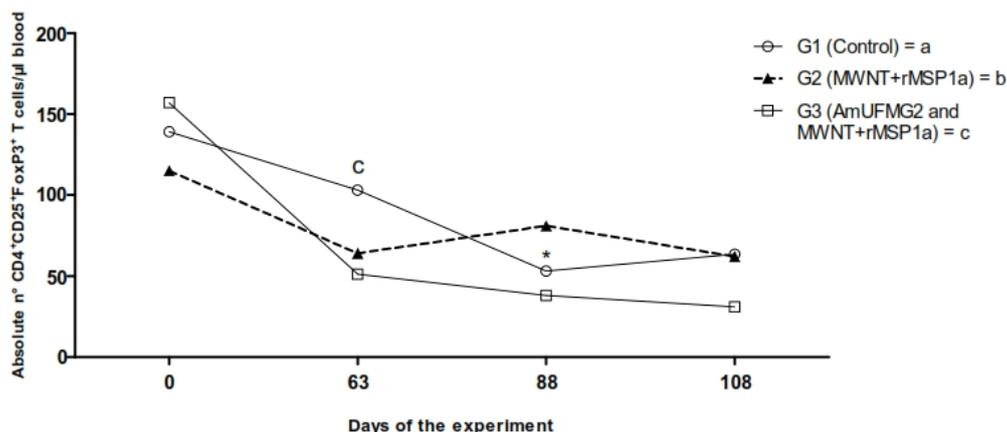


Figura 15 - Número absoluto de células T CD4⁺ regulatórias (CD4⁺CD25⁺Fox⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis (p<0.05). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman (p<0.05).

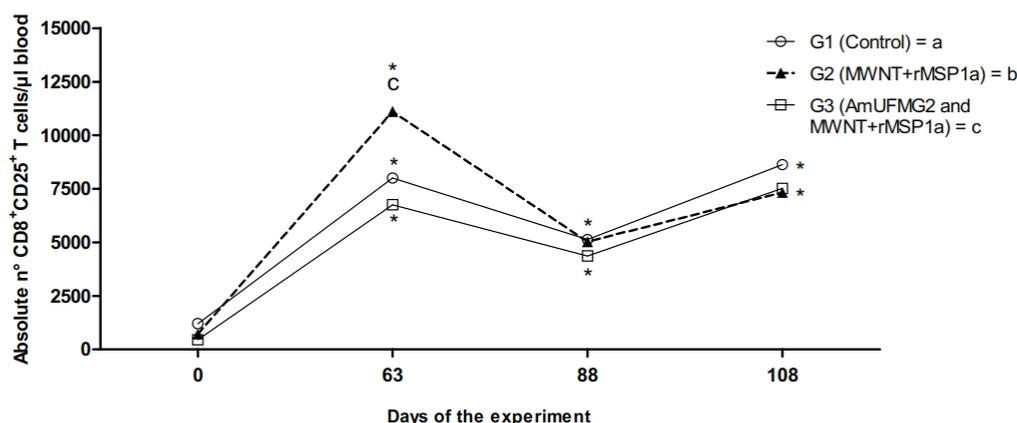
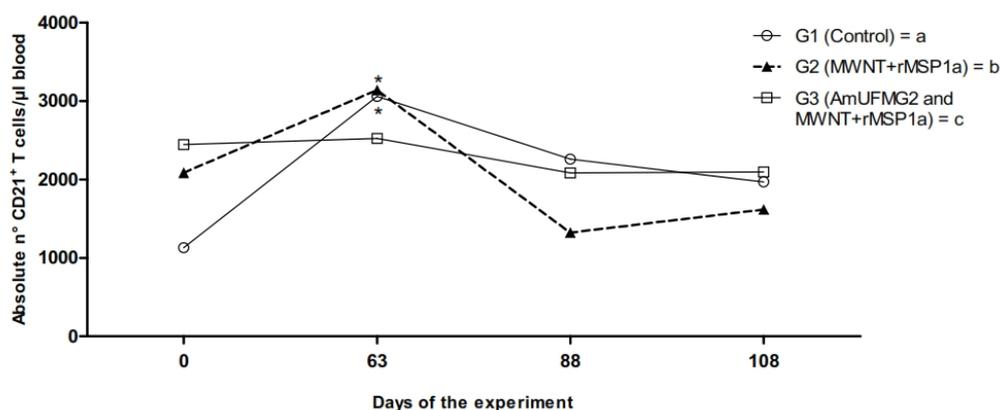


Figura 16 - Número absoluto de linfócitos T CD8⁺ ativados (CD8⁺CD25⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis (p<0.05). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo, segundo o teste de Friedman (p<0.05).

A figura 17 apresenta o efeito das imunizações e do desafio com *A. marginale* UFMG1 sobre a população de células B. Animais imunizados com AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a (G3) não apresentaram alterações significativas ao longo dos dias analisados. No dia 63 (pré-desafio), animais dos grupos G1 e G2 apresentaram um aumento significativo no número de células B circulantes em comparação com o dia 0 (p<0.05). No entanto, esse aumento foi seguido por uma redução acentuada, observada principalmente nos animais do grupo G2 (dia 88) (Figura 17). Nenhuma alteração

1 significativa foi observada entre os dias 88 e 108 em todos os grupos analisados
2 ($p > 0.05$).

3



4

5 **Figura 17** - Número absoluto de células B (CD21⁺) presente em cada microlitro de sangue total. Dia 0
6 (pré-imunização), dia 63 (pré-desafio), dia 88 (25 dias pós desafio - dpd) e dia 108 (45 dpd). As letras
7 representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis
8 ($p < 0.05$). (*) Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao dia 0 de cada grupo,
9 segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$).

10

11

12 Os dados obtidos durante a análise dos marcadores celulares revelaram que após o
13 desafio com a amostra *A. marginale* UFMG1 foram observados redução acentuada de
14 células NK, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados em todos os grupos, principalmente no
15 dia 88 do experimento. Essa redução significativa ocorreu de forma simultânea ao
16 aumento da riquetsemia. Durante o período de redução desses marcadores (entre os dias
17 63 e 88), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os
18 animais do G2 e G3, e o grupo controle (G1). Entretanto, animais do grupo G2,
19 imunizados apenas com MWNT+rMSP1a, apresentaram uma redução substancial dos
20 marcadores analisados em comparação aos demais grupos (Figuras 12-14, 16 e 17).

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **9.3 Resposta humoral induzida após o desafio com o isolado *A. marginale* UFMG1**

2 **9.3.1 IgG, IgG1 e IgG2 anti-rMSP1a**

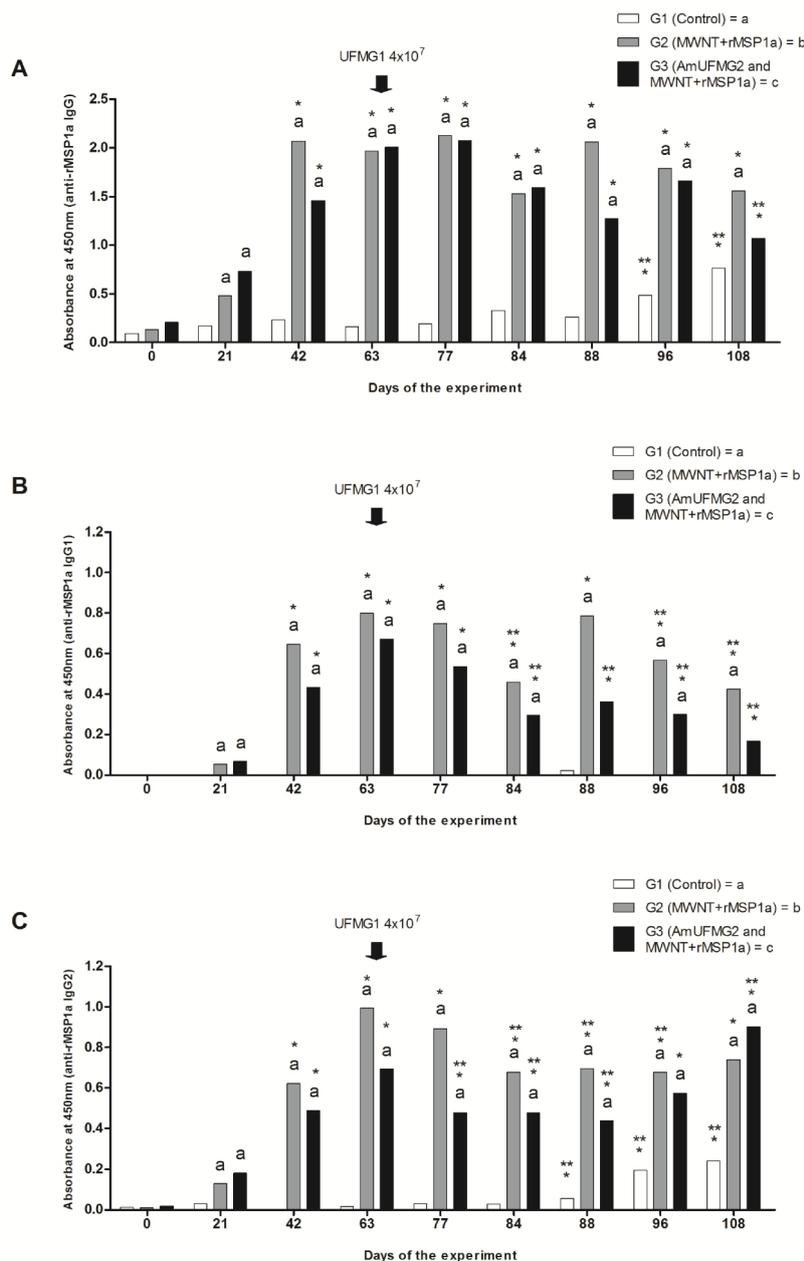
3

4 A figura 18A apresenta a cinética de anticorpos IgG anti-rMSP1a induzidos após as
5 imunizações e o desafio com isolado *A. marginale* UFMG1. Animais imunizados com
6 MWNT+rMSP1a (G2 e G3) apresentaram aumento constante de IgG anti-rMSP1a ao
7 longo das imunizações ($p < 0.05$). Após a primeira dose (dia 21), níveis superiores deste
8 anticorpo foram observados em relação ao grupo controle - G1 ($p < 0.05$). Não foram
9 observadas alterações significativas entre os animais dos grupos G2 e G3. Entretanto,
10 no dia 108 apenas o G2 foi superior estatisticamente ao grupo controle ($p < 0.05$) (Figura
11 18A).

12 Análise dos anticorpos IgG1 anti-rMSP1a induzidos ao longo do experimento está
13 representado na Figura 18B. A partir do dia 21, níveis superiores deste anticorpo foram
14 observados nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1 ($p < 0.05$). No dia 84 (21 dpd),
15 animais do G2 e G3 apresentaram queda significativa dos níveis de IgG1 anti-rMSP1a
16 em relação aos níveis observados no pré-desafio (dia 63) ($p < 0.05$). Nos animais do
17 grupo G3 esta redução se manteve ao longo dos pontos analisados. No grupo G2, um
18 aumento de IgG1 anti-rMSP1a foi observado no dia 88 (25 dpd), seguido de nova queda
19 nos pontos seguintes analisados ($p < 0.05$). No dia 108, apenas o grupo G2 apresentou
20 níveis superior estatisticamente em relação ao grupo controle - G1 ($p < 0.05$). O grupo
21 G1 não apresentou alterações significativas ao longo de todos os pontos analisados
22 ($p > 0.05$). (Figura 18B).

23 A análise do anticorpo IgG2 anti-rMSP1a revelou o mesmo padrão observado nas
24 análises anteriores: grupos G2 e G3 apresentando aumento constante deste anticorpo ao
25 longo das imunizações, sendo que a partir do dia 21 (primeira imunização) os níveis
26 observados foram superiores estatisticamente ao grupo controle ($p < 0.05$) (Figura 18C).
27 Após o desafio com isolado *A. marginale* UFMG1, animais do grupo G3 apresentaram
28 redução significativa de IgG2 anti-rMSP1a em relação aos níveis detectados no pré-
29 desafio (dia 63). Essa redução foi observada entre os dias 77, 84 e 88 do experimento
30 (14, 21 e 25 dpd, respectivamente). A partir do dia 96, um leve aumento de IgG2 anti-
31 rMSP1a foi observado no G3, sendo que no dia 108 os níveis deste anticorpo foram
32 superiores ao pré-desafio (dia 63) ($p < 0.05$). No grupo G2, essa redução nos níveis de

1 IgG2 anti-rMSP1a foi observada a partir de 21 dpd (dia 84) ($p < 0.05$), mantendo-se
 2 constante até o dia 96 (33 dpd). No dia 108, foi observado um leve aumento deste
 3 anticorpo. Ao final do experimento (dia 108) bezerros do grupo G3 apresentaram níveis
 4 superiores de IgG2 anti-rMSP1a em relação ao grupo G2, porém, essa diferença não foi
 5 considerada significativa ($p > 0.05$) (Figura 18C). Em relação ao grupo controle (G1),
 6 níveis significativos de IgG2 anti-rMSP1a foram observados a partir do dia 88 em
 7 relação aos dias 0 e 63 do mesmo grupo ($p < 0.05$).



8
 9 **Figura 18** - Cinética de anticorpos IgG (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) anti-rMSP1a induzidos em cada grupo
 10 após as imunizações e o desafio com isolado *A. marginale* UFMG1. (*) Representa diferença
 11 estatisticamente significativa em relação ao dia 0 do mesmo grupo e (**) diferença estatisticamente
 12 significativa em relação ao dia 63 do mesmo grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$).

1 Conforme observado no Capítulo I deste trabalho, ao longo das imunizações os
2 animais que receberam AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a (G3) apresentaram níveis
3 inferiores de anticorpos anti-rMSP1a em comparação com bezerros imunizados apenas
4 com MWNT+rMSP1a (G2). Após o desafio, uma redução acentuada de anticorpos,
5 principalmente IgG1 e IgG2 anti-rMSP1a, foi observada em ambos os grupos G2 e G3
6 (Figura 18B-C). Entretanto, apesar dessa redução os níveis de anticorpos no G2 e G3
7 foram superiores ao observado no grupo controle - G1 ($p < 0.05$).

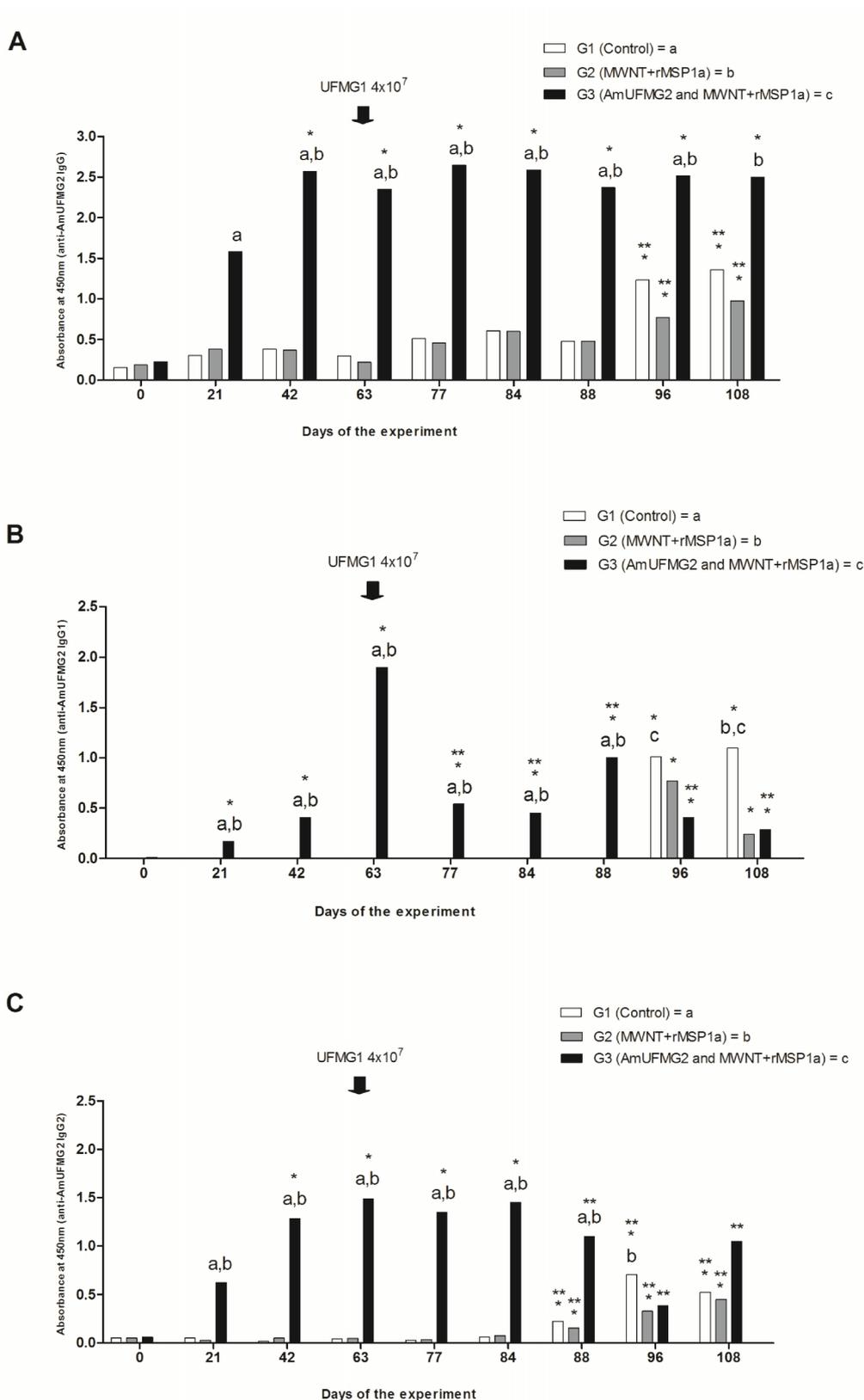
9 9.3.2 IgG, IgG1 e IgG2 anti-AmUFMG2

10
11 A análise dos anticorpos IgG anti-AmUFMG2 está representada na figura 19A. A
12 partir da segunda imunização (dia 42), animais do grupo G3 apresentaram níveis
13 superiores estatisticamente de anticorpos IgG anti-AmUFMG2 em comparação com os
14 grupos G1 e G2 ($p < 0.05$). Os títulos deste anticorpo se mantiveram elevados durante
15 todos os pontos analisados. Entretanto, no dia 108 (45 dpd) o grupo G3 foi considerado
16 superior estatisticamente apenas em relação ao grupo G2 ($p < 0.05$). Ambos os grupos
17 G1 e G2 apresentaram nos dias 96 e 108 aumento significativo nos níveis de IgG anti-
18 AmUFMG2 em relação aos dias 0 (pré-imunização) e 63 (pré-desafio) do mesmo grupo
19 ($p < 0.05$) (Figura 19A).

20 A figura 19B apresenta a cinética de produção de anticorpos IgG1 anti-AmUFMG2
21 entre os grupos ao longo do experimento. Uma acentuada redução de anticorpos IgG1
22 foi observada no grupo G3, logo após o desafio com o isolado *A. marginale* UFMG1
23 (dia 77) ($p < 0.05$). A taxa de redução deste anticorpo, entre os dias 63 e 77, foi de
24 71.6%. Durante os pontos seguintes (dia 84 a 108), os níveis de IgG1 anti-AmUFMG2
25 mantiveram-se baixos em relação ao pré-desafio (dia 63) ($p < 0.05$). Essa queda
26 observada no grupo G3 contribuiu para que, a partir do dia 96 (33 dpd), os níveis de
27 IgG1 anti-AmUFMG2 do grupo controle (G1) fossem considerados superiores
28 estatisticamente ao G3 ($p < 0.05$) (Figura 19B). No dia 96, o grupo G2 também
29 apresentou níveis superiores estatisticamente deste anticorpo em relação aos animais do
30 G3 ($p < 0.05$). No entanto, no dia 108 ambos G2 e G3 apresentaram níveis semelhantes
31 deste anticorpo ($p > 0.05$).

1 Após a análise do anticorpo IgG2 anti-AmUFMG2 foi possível observar que animais
2 do grupo G3 apresentaram níveis elevados deste marcador (Figura 19C). Entretanto, a
3 partir do dia 88 (25 dpd) os títulos de IgG2 anti-AmUFMG2 foram considerados
4 estatisticamente inferiores em comparação com os dados obtidos no dia 63 (pré-
5 desafio) ($p < 0.05$). No dia 96, o grupo controle (G1) apresentou níveis superiores deste
6 anticorpo em comparação com os grupos G2 e G3, porém, esta diferença foi
7 considerada significativa apenas em relação ao grupo G2 ($p < 0.05$). (Figura 19C).

8 A análise da resposta humoral demonstrou redução dos títulos de anticorpos anti-
9 rMSP1a e anti-AmUFMG2, observada nos grupos G2 e G3. Esta redução foi observada
10 logo após o desafio dos animais, no mesmo período onde um aumento da riquetsemia
11 foi registrado. No grupo G3, esta redução foi observada principalmente em relação aos
12 níveis de IgG1 anti-AmUFMG2.



1

2 **Figura 19** - Cinética de anticorpos IgG (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) anti-AmUFMG2 induzidos em cada
 3 grupo após as imunizações e o desafio com isolado *A. marginale* UFMG1. (*) Representa diferença
 4 estatisticamente significativa em relação ao dia 0 do mesmo grupo e (**) diferença estatisticamente
 5 significativa em relação ao dia 63 do mesmo grupo, segundo o teste de Friedman ($p < 0.05$).
 6

1 **10. DISCUSSÃO**

2

3 Anaplasmosse bovina causada pelo *A. marginale* é considerada, em nível mundial, a
4 doença riquetsial mais importante que acomete os bovinos (Jongejan & Uilenberg 2004,
5 Ducken et al. 2015). Apesar da riqueza de informações moleculares observadas
6 atualmente e o impacto global negativo na saúde do rebanho e na pecuária de diversos
7 países, o desenvolvimento de vacinas que possam induzir a proteção clínica dos animais
8 ainda permanece pendente (Quiroz-Castañeda et al. 2016).

9 Diversos esforços e tentativas vêm sendo realizados na busca de uma vacina eficaz.
10 Entretanto, a principal limitação para o desenvolvimento de imunógenos contra *A.*
11 *marginale* está relacionado com a identificação de antígenos protetores (Ducken et al.
12 2015). Os protocolos vacinais mais bem sucedidos utilizaram antígenos presentes na
13 membrana externa de *A. marginale*, os quais são considerados importantes para a
14 penetração da riquetsia nas células do hospedeiro (Tebele et al. 1991; Brown et al. 1998;
15 Noh et al. 2010).

16 Devido ao fato da MSP1 α ser considerada importante durante a adesão de *A.*
17 *marginale* nos eritrócitos bovinos e ser uma proteína conservada durante a fase aguda e
18 persistente da infecção (Kocan et al. 2003; de la Fuente et al. 2007), sua utilização como
19 antígeno vacinal atraiu a atenção de diversos pesquisadores (Palmer et al. 1986, 1988,
20 1989; McGuire et al. 1994a, 1994b; Brown et al. 2002; de la Fuente et al. 2003; Kocan
21 et al. 2003; Torina et al. 2014; Santos et al. 2013; Silvestre et al. 2014). Dados recentes
22 do nosso grupo de pesquisa mostraram que a imunização de camundongos e bezerros
23 com a proteína rMSP1 α , utilizando MWNT como molécula carreadora, foi capaz de
24 induzir resposta celular e humoral significativa, abrindo novas perspectivas com relação
25 a utilização da vacina produzida *in vitro* para o controle da doença clínica em bovinos
26 adultos (Silvestre et al. 2014; dados Capítulo I). Logo, o presente trabalho teve como
27 objetivo avaliar o efeito da imunização de bezerros com MWNT+rMSP1 α , associado
28 com a vacina inativada de *A. marginale* produzida *in vitro*, na indução da resposta
29 imunológica, no controle da riquetsemia e no desenvolvimento da doença clínica após
30 desafio experimental com amostra heteróloga *A. marginale* UFMG1.

31 Após as imunizações com os diferentes protocolos, os animais foram desafiados com
32 4×10^7 eritrócitos infectados com o isolado *A. marginale* UFMG1. Com o objetivo de

1 garantir a viabilidade da amostra, o inóculo utilizado para o desafio dos animais foi
2 submetido a duas passagens sucessivas em bezerros esplenectomizados, uma vez que a
3 amostra estava armazenada em botijão de nitrogênio líquido. Em geral, este método de
4 criopreservação é um método muito vantajoso para preservar a integridade celular
5 durante períodos de tempo indefinido (Bastos et al. 2006), entretanto, a infectividade do
6 inóculo pode apresentar-se reduzida logo após a sua reativação.

7 Durante o período seguinte ao desafio, parâmetros clínicos como a temperatura retal,
8 VG e riquetsemia foram avaliados. Todos os bezerros desafiados apresentaram sinais
9 clínicos da anaplasnose bovina, tais como o aumento da temperatura, redução de
10 hematócrito, letargia, redução do apetite, icterícia e riquetsemia patente, sendo
11 necessária a utilização do protocolo de tratamento em todos os grupos. O período de
12 incubação foi de 16 dias para o grupo somente desafiado (G1) e 17 dias para os animais
13 dos grupos G2 (imunizados com MWNT+rMSP1a) e G3 (AmUFMG2 e
14 MWNT+rMSP1a).

15 Segundo Kocan et al. (2010), o período de incubação de *A. marginale* é variável e
16 depende da dose infectante/via de administração utilizada, apresentando um período
17 variável entre sete a 60 dias (média de 28). Em trabalhos anteriores, o isolado UFMG1,
18 após duas passagens sucessivas em bezerros esplenectomizados e em condições
19 experimentais controladas, apresentou período de incubação de 24 dias quando utilizado
20 na dose de 2×10^7 eritrócitos infectados, via intravenosa (Bastos et al. 2010). No trabalho
21 de Mendonça (2015), realizado em condições naturais a campo, a inoculação de
22 bezerros com 2×10^6 eritrócitos infectados com isolado UFMG1 criopreservado, via
23 subcutânea, apresentou um período de incubação médio de 48 dias. No presente
24 trabalho, o período de incubação de *A. marginale* foi menor em comparação com
25 trabalhos anteriores que utilizaram o isolado UFMG1. Este fato pode ser justificado pela
26 dose utilizada (4×10^7), a via de administração (via intravenosa) e as duas passagens
27 sucessivas em bezerros esplenectomizados. Tais fatores podem ter contribuído para o
28 aumento da infectividade do inóculo, possibilitando a redução do período de incubação
29 e o aumento da intensidade dos sintomas clínicos observados em todos os grupos.

30 Apesar de todos os animais terem apresentado os sintomas clínicos da anaplasnose e
31 necessitarem de tratamento, algumas particularidades foram observadas entre os grupos
32 experimentais em relação aos parâmetros clínicos analisados. Animais somente
33 desafiados (G1) apresentaram uma maior intensidade dos sinais clínicos, sendo

1 observada uma maior taxa de redução de VG e um período de recuperação (PC)
2 superior ao grupo G3. Outro fato importante que deve ser destacado é que dois bezerros
3 do grupo G1 (2/5) apresentaram condições clínicas desfavoráveis à recuperação, mesmo
4 após o tratamento com enrofloxacina (um óbito e uma transfusão sanguínea). Tanto os
5 grupos G1 e G2 apresentaram valores de escore clínico considerado de grau intenso. Em
6 contrapartida, bezerros imunizados com AmUFMG2 e MWNT+rMSP1a (G3)
7 apresentaram uma melhor capacidade de recuperação do VG (PC menor) e redução
8 significativa nos níveis de riquetsemia em comparação aos grupos G1 e G2: redução de
9 54.05% em relação ao G1 e 52.28% em relação ao G2. Além disso, a doença nestes
10 animais foi considerada de grau moderado, uma vez que os mesmos apresentaram uma
11 redução significativa nos valores de escore clínico em comparação com o grupo
12 controle (G1).

13 A análise conjunta destes dados indica que a associação entre MWNT+rMSP1a com
14 antígenos presentes na vacina inativada foi capaz de induzir a redução da carga
15 parasitária, bem como proporcionar a melhora do quadro clínico, tal como observado
16 nos animais do grupo G3. Segundo Ducken et al. (2015), a combinação de várias das
17 proteínas de superfície de *A. marginale* são responsáveis pela indução de uma resposta
18 imune eficiente no hospedeiro e o uso de apenas uma (rMSP1a) pode não ter sido
19 suficiente para gerar uma resposta protetora.

20 Outro fator que pode ter contribuído para a baixa proteção clínica dos animais
21 imunizados foi a alta dose do desafio utilizada. Segundo Pacheco et al. (2004), o desafio
22 com uma dose única, com alta carga parasitária, não mimetiza as infecções naturais
23 onde os animais são continuamente expostos a baixas concentrações de *A. marginale*
24 durante longos períodos de tempo. Logo, a utilização de uma subdose durante o desafio
25 poderia ter contribuído para a uma melhora considerável das condições clínicas dos
26 animais imunizados com MWNT+rMSP1a, e os parâmetros observados poderiam ter
27 sido melhores ao que foi observado neste trabalho.

28 Apesar do grupo G3 ter apresentado melhor quadro clínico e redução de mais de
29 50% da riquetsemia, a queda no VG foi intensa tanto quanto ao observado nos grupos
30 G1 e G2. Este resultado sugere que a doença clínica, caracterizada principalmente pela
31 anemia progressiva, não depende da carga parasitária e que a imunopatologia da
32 anaplasnose pode estar relacionada com fatores imunológicos induzidos pela riquetsia
33 durante a fase aguda da doença.

1 A relação entre processos autoimunes e a patogênese da anemia na anaplasmoze
2 bovina tem sido descrita em trabalhos anteriores. Kreier et al. (1964) demonstraram que
3 a eritrofagocitose, iniciada pelo dano provocado pela infecção na membrana dos
4 eritrócitos, foi vista primeiramente na medula óssea sete dias antes do pico da infecção,
5 permanecendo até cinco dias após o pico máximo, sugerindo a presença de
6 autoanticorpos anti-eritrocíticos como a provável causa da anemia. Schroeder et al.
7 (1965) demonstraram a presença de autoanticorpos livres no soro de animais durante a
8 fase aguda da anaplasmoze, capazes de reconhecerem antígenos presentes na membrana
9 de eritrócitos normais (não infectados) e eritrócitos tratados com tripsina, sugerindo a
10 possibilidade de que estes componentes possam atuar como autoantígenos. De acordo
11 com os autores, esse complexo antigênico poderia desencadear a produção de
12 autoanticorpos, que, uma vez estimulados, seriam capazes de reagir com componentes
13 de eritrócitos normais na ausência de *Anaplasma*. Giardina et al. (1993) descreveram o
14 encontro de proteínas da riquetsia na superfície dos eritrócitos bovinos; e De et al.
15 (2012) acreditam que os metabólitos gerados por *A. marginale* induzem danos na
16 membrana da célula hospedeira.

17 Considerando os dados apresentados neste trabalho, é possível que a anemia
18 observada nos animais do grupo G3 seja reflexo da formação de anticorpos reativos a
19 componentes da membrana de eritrócitos que atuariam na lise e/ou remoção de células
20 não infectadas, agravando o quadro anêmico dos animais, independentemente da
21 quantidade de hemácias infectadas. Essa remoção pode ocorrer por meio da
22 identificação de antígenos de *Anaplasma* depositados na membrana de células
23 infectadas ou não infectadas, por meio do reconhecimento de antígenos próprios da
24 membrana destes eritrócitos e/ou por efeito do sistema complemento. Assim, novos
25 estudos devem ser realizados visando identificar o papel dos anticorpos e do sistema
26 complemento na remoção eritrocitária durante a infecção por *A. marginale*.

27 Devido ao fato de *A. marginale* não se desenvolver dentro de células que expressam
28 moléculas de MHC, acredita-se que a imunidade protetora requer a ativação de células
29 T CD4⁺ e a participação de anticorpos neutralizantes (Brown 2012). Para avaliar a
30 dinâmica desses marcadores, a análise de diferentes populações celulares foi realizada
31 durante o experimento. Ao longo das imunizações foi observado um padrão de resposta
32 celular que reproduz os dados observados no Capítulo I deste trabalho, onde bezerros
33 imunizados apenas com MWNT+rMSP1a (G2) apresentaram um aumento substancial

1 no número absoluto de células NK circulantes (CD335⁺), linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺
2 ativados (CD4⁺CD25⁺ e CD8⁺CD25⁺, respectivamente), e células B (CD21⁺).
3 Entretanto, após o desafio foi observada redução acentuada de linfócitos T,
4 principalmente no grupo G2. Essa redução ocorreu em período simultâneo ao aumento
5 da riquetsemia, sugerindo que durante a multiplicação *A. marginale* induz mecanismos
6 imunossupressores capazes de reduzir a população de linfócitos T nos animais
7 infectados.

8 Estudos anteriores relataram que *Anaplasma* induz mecanismos capazes de suprimir
9 a ação da resposta imune inata e adaptativa. Estes mecanismos incluem a variação
10 antigênica de proteínas de superfície imunodominantes (MSP2 e MSP3) para evadir das
11 respostas imunes específicas, e a subversão da resposta imune adaptativa (Brown 2012).
12 Abbott et al. (2005) demonstraram que bovinos imunizados com a proteína MSP2
13 nativa e desafiados com isolado de *A. marginale* no qual expressa a mesma variante da
14 MSP2 utilizada nas imunizações, apresentaram perda significativa na resposta de
15 células T CD4⁺ MSP2-específicas. Essa redução também ocorreu imediatamente após o
16 início da riquetsemia, sendo determinada pela perda da capacidade proliferativa e pela
17 redução de células que secretam IFN- γ . Segundo os autores, estes dados sugerem uma
18 mudança de células secretoras de IL2⁺IFN⁺ para células IL2⁻IFN⁺, que interrompem a
19 proliferação e são direcionadas para a apoptose. Esta perda da resposta de células T
20 CD4⁺ antígeno-específicas, induzidas pela imunização, também foi relatada em ensaios
21 vacinais utilizando a proteína MSP1a (Han et al. 2008) e a membrana externa de *A.*
22 *marginale* purificada (Han et al. 2010). Nestes trabalhos, uma rápida deleção de células
23 T CD4⁺ *A. marginale*-específicas foi observada logo após o desafio, indicando falha no
24 estabelecimento de uma forte resposta de células T de memória.

25 No presente estudo, após o tratamento dos animais foi possível observar aumento dos
26 marcadores celulares analisados, indicando que a supressão da resposta de células T foi
27 dependente da presença da riquetsia. Tais resultados corroboram com os achados de
28 Reinbold et al. (2010) e Turse et al. (2014), nos quais observaram que a eliminação da
29 infecção com antibióticos foi capaz de restaurar a resposta de células T contra *A.*
30 *marginale*. Estes resultados sugerem que o poder imunossupressor de *A. marginale* foi
31 maior do que a resposta celular induzida durante as imunizações dos animais,
32 permitindo assim sua multiplicação e, conseqüentemente, o aumento da riquetsemia.

1 Para avaliar o efeito imunomodulatório induzido por *A. marginale*, a análise da
2 população de células T CD4⁺ regulatórias (CD4⁺CD25⁺Fox⁺) também foi realizada.
3 Animais dos grupos controle (G1) e G2 (MWNT+rMSP1a) apresentaram valores
4 superiores deste marcador em comparação com o grupo G3 (AmUFMG2 e
5 MWNT+rMSP1a). Este resultado suporta os dados de riquetsemia, nos quais níveis
6 superiores de corpúsculos de *A. marginale* foram observados nos animais do G1 e G2.
7 Apesar da análise da produção de IL-10 não ter sido realizada neste trabalho, estes
8 dados indicam que a redução da carga parasitária observada nos animais do grupo G3
9 pode estar relacionada com os baixos valores de CD4⁺CD25⁺Fox⁺ encontrados e a
10 indução de uma resposta pró-inflamatória capaz de controlar a infecção.

11 Para investigar o papel da resposta humoral no controle da infecção, a análise de
12 anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-rMSP1a e anti-AmUFMG2 foi realizada. Acredita-se
13 que os anticorpos agem na neutralização da riquetsia extracelular, durante o processo de
14 invasão de novos eritrócitos, ou por meio da opsonização de *A. marginale* que, então,
15 são alvos da fagocitose por macrófagos (Brown 2012). Apesar dos títulos mais elevados
16 de anticorpos anti-rMSP1a, animais do grupo G2 desenvolveram riquetsemia mais
17 elevada do que o grupo G3. Este resultado reforça a hipótese de que a imunização com
18 um único antígeno (rMSP1a) não foi suficiente para induzir uma resposta protetora nas
19 condições utilizadas neste trabalho. As análises de anticorpos IgG1 anti-AmUFMG2
20 revelaram uma redução acentuada deste anticorpo nos animais do grupo G3, logo após o
21 desafio dos animais. No mesmo período, níveis elevados de IgG2 anti-AmUFMG2
22 foram observados. Em bovinos, a expressão de IL-4 induz a produção de IgG1,
23 enquanto que IFN- γ produzido induz a produção de IgG2 (Estes et al. 1994, 1995).
24 Apesar de ambas as citocinas não terem sido avaliadas, os resultados apresentados
25 indicam a estimulação predominantemente do tipo-1 nos animais do grupo G3,
26 justificando a redução da riquetsemia.

27 De maneira geral, a redução dos títulos de anticorpos anti-rMSP1a e anti-
28 AmUFMG2 observada nos grupos G2 e G3, logo após o desafio, pode estar associada à
29 disfunção de células T CD4⁺ observada neste estudo, uma vez que estas células são
30 importantes para a ativação de células B e, conseqüentemente, a produção de
31 imunoglobulinas (Brown et al. 1999). Han et al. (2010) também demonstraram uma forte
32 resposta de IgG1 e IgG2 que flutuou ao longo do curso da infecção aguda e persistente.

1 Juntos, estes resultados suportam a supressão da resposta imune adaptativa durante a
2 infecção e multiplicação de *A. marginale*, observada principalmente no grupo
3 imunizado apenas com um antígeno (MWNT+rMSP1a - G2). Entretanto, animais
4 imunizados com os antígenos de *A. marginale* produzidos *in vitro* (AmUFMG2)
5 associado com MWNT+rMSP1a (G3) apresentaram uma redução significativa dos
6 níveis de riquetsemia, quadro clínico moderado, melhor capacidade de recuperação do
7 VG e forte resposta de IgG2. Estes resultados sugerem que a combinação de antígenos
8 presentes no imunógeno recebido pelos animais do grupo G3 foi capaz de proteger os
9 animais da doença grave, permitindo que novas abordagens sejam realizadas utilizando
10 a vacina inativada produzida *in vitro* associada com rMSP1a.

11 O desenvolvimento de vacinas contra *A. marginale* apresenta como obstáculo a
12 capacidade da riquetsia em modular a resposta do hospedeiro, por meio da deleção e/ou
13 anergia de uma resposta previamente elucidada de células T MSP-específica para *A.*
14 *marginale*, levando a uma resposta de memória fraca apesar dos altos títulos de
15 anticorpos *A. marginale*-específicos, que não conseguem eliminar a infecção (Brown
16 2012). Estudos que permitam a melhor compreensão dos mecanismos de regulação
17 imunológica são essenciais para a identificação de antígenos imunossupressores e,
18 conseqüentemente, o desenvolvimento de vacinas capazes de induzir uma resposta
19 imune duradoura.

20

21

1 **11. CONCLUSÕES**

2

3 - A imunização de bezerros com MWNT+rMSP1 α induz aumento da resposta celular e
4 humoral, mas insuficiente para proteger os animais do desafio experimental com isolado
5 heterólogo de *A. marginale* UFMG1.

6

7 - A infecção experimental por *A. marginale* UFMG1 (4×10^7) induz rápida perda de
8 resposta de células T de forma simultânea ao pico de ricketsemia.

9

10 - Animais imunizados com a associação de antígenos AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α
11 apresentam menor ricketsemia, maior capacidade de recuperação do VG e doença
12 clínica moderada ao serem desafiados com amostra UFMG1.

13

14 - A imunização com AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α induz altos níveis de anticorpos
15 IgG2.

16

17 - Bezerros imunizados com AmUFMG2 e MWNT+rMSP1 α apresentam, após desafio
18 experimental com amostra UFMG1, queda de VG similar ao observado no grupo
19 controle.

20

21 - MWNTs não induzem alterações no perfil bioquímico da função renal e hepática dos
22 animais após as imunizações com esta nanopartícula.

23

XII – PERSPECTIVAS

1 **12. PERSPECTIVAS**

2

3 Os resultados obtidos no presente estudo abrem novas possibilidades para utilização
4 da vacina inativada de *A. marginale*. Novos estudos deverão ser realizados visando:

5

6 ■ Identificação de novos alvos vacinais e sua utilização de forma associada à
7 rMSP1a, visando a indução de uma resposta imune protetora;

8

9 ■ Identificação de antígenos de *A. marginale* imunossupressores, capazes de
10 modular a resposta de células T após a infecção;

11

12 ■ Avaliação de auto-anticorpos presentes no soro dos animais imunizados com
13 AmUFMG2.

14

15

XIII – REFERÊNCIAS

1 **13. REFERÊNCIAS**

- 2 Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick P, Howard CJ, Hope JC, Brown WC
3 2005. Rapid and long-term disappearance of CD4⁺ T-lymphocyte responses specific for
4 *Anaplasma marginale* major surface protein2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following
5 challenge with live *A. marginale*. *J Immunol* 174: 6702–6715.
6
- 7 Agnes JT, Herndon D, Ueti MW, Ramabu SS, Evans M, Brayton KA, Palmer GH 2010.
8 Association of pathogen strain-specific gene transcription and transmission efficiency
9 phenotype of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 78(6): 2446-2453.
10
- 11 Alleman AR, Barbet AF 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface
12 protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J Clin Microbiol* 34(2): 270-276.
13
- 14 Araújo FR, Costa CM, Ramos CAN, Farias TA, de Souza IIF, Melo ESP, Elisei
15 C, Rosinha GM, Soares CO, Fragoso SP, Fonseca AH 2008. IgG and IgG2 antibodies
16 from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant
17 vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. *Mem Inst*
18 *Oswaldo Cruz* 103(2): 186-190.
19
- 20 Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM,
21 Riley EM 2003. Activation of a Subset of Human NK Cells upon Contact with
22 *Plasmodium falciparum*- Infected Erythrocytes. *J Immunol* 171: 5396–5405.
23
- 24 Arteche CCP 1992. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso
25 de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa de *Anaplasma*. *A Hora Veterinária* 66(11):
26 39-42.
27
- 28 Aubry P, Geale DW 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*
29 58: 1-30.
30

- 1 Barbet AF, Blentlinger R, Yi JY, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM 1999.
2 Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick
3 salivary glands, and cattle. *Infect Immun* 67(1): 102-107.
4
- 5 Barbet AF, Whitmire WM, Kamper SM, Simbi BH, Ganta RR, Moreland AL, Mwangi
6 DM, McGuire TC, Mahan SM 2001. A subset of *Cowdria ruminantium* genes important
7 for immune recognition and protection. *Gene* 275(2): 287-298.
8
- 9 Bastos CV, das Vasconcelos MMC, Ribeiro MFB, Passos LMF 2006. Use of
10 refrigeration as a practical means to preserve viability of *in vitro*-cultured IDE8 tick
11 cells. *Exp Appl Acarol* 39(3): 347-352.
12
- 13 Bastos CV, Passos LFM, Facury-Filho EJ, Rabelo EM, de la Fuente J, Ribeiro MFB
14 2010. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of
15 *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet J* 186: 374-378.
16
- 17 Bastos CV, Passos LFM, Vasconcelos MMC, Ribeiro MFB 2009. *In vitro* establishment
18 and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8
19 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz J Microb* 9: 399-403.
20
- 21 Bell-Sakyi L, Palomar AM, Bradford EL, Shkap V 2015. Propagation of the Israeli
22 vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Vet Microbiol* 179(3): 270-276.
23
- 24 Benesi FJ, Howard DL, Sá CSC, Junior EHB 1999. Relato de um caso de transmissão
25 transplacentária de anaplasmoze bovina. Observações clínico-laboratoriais. *R Bras Ci*
26 *Vet* 6: 175-176.
27
- 28 Benesi FJ, Teixeira C, Leal ML, Lisboa JA, Mirandola R, Shecaira CL, Gomes V 2012.
29 Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. *Pesq Vet Bras*
30 32(4): 352-356.
31
- 32 Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD, Prato M 2005. Biomedical applications of
33 functionalised carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* 5: 571-577.

- 1 Bock RE, de Vos AJ 2001. Immunity following use of australian tick fever vaccine: a
2 review of the evidence. *Aust Vet J* 79(12): 832-839.
3
- 4 Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
5 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:
6 248-254.
7
- 8 Brayton KA, Meeus PF, Barbet AF, Palmer GH 2003. Simultaneous variation of the
9 immunodominant outer membrane proteins, MSP2 and MSP3, during *Anaplasma*
10 *marginale* persistence *in vivo*. *Infect Immun* 71: 6627–6632.
11
- 12 Brayton KA, Palmer GH, Brown WC 2006. Genomic and proteomic approaches to
13 vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Rev Vaccines* 5(1):
14 95-101.
15
- 16 Brock VW, Kliwer IO, Pearson CC 1965. A vaccine for anaplasmosis. *J Am Vet Med*
17 *Ass* 147: 948-951.
18
- 19 Brown WC 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune
20 dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comp Immunol Microbiol Infect*
21 *Dis* 35(3): 241-252.
22
- 23 Brown WC, McElwain TF, Palmer GH, Chantler SE, Estes DM 1999. Bovine CD4⁺ T-
24 lymphocyte clones specific for rhoptry associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia*
25 *bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. *Infect*
26 *Immun* 67: 155–164.
27
- 28 Brown WC, McGuire TC, Mwangi W, Kegerreis KA, Macmillan H, Lewin HA, Palmer
29 GH 2002. Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4⁺ T
30 lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale*
31 major surface protein 1a. *Infect Immun* 70(10): 5521–5532.
32

- 1 Brown WC, Palmer GH, Lewin HA, McGuire TC 2001. CD4(+) T lymphocytes from
2 calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a
3 heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a
4 carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect Immun* 69(11): 6853-6862.
5
- 6 Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH 1998.
7 CD4+ T lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with
8 *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge.
9 *Infect Immun* 66: 5406–5413.
10
- 11 Campos OF 1985. Criação de bezerros até a desmama. Coronel Pacheco:
12 CNPGL/Embrapa, 77 pp.
13
- 14 Cantor GH, Pontzer CH Palmer GH 1993. Opsonization of *Anaplasma marginale*
15 mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Vet Immunol*
16 *Immunopathol* 37: 343–350.
17
- 18 Chen Q, Amaladoss A, Ye W, Liu M, Dummler S, Kong F, Wong LH, Loo HL, Loh
19 E, Tan SQ, Tan TC, Chang KT, Dao M, Suresh S, Preiser PR, Chen J 2014. Human
20 natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red
21 blood cells. *Proc Natl Acad Sci* 111(4): 1479-1484.
22
- 23 Coetzee JF, Apley MD, Kocan KM 2006. Comparison of the efficacy of enrofloxacin,
24 imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale*
25 infections in cattle. *Vet Ther* 7(4): 347-360.
26
- 27 Coronado A 2001. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*?
28 Technical note. *Revista Científica FCV-LUZ* 11(5): 408-411.
29
- 30 Dark MK, Al-Khedery B, Barbet AF 2011. Multistrain genome analysis identifies
31 candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 29: 4923-4932.
32

- 1 de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2001. Differential adhesion of
2 major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale*
3 to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 31(2): 145-153.
4
- 5 de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2003. Characterization of the
6 functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia
7 *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol* 91(2-3): 265-283.
8
- 9 de la Fuente J, Kocan KM 2001. Expression of *Anaplasma marginale* major surface
10 protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infect Immun* 69: 5151–5156.
11
- 12 de la Fuente J, Kocan KM, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Claypool PL, Saliki JT 2002.
13 Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and
14 bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet Microbiol*
15 89(2-3): 239-251.
16
- 17 de la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T,
18 Mangold AJ, Almazán C, Naranjo V, Gortázar C, Torina A, Caracappa S, García-Pérez
19 AL, Barra M, Oporto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM 2005. Genetic
20 diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for
21 anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 6: 75-89.
22
- 23 de la Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Vicente J, Estrada-Penã AN, Almazán C,
24 Kocan KM, Martín MP, Gortázar C 2004. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid
25 ticks (Acari: Ixodidae) collected from wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer
26 (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur J Wildlife Res* 50: 187–196.
27
- 28 Dikmans G 1950. The transmission of Anaplasmosis. *Am J Vet Res* 11(38): 5-16.
29
- 30 Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW,
31 Chen FF 2005. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall
32 carbon nanotubes and nanoonions on human skin fibroblast. *Nano Lett* 5(12): 2448-
33 2464.

- 1 Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Charlier JC, Hernandez E 2004. Electronic, thermal
2 and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*
3 362: 2065-2098.
4
- 5 Ducken DR, Brown WC, Alperin DC, Brayton KA, Reif KE, Turse JE, Palmer GH,
6 Noh SM 2015. Subdominant Outer Membrane Antigens in *Anaplasma marginale*:
7 Conservation, Antigenicity, and Protective Capacity Using Recombinant Protein. *PLoS*
8 *One* 10(6): e0129309. doi:10.1371/journal.pone.0129309.
9
- 10 Estes DM, Closser NM, Allen GK 1994. IFN-1 γ stimulates IgG2 production from
11 bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cell Immunol* 154: 287–295.
12
- 13 Ewing SA 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proceedings
14 of the 7th National Anaplasmosis Conference, 1981, Mississippi State University,
15 Mississippi State. Mississippi State University 395-423.
16
- 17 Facury-filho EJ, Carvalho AU, Ferreira PM, Moura MF, Apolinário BC, Santos LPH,
18 Ribeiro MFB 2012. Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-
19 induced bovine anaplasmosis. *Rev Bras Parasitol Vet* 21(1): 32-36.
20
- 21 Feng HM, Popov VL, Yuoh G, Walker DH 1997. Role of T lymphocyte subsets in
22 immunity to spotted fever group rickettsiae. *J Immunol* 158: 5314–5320.
23
- 24 Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Santiago C, Mosqueda JJ, Veja CA,
25 Buening GM 1998. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated
26 in an endemic area for hemoparasitic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 849(1): 1-10.
27
- 28 Foil LD 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today* 5(3): 88-96.
29
- 30 Foldvari M, Bagonluri M 2008. Carbon nanotubes as functional exipients for
31 nanomedicines: II Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine* 4(3): 183-
32 200.
33

- 1 French DM, Brown WC, Palmer GH 1999. Emergence of *Anaplasma marginale*
2 antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 67(11): 5834-5840.
3
- 4 French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH 1998. Expression of *Anaplasma*
5 *marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect*
6 *Immun* 66(3): 1200-1207.
7
- 8 Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Blouin EF, Johnson TJ, Halbur T, Onet VC, Saliki
9 JT, Kocan KM 2004. Differential expression of the MSP1 alpha gene
10 of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Vet Microbiol*
11 98(3-4): 261-272.
12
- 13 Ge NK, Kocan KM, Blouin EF, Murphy GL 1996. Developmental studies of
14 *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni*
15 (Acari: Ixodidae) infected as adults using non-radioactive in situ hybridization. *J Med*
16 *Entomol* 33: 911-920.
17
- 18 Grau HEG, Cunha Filho NA, Pappen FG, Farias NAR 2013. Transmissão
19 transplacentária de *Anaplasma marginale* em bovinos de corte cronicamente infectados
20 no sul do Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 22(2): 189-193.
21
- 22 Guglielmone AA 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and
23 Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-119.
24
- 25 Han S, Norimine J, Brayton KA, Palmer GH, Scoles Brown WC 2010. *Anaplasma*
26 *marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional
27 memory CD4⁺ T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clin Vaccine*
28 *Immunol* 17: 1881–1890.
29
- 30 Han S, Norimine J, Palmer GH, Mwangi W, Lahmers KK, Brown WC 2008. Rapid
31 deletion of antigen-specific CD4⁺ T cells following infection represents a strategy of
32 immune evasion and persistence for *Anaplasma marginale*. *J Immunol* 181: 7759–7769.
33

- 1 Helland A, Wick P, Koehler A, Schmid K, Som C 2007. Reviewing the environmental
2 and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Cienc saude coletiva* 13(2):
3 441-452.
4
- 5 Hennrich F, Chan C, Moore V, Rolandi M, O'Connell MJ 2006. The element carbon. In
6 O'Connell MJ (eds.), *Carbon Nanotubes: Properties and Applications*. Taylor & Francis
7 Group, Boca Raton, Flórida, p. 1-18.
8
- 9 Hiszczynska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Oledzka G, Kur J, Bickerstaffe R, Stankiewicz M
10 2010. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine
11 encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp*
12 *Parasitol* 124(4): 365-372.
13
- 14 IICA – Instituto Interamericano de Cooperación para a Agricultura 1987. Técnicas para
15 el diagnostico de babesiosis y anaplasmosis bovine. San José, Costa Rica, 79 pp.
16
- 17 Iijima S 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56-58.
18
- 19 Jiang K, Schadler LS, Siegel RW, Zhang X, Zhang H, Terrones M 2003. Protein
20 immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated
21 amidation. *J Mater Chem* 14: 37–39.
22
- 23 Jongejan F, Uilenberg G 2004. The global importance of ticks *Parasitology* 129: S3–
24 S14.
25
- 26 Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK, Morton JM, Stear ML 2012. Is endemic stability
27 of tick-borne disease in cattle a useful concept?. *Trends in parasitology* 28(3): 85-89.
28
- 29 Joselevich E, Daí H, Liu J, Hata K, Windle AH 2008. Carbon nanotube synthesis and
30 organization. In: Jorio A, et al. *Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis,*
31 *Struture, Properties and Applications*. Springer. *Topics in Apllied Phuyics* 111: 101-
32 164.
33

- 1 Junior DSG, Araujo FR, Almeida NF, Adi SS, Cheung LM, Fragoso SP, Ramos
2 CA, Oliveira RH, Santos CS, Bacanelli G, Soares CO, Rosinha GM, Fonseca AH 2010.
3 Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*.
4 *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(7): 843-849.
5
- 6 Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H 2004. Nanotube molecular transporters:
7 internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J Am Chem*
8 *Soc* 126: 6850-6851.
9
- 10 Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A 2006. Functionalized carbon nanotubes as
11 emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 1758:
12 404-412.
13
- 14 Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF 2000. Anaplasmosis control - Past, present, and
15 future. In: Tropical Veterinary Diseases: Control and Prevention in the Context of the
16 New World Order 2000. *Ann N Y Acad Sci* 916: 501-509.
17
- 18 Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA 2010. The natural history
19 of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167(2-4): 95-107.
20
- 21 Kocan KM, de La Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC 2004. *Anaplasma marginale*
22 (Rickettsiales : Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen
23 adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129: 285-300.
24
- 25 Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD 2003. Antigens and
26 alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbio Rev*
27 16(4): 698-712.
28
- 29 Kocan KM, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ 1984. Demonstration of the
30 inclusion appendage of *Anaplasma marginale* in nymphal *Dermacentor andersoni*. *Am*
31 *Vet Res* 45: 1800-1807.
32

- 1 Kocan KM, Goff WL, Stiller D, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, Hair JA, Barron
2 SJ 1992a. Persistence of *Anaplasma marginale* (rickettsiales, anaplasmataceae) in male
3 *Dermacentor andersoni* (acari, ixodidae) transferred successively from infected to
4 susceptible calves. *J Med Entomol* 29(4): 657-668.
5
- 6 Kocan KM, Halbur T, Blouin EF, Onet V, de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Saliki JT
7 2001. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture.
8 *Vet Parasitol* 102(1-2): 151-161.
9
- 10 Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, McGuire TC,
11 Hair JA, Barron SJ 1992b. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor*
12 *andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 53(4): 499-
13 507.
14
- 15 Kreier JP, Ristic M, Schroeder W 1964. Anaplasmosis. XVI. The pathogenesis of
16 anemia produced by infection with *Anaplasma*. *Am J Vet Res* 25: 343-352.
17
- 18 Kuttler KL 1984. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants - a review. *J*
19 *Wildl Dis* 20(1): 12-20.
20
- 21 Kuttler KL, Zaugg JL 1988. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of
22 deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop Anim Health Prod* 20(2): 85-91.
23
- 24 Lasmar PVF, Carvalho AU, Facury-Filho EJ, Bastos CV, Ribeiro MFB 2012.
25 Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale*
26 derived from tick cell culture. *Rev Bras Parasitol Vet* 21: 112-117.
27
- 28 Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC 2007.
29 Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a
30 protective outer membrane vaccine. *Infect Immun* 75(5): 2333-2342.
31
- 32 Lopez JE, Siems WF, Brayton KA, Palmer GH, McGuire TC, Brown WC 2005.
33 Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer

- 1 membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun* 73:
2 8109–8118.
3
- 4 Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B,
5 Forró L 2006. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett* 6: 1121-1125.
6
- 7 Manna SK, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera EV, Jejelowo O, Rice-Ficht A, Ramesh G.
8 2005. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear
9 transcription factor-kappaB in human keratinocytes. *Nano Lett* 5: 1676-1684.
10
- 11 Maślanka T, Jaroszewski JJ 2012. *In Vitro* effects of dexamethasone on bovine CD25⁺
12 CD4⁺ and CD25⁻ CD4⁺ cells. *Res Vet Sci* 93(3): 1367-1379.
13
- 14 Maślanka T, Jaroszewski JJ, Markiewicz W, Ziółkowski H, Barski D 2012. The
15 presence of CD25 on bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells is positively correlated with their
16 production of IL-10 and TGF- β , but not IFN- γ . *Pol J Vet Sci* 15: 11-20.
17
- 18 Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V 2004.
19 Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined
20 single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A* 67: 87-107.
21
- 22 McGarey DJ, Allred DR 1994. Characterization of hemagglutinating components on the
23 *Anaplasma marginale* initial body-surface and identification of possible adhesins. *Infect*
24 *Immun* 62(10): 4587-4593.
25
- 26 McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR 1994. Putative adhesins
27 of *Anaplasma marginale* - major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun* 62(10):
28 4594-4601.
29
- 30 McGuire TC, Musoke AJ, Kurtti T 1979. Functional properties of bovine IgG1 and
31 IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and
32 skin. *Immunology* 38(2): 249.
33

- 1 McGuire TC, Stephens EB, Palmer GH, McElwain TF, Lichtensteiger CA, Leib SR,
2 Barbet AF 1994. Recombinant vaccinia virus expression of *Anaplasma marginale*
3 surface protein msp-1a - effect of promoters, leader sequences and gpi anchor sequence
4 on antibody-response. *Vaccine* 12(5): 465-471.
5
- 6 Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G 2007. Current status of
7 veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev* 20(3): 489-510.
8
- 9 Mendonça FLM 2015. Utilização de isolados de *Anaplasma marginale* de baixa
10 virulência em protocolos de imunização de bezerros: análise dos efeitos pós-vacinais e
11 proteção contra o desafio natural. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária,
12 UFMG, 73 pp.
13
- 14 Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL
15 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*.
16 *Vet Microbiol* 101: 53–64.
17
- 18 Naessens J, Newson J, McHugh N, Howard CJ, Parsons K, Jones B 1990.
19 Characterization of a bovine leucocyte differentiation antigen of 145,000 MW restricted
20 to B lymphocytes. *Immunology* 69(4): 525-530.
21
- 22 Noh SM, Brayton KA, Brown WC, Norimine J, Munske GR, Davitt CM, Palmer GH
23 2008. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in
24 protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infect Immun* 76(5):
25 2219–2226.
26
- 27 Noh SM, Turse JE, Brown WC, Norimine J, Palmer GH 2013. Linkage between
28 *Anaplasma marginale* outer membrane proteins enhances immunogenicity but is not
29 required for protection from challenge. *Clin Vaccine Immunol* 20(5): 651–656.
30
- 31 Noh SM, Zhuang Y, Futse JE, Brown WC, Brayton KA, Palmer GH 2010. The
32 immunization-induced response to the *Anaplasma marginale* major surface protein 2
33 and its association with protective immunity. *Vaccine* 28: 3471–3477.

- 1 Nuñez PA, Moretta R, Ruybal P, Wilkowsky S, Farber MD 2014. Immunogenicity of
2 Hypothetical Highly Conserved Proteins as Novel Antigens in *Anaplasma marginale*.
3 *Curr Microbiol* 68: 269-277.
- 4
- 5 Oliveira AA, de Pedreira PAS, Almeida MFR 1992. Doenças de bezerro. II
6 Epidemiologia da anaplasmoze no estado de Sergipe. *Arq Bras Med Vet Zootec* 44: 377-
7 386.
- 8
- 9 Pacheco RC, Vidotto O, Tamekuni K, Igarashi M, Kawasaki P, Prudêncio LB, Marana
10 ERM, Pereira AL 2004. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em
11 vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil.
12 *Semina Cienc Agrar* 25(3): 235-244.
- 13
- 14 Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC 1989. Immunization of cattle with the
15 msp-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant
16 *Anaplasma marginale* isolate. *Infect Immun* 57(11): 3666-3669.
- 17
- 18 Palmer GH, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC 1986. Immunization with an isolate-
19 common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science* 231(4743): 1299-
20 1302.
- 21
- 22 Palmer GH, Brayton KA 2007. Gene conversion is a convergent strategy for pathogen
23 antigenic variation. *Trends Parasitol* 23: 408-413.
- 24
- 25 Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR 2000. Antigenic variation in the persistence
26 and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect* 2: 167-176.
- 27
- 28 Palmer GH, Eid G, Barbet AF, McGuire TC, McElwain TF 1994. The
29 immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP-2) is encoded
30 by a polymorphic multigene family. *Infect Immun* 62: 3808-3816.
- 31
- 32 Palmer GH, McGuire TC 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial
33 bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol* 133(2): 1010-1015.

- 1 Palmer GH, Oberle SM, Barbet AF, Goff WL, Davis WC, McGuire TC 1988.
2 Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against
3 homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect Immun* 56(6):
4 1526-1531.
5
- 6 Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC 1999. Molecular basis for vaccine
7 development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today* 15:
8 281–286.
9
- 10 Palmer GH, Waghela SD, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC 1987. Characterization
11 of a neutralization-sensitive epitope on the am-105 surface protein of *Anaplasma*
12 *marginale*. *Int J Parasitol* 17(7): 1279-1285.
13
- 14 Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A 2004. Translocation of bioactive peptides
15 across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* 10(1): 16-17.
16
- 17 Pantarotto D, Partidos CD, Graff R, Hoebeke J, Briand JP, Prato M, Bianco A 2003b.
18 Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon
19 nanotubes functionalized with peptides. *J Am Chem Soc* 125(20): 6160-6164.
20
- 21 Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato
22 M, Bianco A 2003a. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes
23 enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem Biol* 10: 961-966.
24
- 25 Pohl AE, Cabezas-Cruz A, Ribeiro MFB, Silveira JAG, Silaghi C, Pfister K, Passos
26 LMF 2013. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas
27 Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 22: 129-135.
28
- 29 Pompeo F, Resasco DE 2002. Water Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes
30 by Functionalization with Glucosamine. *Nano Lett* 2(4): 369-373.
31
- 32 Potgieter FT 1979. Epizootiology and control of anaplasmosis in south-africa. *J S Afr*
33 *Vet Assoc* 50(4): 367-372.

- 1 Pypers AR, Holm DE, Williams JH 2011. Fatal congenital anaplasmosis associated with
2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a crossbred calf. *J S Afr Vet Assoc* 82:
3 179-182.
4
- 5 Quiroz-Castañeda RE, Amaro-Estrada I, Rodríguez-Camarillo SD 2016. *Anaplasma*
6 *marginale*: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics
7 Approach. *BioMed Research International* 2016: ID 9032085,
8 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9032085>.
9
- 10 Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Hinchcliff K, Constable PD 2007. *Veterinary*
11 *medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*, 10th ed.,
12 Edinburgh: Saunders Elsevier, 2156p.
13
- 14 Rajasekariah GHR, Ryan JR, Hiller RS, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithymam AM,
15 Martin SK 2001. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral
16 leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods* 252:
17 105–119.
18
- 19 Reeves JD, Swift BL 1977. Iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in beef
20 cattle. *Vet Med Small Anim Clin* 13: 911-914.
21
- 22 Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Reigel C, Olson KC, Ganta RR 2010.
23 The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent
24 *Anaplasma marginale* infection. *Vet Microbiol* 145: 69–75.
25
- 26 Ribeiro MFB, Lima JD 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in
27 midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 61: 31-39.
28
- 29 Ribeiro MFB, Lima JD, Guimarães AM, Scatamburlo MA, Martins NE 1995.
30 Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 47: 297-304.
31 Ribeiro MFB, Passos LMF 2002. Tristeza Parasitária Bovina. *Cad Tec Vet Zootec* 39:
32 36-52.
33

- 1 Ribeiro MFB, Passos LMF, Guimarães AM 1997. Ultrastructure of *Anaplasma*
2 *marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol*
3 70: 271-277.
- 4
- 5 Ristic M 1981. Anaplasmosis. In: Diseases of cattle in the tropics - economic and
6 zoonotic relevance. *Springer Netherlands* 6: 327-344.
- 7
- 8 Ristic M, Carson CA 1977. Methods of immunoprophylaxis against bovine
9 anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine.
10 *Adv Exp Med Biol* 93: 151-188.
- 11
- 12 Rodríguez SD, García OMA, Hernández SG, Santos CNA, Aboytes TR, Cantó AGJ
13 2000. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous
14 challenge. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 23: 239-252.
- 15
- 16 Rogers RJ, Dimmock CK, de Vos AJ, Rodwell BJ 1988. Bovine leucosis virus
17 contamination of a vaccine produced *in vitro* against bovine babesiosis and
18 anaplasmosis. *Aust Vet J* 65: 285-287.
- 19
- 20 Rosca ID, Watari F, UO M, Akasaka T 2005. Oxidation of multiwalled carbon
21 nanotubes by nitric acid. *Carbon* 43: 3124–3131.
- 22
- 23 Sampaio IBM 2010. *Estatística aplicada à experimentação animal*, 3rd ed., FEPMVZ,
24 Belo Horizonte, 264 pp.
- 25
- 26 Santos PS, Sena AA, Nascimento R, Araújo TG, Mendes MM, Martins JR, Mineo
27 TW, Mineo JR, Goulart LR 2013. Epitope-based vaccines with the *Anaplasma*
28 *marginale* MSP1a functional motif induce a balanced humoral and cellular immune
29 response in mice. *PLoS One* 8(4): e60311. doi: 10.1371/journal.pone.0060311.
- 30
- 31 Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, Kohgo T, Tamura
32 K, Akasaka T, Uo M, Motomiya K, Jeyadevan B, Ishiguro M, Hatakeyama R, Watari
33 F, Tohji K 2005. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes

- 1 against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous
2 tissue of rats *in vivo*. *Mol Biosyst* 1: 176-182.
- 3
- 4 Schalm OW 1964. A simple and rapid method for staining blood films with new
5 methylene blue. *J Am Vet Med Assoc* 145(15): 1184-1188.
- 6
- 7 Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ 1975. *Veterinary Hematology*, LEA e Febiger,
8 Philadelphia, 807 pp.
- 9
- 10 Schroeder WF, Ristic M 1965. Anaplasmosis. XVIII. An analysis of autoantigens in
11 infected and normal bovine erythrocytes. *Am J Vet Res* 26: 679-682.
- 12
- 13 Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH 2005. Relative efficiency of biological
14 transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) by
15 *Dermacentor andersoni* (Acari : Ixodidae) compared with mechanical transmission by
16 *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae). *J Med Entomol* 42(4): 668-675.
- 17
- 18 Shkap V, Kocan K, Molad T, Mazuz M, Leibovich B, Krigel Y, Michoytchenko
19 A, Blouin E, de la Fuente J, Samish M, Mtshali M, Zweygarth E, Fleiderovich EL, Fish
20 L 2009. Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A. centrale*
21 vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus*
22 (*Boophilus*) *annulatus* ticks. *Vet Microbiol* 134(3-4): 254-60.
- 23
- 24 Shkap V, Molad T, Fish L, Palmer GH 2002. Detection of the *Anaplasma centrale*
25 vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and
26 infected cattle. *Parasitol Res* 88(6): 546-552.
- 27
- 28 Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman
29 VZ, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P 2003. Exposure to carbon nanotube
30 material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol*
31 *Environ Health A* 66: 1909-1926.
- 32

- 1 Silva JB, Fonseca AH 2013. Analysis of the risk factors related to the immune humoral
2 anti-*Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Semina: Ci Agrárias* 34(2): 777-784.
3
- 4 Silveira JAG, Rabelo EML, Lacerda ACR, Borges PAL, Tomás WM, Pellegrin AO,
5 Tomich RGP, Ribeiro MFB 2013. Molecular detection and identification of
6 hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the
7 Pantanal Brazil. *Ticks Tick-borne Dis* 4: 341-345.
8
- 9 Silvestre BT, Rabelo ÉM, Versiani AF, da Fonseca FG, Silveira JA, Bueno LL,
10 Fujiwara RT, Ribeiro MF 2014. Evaluation of humoral and cellular immune response of
11 BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma*
12 *marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Vaccine* 32: 2160-2166.
13
- 14 Silvestre BT, Silveira JA, Meneses RM, Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Ribeiro MF
15 2015. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale*
16 (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence.
17 *Ticks Tick Borne Dis* 7(1): 80-84.
18
- 19 Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, Partidos CD 2006. Binding
20 and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the
21 construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J Am Chem Soc* 127: 4388-4396.
22
- 23 Sinha N, Yeow J 2005. Carbon nanotubes for biomedical applications. *IEEE Trans*
24 *Nanobioscience* 4(2) 180-195.
25
- 26 Smart SK, Cassady AI, Lu QG, Martin DJ 2006. The biocompatibility of carbon
27 nanotubes. *Carbon* 44(6): 1034-1047.
28
- 29 Smith R, Levy MG, Kuhlenschmidt MS, Adams JH, Rzechula DG, Hardt TA, Kocan
30 KM 1986. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am J Vet Res* 47:
31 127-129.
32

- 1 Smith RD, Hungerford LL, Armstrong CT 1989. Epidemiologic investigation and
2 control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. *J Am Vet Med Assoc* 195(4):
3 476-480.
4
- 5 Sorbara MT, Philpott DJ 2011. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian
6 immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 243: 40–60.
7
- 8 Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ 1989. Transstadial
9 and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor*
10 *variabilis*. *Am J Vet Res* 50(8): 1377-1380.
11
- 12 Storset AK, Kulberg S, Berg I, Boysen P, Hope JC, Dissen E 2004. NKp46 defines a
13 subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur J Immunol* 34(3):
14 669-676.
15
- 16 Suttén EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, Brayton KA,
17 Gillespie JJ, Brown WC 2010. *Anaplasma marginale* Type IV Secretion System
18 Proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 Are Immunogenic Components of a
19 Protective Bacterial Membrane Vaccine. *Infect Immun* 78(3): 1314-1325.
20
- 21 Tebele N, McGuire TC, Palmer GH 1991. Induction of protective immunity by using
22 *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun* 59(9): 3199–3204.
23
- 24 Theiler A 1910. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). *J Comp Pathol*
25 *Ther* 23: 98-115.
26
- 27 Theiler A 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: 1st
28 Report of the Director of Veterinary Research. *Department of Agriculture of the Union*
29 *of South Africa*. 7–46.
30
- 31 Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H 2006. Cytotoxicity of single-wall
32 carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 20: 1202-1212.
33

- 1 Torina A, Moreno-Cid JA, Blanda V, Fernández de Mera IG, de la Lastra JM, Scimeca
2 S, Blanda M, Scariano ME, Brigano S, Disclafani R, Piazza A, Vicente J, Gortázar
3 C, Caracappa S, Lelli RC, de la Fuente J 2014. Control of tick infestations and pathogen
4 prevalence in cattle and sheep farms vaccinated with the recombinant Subolesin-Major
5 Surface Protein 1a chimeric antigen. *Parasites & Vectors* 7: 10.
- 6
- 7 Turton JA, Katsande TC, Matingo MB, Jorgensen WK, Ushewokunze-Obatolu U,
8 Dalgliesh RJ 1998. Observations on the use of *Anaplasma centrale* for immunization of
9 cattle against anaplasmosis in Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet Res* 65(2): 81-86.
- 10
- 11 Ulevitch RJ, Mathison JC, da Silva Correia J 2004. Innate immune responses during
12 infection. *Vaccine*; 22(1): 25–30.
- 13
- 14 Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, Knowles DP Jr
15 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved
16 in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun* 60(12): 5139-5144.
- 17
- 18 Walker DH, Dumler JS 2015. The role of CD8 T lymphocytes in rickettsial infections.
19 *Semin Immunopathol* 37(3): 289-299.
- 20
- 21 Walker DH, Olano JP, Feng H-M 2001. Critical role of cytotoxic T lymphocytes in
22 immune clearance of rickettsial infection. *Infect Immun* 69: 1841–1846.
- 23
- 24 Wamsley HL, Alleman AR, Johnson CM, Barbet AF, Abbott JR 2011. Investigation of
25 endothelial cells as an *in vivo* nidus of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Vet*
26 *Microbiol* 153(3-4): 264-273.
- 27
- 28 Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR 2004.
29 Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats.
30 *Toxicol Sci* 77: 117-125.
- 31

- 1 Wilson AJ, Parker R, Trueman KF 1980. Experimental immunization of calves against
2 *Anaplasma marginale* infection: observation on the use of living *A.centrale* and *A.*
3 *marginale*. *Vet Parasitol* 7: 305-311.
- 4
- 5 Yandar N, Pastorin G, Prato M, Bianco A, Patarroyo ME, Lozano JM 2008.
6 Immunological profile of a *Plasmodium vivax* AMA-1 N-terminus peptide-carbon
7 nanotube conjugate in an infected *Plasmodium berghei* mouse model. *Vaccine* 26:
8 5864–5873.
- 9
- 10 Zeinali M, Jammalan M, Ardestani SK, Mosaveri N 2009. Immunological and
11 cytotoxicological characterization of tuberculin purified protein derivative (PPD)
12 conjugated to single-walled carbon nanotubes. *Immunol Lett* 126: 48–53.
- 13