

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE

**PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AM254, VIRB9 E
VIRB10 DE *Anaplasma marginale* E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE
SUA ANTIGENICIDADE**

Cátia Marques da Costa

2007



UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AM254, VIRB9 E
VIRB10 DE *Anaplasma marginale* E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE
SUA ANTIGENICIDADE**

CÁTIA MARQUES DA COSTA

Sob Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação do Doutor
Flábio Ribeiro de Araújo

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007


636.2089696 Costa, Cátia Marques da, 1971-
C837p Produção das proteínas
T recombinantes AM254 VIRB9 e VIRB10
de Anaplasma marginale e avaliação
preliminar de sua antigenicidade /
Cátia Marques da Costa. - 2007.
61 f. : il.
Orientador: Adivaldo Henrique
da Fonseca.
Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.
Bibliografia: f. 43-57.
1. Bovino - Parasito - Teses.
2. Proteínas - Teses. 3.
Escherichia coli - Genética -
Teses. 4. Parasitologia
veterinária - Teses. I. Fonseca,
Adivaldo Henrique da, 1953- II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Instituto de
Veterinária. III. Título.

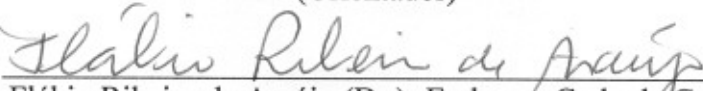
Bibliotecário: _____ Data: ___/___/___

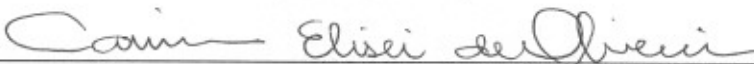
CÁTIA MARQUES DA COSTA

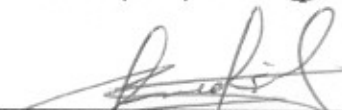
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.


TESE APROVADA EM 28/02/2007


Adivaldo Henrique da Fonseca (Dr) UFRRJ
(Orientador)


Flávio Ribeiro de Araújo (Dr.)- Embrapa-Gado de Corte
(Co-orientador)


Carina Elisei de Oliveira (Dra.)- Embrapa-Gado de Corte


Cleber Oliveira Soares (Dr.)- Embrapa-Gado de Corte


Kátia Regina dos Santos Teixeira (Dra.)- Embrapa- Agrobiologia

“Esforça-te e tenha bom ânimo; não te atemorizes e nem te espantes;
porque o Senhor teu Deus é contigo por onde quer que andares.
Eu, o Senhor teu Deus, te seguro pela tua mão direita e te digo:
não temas que Eu te ajudo.”
Josué 1: 9 e Isaías 40: 13

Aos meus queridos pais Léa e Eurides,
aos meus irmãos Ricardo e Helio,
à sobrinha Nicolý e demais familiares e
amigos que sempre ofertaram apoio e carinho

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sustento, pela proteção e por ter permitido que eu encontrasse pessoas com disposição para auxiliar em todas as etapas desse trabalho.

Ao prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pela orientação e apoio e também à profa. Marília Massard da Fonseca, pela convivência e amizade.

Ao Dr. Flávio Ribeiro Araújo pela acolhida em seu laboratório, e pela orientação e paciência para o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Carina Elisei de Oliveira pela acolhida, apoio, amizade, incentivo e ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias Charles Passos Rangel, Daniel da Silva Guedes Jr., Fábio Jorge Moreira, Fabíola do Nascimento Corrêa, Jania Rezende, Jenevaldo Silva, Luciana Rodrigues de Almeida, Nathalie Costa da Cunha, Rafaella Teixeira de Câmara, Raquel Silva Lisbôa e Renata Cunha Madureira pela amizade e agradáveis anos de convivência, além de todo auxílio prestado nas atividades elaboradas durante o curso.

À Dra. Ângela de Oliveira pela amizade e pelos ensinamentos de Microbiologia e Bacteriologia tão importantes para a rotina do trabalho em laboratório.

Ao Departamento de Microbiologia Veterinária pelo uso dos laboratórios durante o curso.

Aos funcionários do Projeto Sanidade Animal da UFRRJ.

Aos professores, funcionários e amigos do Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

À Kattyanne de Souza Costa pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Carlos Alberto do Nascimento Ramos e Elaine Silva de Pádua Melo pela paciência e boa vontade em ensinar os procedimentos a serem realizados.

À Dra. Grácia Soares Rosinha e ao Dr. Cleber Oliveira Soares da Embrapa- Gado de corte pela amizade e sugestões.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Sanidade Animal da Embrapa-CNPq.

Ao CNPq, à FUNDECT e ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias- UFRRJ pelo apoio e auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente propiciaram a realização deste trabalho. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Cátia Marques da Costa, filha de Léa Marques da Costa e Eurides Joaquim da Costa, é natural do município de São Gonçalo, no estado do Rio de Janeiro, onde nasceu em 7 de maio de 1971. Durante o ensino fundamental estudou no Educandário Sete de Setembro e no Educandário Cecília Meirelles, instituição na qual concluiu o ensino médio.

O interesse por doenças, pelo envolvimento dos animais no processo de transmissão de patógenos e principalmente pelas medidas de prevenção a esses tipos de doenças, a levou a optar pelo Curso de Medicina Veterinária. Em 1991 passou a fazer parte do quadro de alunos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas e instituições e em 1997 obteve o título de Médica Veterinária.

Foi bolsista de Apoio Técnico do Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento tecnológico de setembro de 1999 a março de 2000 em projeto envolvendo *Borrelia* spp, animais domésticos e silvestres. No ano de 2000 foi aprovada para o cargo de Professora Substituta de Bacteriologia Veterinária e Microbiologia Geral do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro exercendo essa função até o 2º semestre de 2001. Nesse mesmo ano ingressou no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária desta mesma Instituição apresentando sua dissertação em fevereiro de 2003. Em março de 2003 iniciou o Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, concluindo sua tese em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Taxonomia	3
2.2 Organização genômica geral	3
2.3 Metabolismo.....	4
2.4 Transmissão	5
2.5 Ciclo evolutivo	7
2.6 Patogenia e sinais clínicos	8
2.7 Imunidade contra <i>Anaplasma marginale</i>	9
2.8 Progressos na imunização contra <i>A. marginale</i>	10
2.8.1 Proteínas principais de superfície de <i>A. marginale</i> : caracterização e importância como imunógenos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Local.....	21
3.2 Extração de DNA genômico de <i>A. marginale</i>	21
3.3 Amplificação dos genes <i>virB9</i> , <i>virB10</i> e <i>am254</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
3.4 Clonagem de genes a partir dos produtos de PCR.....	22
3.5 Purificação de plasmídeos recombinantes.....	22
3.6 Subclonagem dos genes em plasmídeo de expressão pET-47b.....	22
3.7 Avaliação da indução dos genes <i>virB9</i> , <i>virB10</i> e <i>am254</i>	25
3.8 Purificação das proteínas recombinantes.....	25
3.9 Análise das proteínas recombinantes por eletroforese.....	26
3.10 Western blot.....	26
3.11 Determinação da concentração das proteínas recombinantes.....	27
3.12 Ensaio de imunoabsorção enzimática com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes.....	27
3.13 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Amplificação dos genes <i>virB9</i> , <i>virB10</i> e <i>am254</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
4.2 Clonagem de genes a partir dos produtos de PCR.....	28
4.3 Subclonagem em pET-47b(+) e expressão dos genes.....	28
4.4 Western blot.....	30
4.5 Ensaio de imunoabsorção enzimática com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes.....	31
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa físico do plasmídeo de expressão pET-47b(+)	24
Figura 2. Amplificação dos genes <i>am 254</i> , <i>virB9</i> e <i>virB10</i> por reação em cadeia da polimerase do isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de <i>Anaplasma marginale</i> . Linhas- 1: marcador de pares de bases 1 kb plus (Invitrogen), 2: <i>am254</i> , 3: <i>virB9</i> , 4: <i>virB10</i>	28
Figura 3. Expressão de genes de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de <i>Anaplasma marginale</i> após seis horas de indução com IPTG. Linhas- 1: marcador de massa molecular (Promega); 2: extrato bruto de <i>Escherichia coli</i> ; 3: indução de <i>virB9</i> ; 4: purificação de VirB9; 5: indução de <i>virB10</i> ; 6: purificação de VirB10; 7: indução de <i>am254</i> ; 8: purificação de AM254	29
Figura 4. Western blot com proteínas VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de <i>Anaplasma marginale</i> com anticorpo monoclonal anti-histidina. Linhas: 1- extrato de <i>Escherichia coli</i> – Rosetta, 2- VirB9, 3- VirB10, 4- AM254	30
Figura 5. Distribuição das densidades ópticas de 72 soros de bovinos positivos para <i>Anaplasma marginale</i> , e 72 soros de bovinos negativos para a riquetsia, analisados no ELISA com VirB9 recombinante de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de <i>A. marginale</i>	32
Figura 6. Distribuição das densidades ópticas de 72 soros de bovinos positivos para <i>Anaplasma marginale</i> e 72 soros de bovinos negativos para a riquetsia, analisados no ELISA com VirB10 recombinantes de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de <i>A. marginale</i>	33
Figura 7. Distribuição das densidades ópticas de 72 soros de bovinos positivos para <i>Anaplasma marginale</i> , e 72 soros de bovinos negativos para a riquetsia, analisados no ELISA com AM254 recombinante de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de <i>A. marginale</i>	34
Figura 8. Avaliação do potencial imunogênico das proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254 de <i>Anaplasma marginale</i> , isolado brasileiro Rio Grande do Norte, contra isolados heterólogos Pernambuco- Zona da Mata e Pernambuco- Agreste. Imune 1: soro obtido no 5º dia pós-infecção; Imune 2: soro obtido no 15º dia pós-infecção; Imune 3: soro obtido no 35º dia pós-infecção	38
Figura 9. Produção de IgG em bovinos imunizados com <i>Anaplasma marginale</i> isolados Pernambuco (PE)- Zona da Mata e Pernambuco (PE)- Agreste. Soros submetidos ao teste ELISA com as proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254. Imune 1: soro obtido no 5º dia pós-infecção; Imune 2: soro obtido no 15º dia pós-infecção; Imune 3: soro obtido no 35º dia pós-infecção. Resultados expressos como densidade óptica dos soros no teste ELISA	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média das densidades ópticas de 72 soros de bovinos negativos para <i>A. marginale</i> , e 72 soros de bovinos positivos para a riquetsia, analisados nos ELISAs com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes.....	35
Tabela 2: Densidades ópticas máximas e mínimas de soros homólogos no teste ELISA com proteínas recombinantes e valores de densidades ópticas (n=144) correspondentes a sobreposição de resultados.....	36
Tabela 3: Soros homólogos positivos (72) e negativos (72) testados por PCR para <i>msp5</i> (sangue) e por ELISA indireto com as proteínas recombinantes MSP1a e MSP5 que apresentaram valores de densidades ópticas iguais entre positivos e negativos no ELISA com as proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254.....	37
Tabela 4: Riquetsemia dos animais inoculados com isolados heterólogos (Pernambuco-Zona da Mata e Pernambuco- Agreste) brasileiros, de <i>Anaplasma marginale</i>	39

RESUMO

COSTA, Cátia Marques. **Produção das proteínas recombinantes AM254, VirB9 e VirB10, de *Anaplasma marginale* e avaliação preliminar de sua antigenicidade.** 2007. 61p. (Doutorado em Ciências). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007

Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) é uma riquetsia intraeritrocítica, responsável por ocasionar grandes perdas econômicas na pecuária bovina das regiões tropical e sub-tropical. O objetivo desse trabalho foi produzir as proteínas de membrana recombinantes AM254, VirB9 e VirB10 e avaliar sua possível antigenicidade. Os genes *am254*, *virB9* e *virB10* foram submetidos a vários procedimentos experimentais até serem ligados ao plasmídeo pET-47b(+). Após a certificação do plasmídeo recombinante (pET-47b-*am254*, pET-47b-*virB9* e pET-47b-*virB10*) este foi transformado em *E. coli* Rosetta para expressão. As proteínas recombinantes produzidas foram analisadas pelo ensaio Western blot onde foi observada a reação do anticorpo monoclonal anti-histidina contra rVirB9 (31kDa), rVirB10 (60kDa) e rAM254 (47kDa). Após a confirmação da produção das proteínas recombinantes realizou-se a padronização do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto com soros oriundos de sangue total previamente confirmados por PCR; os mesmos soros também foram testados por ELISA (rMSP1 e rMSP5). As médias das densidades ópticas (DO) dos soros positivos foram de 1,339; 1,288 e 1,240 e dos soros negativos de 0,470, 0,324 e 0,414 para AM254, VirB9 e VirB10 respectivamente com diferença significativa ao nível de 5% entre positivos e negativos para cada proteína recombinante. O estudo demonstrou que as proteínas rAM 254, rVirB9 e rVirB10 de *A. marginale* são reconhecidas por soros de bovinos imunizados com diferentes isolados brasileiros da riquetsia (homólogo e heterólogos), revelando o potencial antigênico dessas proteínas.

Palavras-chave: Anaplasmataceae, proteínas recombinantes de membrana, diagnóstico.

ABSTRACT

COSTA, Cátia Marques. **Production of recombinant proteins AM254, VirB9 and VirB10 of *Anaplasma marginale* and preliminary evaluation its antigenicity.** 2007. 61p. Thesis (Doctor in Veterinary Sciences) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is a rickettsial hemoparasite responsible for causing great economic losses in cattle from tropical and subtropical regions. The objectives of this work were to produce the recombinant membrane proteins AM254, VirB9 and VirB10 and to evaluate its possible antigenicity. The genes *am254*, *virB9* and *virB10* were submitted to various experiments and were , linked to pET47 (b) plasmid. After the certification of the recombinant plasmid (pET-47-am254, pET-47-virB9 and pET-47-virB10), it was transformed into *E. coli* Rosetta cells for expression. The recombinant proteins produced, were analyzed by Western blot assay where the reaction of the anti-histidin monoclonal antibody against rAM254 (47kDa), rVirB9 (31kDa) and rVirB10 (60kDa) was observed. After the confirmation of the production of recombinant proteins the indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was standardized with sera previously confirmed by PCR and ELISA (rMSP1 and rMSP5). The averages of the optic densities (OD) of the positive sera were of 1.339; 1.288 and 1.240 and of the negative sera of 0.470, 0.324 and 0.414 for AM254, VirB9 and VirB10 respectively with significant difference to the level of 5% between positives and negatives for each recombinant protein. The study demonstrated that the proteins rAM 254, rVirB9 and rVirB10 of *A. marginale* are recognized by sera of bovines immunized by different Brazilian isolates of the rickettsia (homologous and heterologous), showing the antigenicity potential of these proteins.

Key words: Anaplasmataceae, recombinant membrane protein, diagnostic.

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma marginale é uma riquetsia intraeritrocítica, agente etiológico da anaplasmosse, doença que acomete bovinos, causando febre, fraqueza geral, anemia, perda de apetite, depressão, taquipnéia (AJAYI et al., 1978) e até morte em alguns casos. A doença é responsável por prejuízos econômicos devido à queda na produção, custos com tratamento e mortalidade dos animais (GRISI et al., 2002).

Além das perdas econômicas diretas, a riquetsia é um obstáculo ao melhoramento genético do rebanho bovino nacional (MELÉNDEZ, 2000), pois sua presença limita a introdução, de raças de elevado padrão zootécnico no Brasil, oriundas de regiões onde o patógeno não ocorre. Há, também, o desconforto causado pela enfermidade, que debilita o animal e o incômodo ocasionado pelo artrópode vetor, capaz de transmitir o microrganismo no momento do repasto sanguíneo (ERIKS et al., 1993).

Dentre os métodos de controle da anaplasmosse, que podem incluir o controle do carrapato vetor e quimioterapia com tetraciclina, a vacinação merece destaque por ser um dos mais econômicos e efetivos utilizados mundialmente (KOCAN et al., 2003). As vacinas para o controle da anaplasmosse são, basicamente, de dois tipos: vacinas vivas e vacinas mortas; ambas são produzidas a partir de eritrócitos de bovinos infectados e são capazes de induzir imunidade protetora caracterizada por redução ou prevenção da doença clínica, mas sem prevenção da infecção persistente do gado (KOCAN et al., 2003). De maneira geral, as vacinas vivas atenuadas apresentam, como vantagem, a capacidade de induzir forte imunidade protetora mediada por células, bem como imunidade humoral; entretanto, existe o risco de reversão da amostra vacinal para um tipo selvagem capaz levar à doença, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos (LILJEQVIST; STAHL, 1999). As vacinas mortas não são infecciosas e, portanto, não oferecem esse risco, mas são menos eficientes em induzir uma imunidade protetora (LILJEQVIST; STAHL, 1999). Além disso, existem outros inconvenientes, tais como: a dificuldade na especificação dos componentes da vacina, os custos de produção e a transmissão de agentes infecciosos emergentes (LILJEQVIST; STAHL, 1999; PALMER et al., 1999; KOCAN et al., 2003).

Torna-se evidente, então, a necessidade do desenvolvimento de vacinas que sejam mais eficazes e seguras. Para alcançar esses objetivos, as pesquisas atuais estão focadas nos efetores de imunidade protetora e na identificação dos epitópos alvo em *A. marginale* para esses efetores (PALMER et al., 1999).

No desenvolvimento da resposta imune protetora contra *A. marginale*, estão envolvidos mecanismos humorais e celulares. Elevados títulos de anticorpos contra a riquetsia estão associados a valores menores de riquetsemia e diminuição da anemia (TEBELE et al., 1991). Também é essencial a participação dos linfócitos T (CD4⁺) produtores de interferon- γ (INF- γ) que estimulam a síntese de IgG2 pelos linfócitos B no gado (ESTES et al., 1994), e a produção de óxido nítrico (NO), substância que tem ação tóxica sobre riquetsias (BROWN et al., 1998a).

De fundamental importância no estudo da imunidade protetora contra *A. marginale*, foi a identificação e caracterização das proteínas principais de superfície (*Major Surface Proteins* - MSPs): MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER; MCGUIRE, 1984; BARBET et al., 1987; OBERLE et al., 1988; TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993; TEBELE et al., 1991; VISSER et al., 1992) na membrana da riquetsia, e a constatação de que a imunização com microrganismos vivos ou mortos ou pela membrana dos corpúsculos iniciais pode conferir proteção contra a anaplasmosse (PALMER et al., 1988). Apesar desse fato, imunizações com MSPs individualmente apresentam falhas em induzir proteção contra a anaplasmosse e as razões para tal fato ainda não foram esclarecidas (PALMER et al., 1986;

PALMER et al., 1989; PALMER et al., 1994b; MUNODZANA et al., 1998), corroborando a necessidade do desenvolvimento de novos imunógenos.

Recentemente, por meio de técnicas de genômica e proteômica, novas proteínas de membrana foram identificadas em *A. marginale*. Entre as que apresentaram potencial como imunógenos, estão VirB9, VirB10 e AM254 que reagiram com IgG2 de bovinos imunizados com membrana de isolado americano de *A. marginale* (LOPEZ et al., 2005).

Uma das etapas experimentais posteriores às já previamente executadas com essas novas proteínas seria avaliar se as mesmas são reconhecidas por soros de bovinos imunes de diferentes regiões. Com esse propósito, esse estudo teve como finalidade produzir as proteínas VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes, a partir de isolado brasileiro de *A. marginale*, e testar sua antigenicidade frente a soros de bovinos infectados com a riquetsia de diferentes regiões do país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia

O gênero *Anaplasma* está incluído no Super-reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae (THEILER, 1910; DUMLER et al., 2001). A reorganização de vários gêneros nas famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae sugerida por Dumler et al. (2001) foi embasada em resultados de estudos que incluíram seqüenciamento do gene 16SrRNA e do operon *groESL*, além de análises antigênicas, características biológicas, incluindo tipo de célula infectada no hospedeiro, vetores potenciais, hospedeiros mamíferos com e sem sinais clínicos evidentes de infecção e distribuição geográfica. Assim, a descrição da família Anaplasmataceae foi alterada de modo que fossem inseridos os microrganismos intracelulares obrigatórios, que infectam vacúolos citoplasmáticos das células do hospedeiro que incluem eritrócitos, células reticulo-endoteliais, células fagocíticas derivadas da medula óssea, células endoteliais e células de insetos, helmintos e tecidos reprodutivos de artrópodes (DUMLER et al., 2001). Fazem parte dessa família os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* e *Neorickettsia* com similaridades de 96,1%, 97,7%, 94,9% e 94,9% respectivamente. Por essa proposta, os organismos classificados como *Ehrlichia phagocytophilum*, *E. equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana, assim como *E. bovis* e *E. platys* foram agrupados ao gênero *Anaplasma* que passou a ser composto pelas seguintes espécies: *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *A. bovis* e *A. platys*. A espécie tipo é *A. marginale* (THEILER, 1910).

Condizentes com essas mudanças, as características descritivas do gênero *Anaplasma* foram alteradas para incluir as características do gênero *Ehrlichia*, além de novos dados. Assim, são classificados como membros do gênero *Anaplasma*, os microrganismos Gram-negativos, pequenos, geralmente pleomórficos, cocóides a elipsoidais, que se desenvolvem em vacúolos citoplasmáticos, isoladamente ou mais freqüentemente, formando inclusões compactas, presentes em células hematopoiéticas maduras ou imaturas, particularmente células mielóides e neutrófilos, e incluindo eritrócitos, em sangue periférico ou tecidos, freqüentemente em órgãos ricos em fagócitos mononucleares de hospedeiros mamíferos (POPOV et al., 1998). *A. marginale* infecta, predominantemente, os eritrócitos do hospedeiro vertebrado e *in vitro*, desenvolve-se em células embrionárias de carrapatos. Já foi descrita a propagação deste patógeno em cultivo de eritrócitos e co-cultivos de células endoteliais/eritrócitos (KESSLER et al., 1979; MUNDERLOH et al., 1996 *apud* DUMLER et al., 2001; WAGHELA et al., 1997). Em cultura de células podem ser observadas duas formas e ambas se dividem por fissão binária; por ultra-estrutura, é possível evidenciar grandes células reticuladas e pequenas formas com protoplasma condensado (POPOV et al., 1998). São imóveis e não cultiváveis em meio livre de células ou ovos de galinha embrionados. São agentes etiológicos de doenças em canídeos, humanos e ruminantes como, gado, cabra, ovelhas e lhamas. A patogenicidade é variável e os vetores biológicos são carrapatos (DUMLER et al., 2001).

2.2 Organização Genômica Geral

A ferramenta utilizada para clonar *A. marginale* foi o cromossoma artificial de bactéria, evitando assim, os problemas associados com contaminação do DNA do hospedeiro, que ocorre quando se isola células infectadas diretamente do hospedeiro mamífero (BRAYTON et al., 2005); posteriormente, foi seqüenciado e anotado. O isolado norte-americano Saint Maries, foi obtido durante a fase aguda da doença em um bovino

esplenectomizado e experimentalmente infectado. Esse exemplar é constituído por 1.197.687 pares de bases (pb) e possui um conteúdo de G+C de 49,8%, considerado raro para organismos intracelulares obrigatórios. O genoma possui uma alta densidade de genes codificantes, o que é típico de organismos intra-celulares que têm um conteúdo mínimo de genes codificantes para manter o ciclo de vida em nichos ambientais particulares. A origem de replicação não pôde ser distinguida. Foram encontradas 949 seqüências de DNA codificantes, com um tamanho médio de 1.077 pb; um único operon de genes de RNA ribossomais e 37 genes de RNA transportadores representativos dos 20 aminoácidos (BRAYTON et al., 2005). Sessenta e duas seqüências codificadoras foram classificadas como *outer membrane proteins* (OMPs) com base na identidade de seqüências para as proteínas já conhecidas (BRAYTON et al., 2005; BRAYTON et al., 2006). Como esse número de OMPs é pequeno em relação ao tamanho do genoma, é possível que outras proteínas de superfície não tenham sido detectadas devido ao método de identificação utilizado (BRAYTON et al., 2006).

É bem provável que o pequeno genoma seja resultado de evolução reductiva, em que o patógeno atual tenha sido originado de um precursor maior. Esta evolução reductiva teria ocorrido por meio de mutação inicial com perda da função do gene, seguida por progressivos acúmulos de mutações e eventual deleção (ANDERSON et al., 1998; PALMER, 2002). Evidências atestam que em microrganismos patogênicos, a perda de função dos genes ou diminuição do genoma aumenta com a adaptação ao hospedeiro (WREN, 2000 *apud* KOCAN et al., 2003). Dessa forma, o genoma riquetsial reflete a mudança nas prioridades de uma bactéria de vida livre, para um parasita intracelular obrigatório (PALMER, 2002). Apesar da redução progressiva do genoma, o mesmo manteve a capacidade para infectar, sobreviver e se multiplicar para causar doenças nos animais (PALMER, 2002). Embora tenha um pequeno genoma, típico de membros da ordem Rickettsiales, *A. marginale* possui relativamente poucos pseudogenes, definidos como cópias inativas de genes funcionais (BRAYTON et al., 2005).

O seqüenciamento do genoma mostrou que a superfície de *A. marginale* é dominada por duas famílias de proteínas de membrana externa (OMPs) que abrangem mais da metade das moléculas preditas estarem na superfície da riquetsia: a superfamília *msp2* e a superfamília *msp1*, cada uma contendo membros imunodominantes (BRAYTON et al., 2005).

2.3 Metabolismo

A partir da anotação do genoma de *A. marginale* foi possível reconstruir as vias metabólicas, bem como identificar algumas enzimas encontradas nessa riquetsia (BRAYTON et al. 2005). Assim, os pesquisadores detectaram a presença da maioria das enzimas glicolíticas, mas nenhuma glicoquinase ou sistema de transporte de açúcar foi detectado, sugerindo que esta riquetsia pode primariamente usar gliconeogênese. Também não foram encontradas as principais enzimas da via Entner-Doudoroff. Poucos genes para enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos foram detectados, sendo que, vias completas não foram detectadas e enzimas envolvidas nas etapas finais de biossíntese estavam presentes apenas para os seguintes aminoácidos: serina, glicina, prolina, tirosina, cisteína, fenilalanina, glutamina e glutamato. A respiração aeróbica ocorre provavelmente pela via ciclo do ácido tricarbóxico, para o qual, um grupo completo de enzimas foi encontrado. As enzimas para a via não oxidativa da pentose fosfato estavam presentes, embora a transaldolase não pudesse ser definitivamente identificada. Todas as enzimas para síntese de ácidos graxos foram encontradas. Vias completas para a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas foram detectadas (BRAYTON et al., 2005).

Dois transportadores para aminoácidos foram identificados: um para a prolina e outro para alanina. Considerando que poucos aminoácidos podem ser sintetizados por *A. marginale*, surpreendentemente, poucos transportadores para aminoácidos foram encontrados. Há,

entretanto, numerosos transportadores tipo cassete de ligação ao ATP sem função designada, e talvez alguns deles possam desempenhar este papel. Sistemas transportadores para cátions, íons, oligopeptídeos, ribonucleotídeos e fosfato estão presentes. Mesmo não possuindo uma via completa para a síntese de peptidoglicano todos os genes para a síntese de ácido diaminopimélico estão presentes, mas o mesmo não ocorre com os genes para síntese de mureína. Além disso, também estão ausentes vários genes para a síntese de lipopolissacarídeo (LPS) e todos os genes para síntese de lipídio A (BRAYTON et al., 2005).

A ausência de uma parede celular tradicional parece ser uma característica da família Anaplasmataceae (LIN; RIKIHISA, 2003). Estes pesquisadores relataram a capacidade de *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum* incorporarem colesterol à membrana, além da perda de genes para a biossíntese do LPS e do peptidoglicano, que conferem resistência e forma. Essa característica poderia explicar o pleomorfismo observado em *Anaplasma* spp., além da membrana extremamente fina e a grande fragilidade, incomum em bactérias Gram negativas (LIN; RIKIHISA, 2003). *A. marginale*, entretanto, parece não ser particularmente frágil e, talvez, utilize uma via alternativa para fortalecer sua parede (BRAYTON et al., 2005). É possível que as proteínas principais de superfície (MSPs), participem do fortalecimento da parede dessa riquetsia (VIDOTTO et al., 1994).

A perda de genes para a biossíntese de lipídio A pode ter sido um evento crítico durante a evolução dos ancestrais da família Anaplasmataceae, com alguns descendentes tornando-se bactérias intracelulares obrigatórias de células de defesa primária do hospedeiro (LIN; RIKIHISA, 2003). Dentre estas células, os monócitos/macrófagos e neutrófilos apresentam importante característica, pois expressam receptores *Toll-like* que se ligam ao LPS e ao peptidoglicano (LIN; RIKIHISA, 2003). Essas ligações estimulam a resposta imune inata nestas células, incluindo fagocitose, fusão fagossomo-lisossomo, liberação de intermediários reativos com oxigênio e secreção de vários mediadores pró-inflamatórios para eliminar os microrganismos invasores (ULEVITCH; TOBIAS, 1994; BEUTLER, 2000; AKIRA et al., 2001 *apud* LIN; RIKIHISA, 2003). Na ausência de LPS e peptidoglicano a resposta imune adaptativa não é desencadeada, e esse fato pode aumentar as chances de sobrevivência intracelular de *Ehrlichia* e *Anaplasma* spp. (LIN; RIKIHISA, 2003). A presença de resposta imune adaptativa capaz de eliminar rapidamente o patógeno define as prioridades do genoma microbiano, permanecendo no hospedeiro e sendo transmitidos, apenas, os microrganismos capazes de evadir a resposta imune (PALMER, 2002).

2.4 Transmissão

De acordo com Kessler (2001), a transmissão de *A. marginale* suscita polêmicas, pois ainda existem dúvidas com relação aos meios e mecanismos de transmissão e à importância epidemiológica dos possíveis vetores.

Apesar das dúvidas, é certo que carrapatos ixodídeos realizam a transmissão biológica desse microrganismo havendo, aproximadamente, 20 espécies de carrapatos referidas na literatura como vetores de *A. marginale* conforme citação de Kocan et al. (2004), sendo, também, os responsáveis pela situação endêmica da anaplasmose (KESSLER, 2001). A infecção do carrapato ocorre no momento do repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado durante as fases aguda ou crônica da infecção (ERIKS et al., 1993).

A transmissão por carrapatos pode ocorrer de forma transestadial ou interestadial (quando a infecção acontece em um estágio e transmissão no estágio seguinte) ou intra-estadial (o adulto se infecta em um bovino infectado e transmite para um bovino sensível, ou seja, no mesmo estágio) (KESSLER, 2001; KOCAN et al., 2003). A transmissão intra-estadial, é realizada pelos machos que passam a desempenhar um importante papel na disseminação de *A. marginale*, por servirem como reservatório da riquetsia transmitindo o

patógeno repetidamente (KOCAN et al., 1992a, b *apud* KOCAN et al., 2004). A transmissão de *A. marginale* por carrapatos machos pode ser uma forma importante de transmissão da riquetsia por carrapatos de um só hospedeiro (KOCAN et al., 2003). Elevados níveis de riquetsemia em bovinos persistentemente infectados resultaram em uma taxa de infecção de mais de 80% em carrapatos machos cuja exposição foi intra-estadial e de 50% em adultos expostos como ninfas (ERIKS et al., 1993). Em bezerros, a infecção natural após o nascimento pode ser mais dependente dos níveis de anticorpos colostrais absorvidos do que da intensidade da infestação por *Boophilus microplus* (PACHECO et al., 2004).

Diferentes resultados têm sido descritos em relação à transmissão transovariana (de uma geração de carrapato para outra) (KOCAN et al., 2004). Em experimentos realizados na Embrapa Gado de Corte com o objetivo de isolar hemoparasitos de bovinos a partir de amostras de carrapatos coletados nas cinco regiões fisiográficas do Brasil, os pesquisadores concluíram que não houve transmissão transovariana, apesar dos carrapatos terem concluído o ciclo parasitário sobre bezerros esplenectomizados (KESSLER, 2001). Já foi relatado, entretanto, o diagnóstico positivo para *A. marginale* em larvas de *B. microplus* provenientes de teleóginas alimentadas em bezerros com baixa riquetsemia; a detecção nos ectoparasitas foi possível devido à utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (SHIMADA et al., 2004).

Os resultados de estudos realizados por Palmer et al. (2004) revelaram a ausência de transmissão preferencial de uma amostra específica de *A. marginale* dentro de uma população de animais persistentemente infectados, sendo compatíveis com um modelo de transmissão estocástica do patógeno.

Para que a transmissão mecânica seja efetuada, é necessário que sangue infectado com a riquetsia entre em contato com sangue de bovinos susceptíveis. Os meios que permitem essa veiculação são a transfusão de sangue, cirurgias coletivas, como descorna e castração, quando não são observados os cuidados de lavagem e esterilização dos instrumentos no intervalo de uso entre um bovino e outro, e vacinações com seringas automáticas, principalmente quando a mesma agulha é utilizada em vários animais (KESSLER, 2001). Os trabalhos de Ewing (1981), Potgieter et al. (1981), Foil (1989) e Ristic (1968), que relataram a ocorrência de transmissão desta riquetsia por dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Chrysops*, *Siphona* e mosquitos do gênero *Psorophora* são citados por Kessler (2001) e Kocan et al. (2003). Kessler (2001), entretanto, menciona ainda vários pesquisadores que não alcançaram sucesso nas tentativas de transmissão de *A. marginale* por diferentes espécies do gênero *Tabanus* e também *S. calcitrans*. Além disso, também relata a ausência de anaplasmose em bovinos sensíveis e esplenectomizados mantidos livres de carrapatos em estábulo aberto ou em piquetes isolados, mas vulneráveis ao ataque de moscas hematófagas. Mesmo sendo possível ocorrer, a transmissão mecânica por *S. calcitrans* é menos eficiente que a transmissão biológica por carrapatos, além de ser dependente da riquetsemia (SCOLES, et al., 2005), contudo, é considerada a principal forma de disseminação do patógeno nas Américas Central e do Sul onde os carrapatos vetores não ocorrem (EWING, 1981; FOIL, 1989 *apud* KOCAN et al., 2003; SCOLES et al., 2005). Assim, é necessário que mais pesquisas sobre a capacidade de insetos hematófagos transmitirem *A. marginale* sejam realizadas antes dos mesmos serem considerados vetores epidemiologicamente importantes (KESSLER, 2001).

A literatura descreve casos de infecção transplacentária resultantes, em sua maioria, de vacas infectadas durante o período gestacional; em vacas portadoras crônicas a transmissão intra-uterina ou transplacentária também pode ocorrer (KESSLER, 2001). Na África do Sul essa forma de transmissão chega a alcançar uma prevalência de 15,6% (POTGIETER; RENSBURG, 1987 *apud* KOCAN et al., 2003). Pacheco et al. (2004) examinaram o sangue de bezerros desde o nascimento, por meio de PCR e esfregaços sanguíneos corados com

Giemsa, constatando que a infecção intra-uterina não havia ocorrido. Esses animais eram filhos de vacas expostas ao carrapato *Boophilus microplus* e com riquetsemia variando entre 0 e 1%. O relato feito por Laus et al. (2006), sugere que seja um caso de infecção transplacentária; os autores relataram sobre um bezerro de seis horas de vida apresentando febre, apatia, inapetência e desconforto ocular. No esfregaço sangüíneo foram detectados corpúsculos de *A. marginale* e o mesmo exame, realizado na mãe, também apresentou resultado positivo para a riquetsia. Devido aos resultados divergentes, esse tipo de transmissão deve ser melhor estudado em relação à epidemiologia da anaplasiose (KESSLER, 2001), pois essa pode ser uma importante forma de contribuição à epidemiologia da referida doença em algumas regiões (KOCAN et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que diferentes isolados de *A. marginale* são infectantes para os bovinos, porém o mesmo fato não ocorre entre carrapatos. Os resultados das tentativas de transmissão de *A. marginale* isolados Florida, Illinois e Califórnia para o carrapato *Dermacentor* spp. foram todos negativos, enquanto os isolados Virginia, Oklahoma, Idaho, Mississippi e Oregon foram todos transmitidos para a mesma espécie de carrapato (KOCAN et al., 2002).

2.5 Ciclo Evolutivo

A. marginale submete-se a várias transformações durante o ciclo de desenvolvimento no artrópode vetor; os complexos eventos são coordenados com o ciclo de alimentação do ectoparasita, tendo sido estudados a partir de carrapatos machos persistentemente infectados (KOCAN, 1986; KOCAN et al., 1992a, b *apud* KOCAN et al., 2004). Durante o repasto sangüíneo os carrapatos ingerem eritrócitos infectados com *A. marginale* que se desenvolve inicialmente no intestino, de onde se dissemina para outros tecidos, promovendo uma infecção generalizada, que pode contribuir com a habilidade de patógeno se manter em carrapatos machos persistentemente infectados (GE et al., 1996). Apesar da presença da riquetsia em diferentes células do carrapato, a transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre via glândula salivar, no momento da alimentação do vetor (KOCAN et al., 1992a, b; GE et al., 1996 *apud* KOCAN et al., 2004); no entanto, antes que o repasto sangüíneo seja iniciado a riquetsia já pode ser encontrada na glândula salivar (LÖHR et al., 2002a). Eriks et al. (1993) observaram a existência de correlação positiva entre a riquetsemia média no gado persistentemente infectado e a taxa de infecção no carrapato. O nível de infecção na glândula salivar, entretanto, parece não ser diretamente dependente do nível de infecção do hospedeiro (KOCAN; FUENTE, 2003), pois o número de riquetsias presentes na glândula salivar aumenta gradualmente em carrapatos em jejum ou alimentados (LÖHR et al., 2002a).

Além do repasto sangüíneo, o vetor pode ser infectado, experimentalmente, por meio de alimentação artificial em tubos de microhematócrito (KOCAN et al., 2005). Neste caso, entretanto, a infecção ficou restrita ao intestino (KOCAN et al., 2005).

O desenvolvimento do microrganismo nos tecidos infectados ocorre em vacúolos ligados à membrana ou colônias; inicialmente é possível observar apenas as forma denominada reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, até que sejam formadas grandes colônias com centenas de organismos no interior. Essa forma então, passa por nova transformação, originando as formas densas, que se configuram, então, é o estágio infectante transmitido pelo carrapato e que também pode sobreviver fora das células do hospedeiro. Tanto as formas densas quanto as formas reticuladas podem ser encontradas nos bovinos, mas não são diferenciadas por meio de microscopia óptica (KOCAN et al., 2003). O ciclo de *A. marginale* no hospedeiro vertebrado foi estudado por meio de técnicas de microscopia de fluorescência e eletrônica (RISTIC; WATRACH, 1963). No interior de vacúolos formados pela membrana celular, os corpúsculos iniciais se multiplicam por fissão binária. Após o

período de multiplicação o vacúolo com os novos corpúsculos move-se para a periferia da célula e através de estruturas semelhantes a microfibrilas são transferidos para outros eritrócitos, que são as únicas células parasitadas no hospedeiro vertebrado (RISTIC; WATRACH, 1963). Em hospedeiros imunocompetentes, essa riquetsia é capaz de sobreviver e se multiplicar por, no mínimo, sete anos e esse comportamento parece ser um acontecimento comum (KIESER et al., 1990). A infecção persistente é mantida através de variação antigênica das proteínas de superfície MSP2 e MSP3, permitindo ao microrganismo evadir a resposta imune (BRAYTON et al., 2005).

2.6 Patogenia e Sinais Clínicos

O período pré-patente da infecção por *A. marginale* é variável em função do número de organismos infectantes e da resistência natural do hospedeiro, com um tempo que leva de sete a 60 dias e com média de 28 dias (JATKAR; KREIER 1967; AJAYI et al., 1978 *apud* KOCAN et al., 2003). Em bezerros esse período também é influenciado pela diminuição dos níveis de anticorpos colostrais e exposição gradativa aos carrapatos (PACHECO et al., 2004). Após o período de incubação, há uma fase de anemia que evolui para severa e persistente até que ocorra o retorno a valores próximos do hematócrito normal; nessa etapa ocorre rápida elevação do número de eritrócitos infectados (JATKAR; KREIER, 1967). No estágio seguinte, os eritrócitos infectados são fagocitados pelas células do sistema retículo-endotelial do hospedeiro resultando em anemia branda a severa e icterícia sem hemoblobinnemia e hemoglobinúria (KOCAN et al., 2003). Durante a anemia causada pela anaplasiose ocorre hiperplasia eritróide, como um mecanismo compensatório, que começa na fase de anemia inicial e persiste até a recuperação (JATKAR; KREIER, 1967). A intensidade da manifestação dos sinais observados na anaplasiose pode ocorrer em função do estado nutricional dos animais infectados (AJAYI et al., 1978). Animais infectados e que adoecem podem apresentar outros sinais, como: febre, fraqueza geral, palidez das mucosas, discreta perda de apetite, depressão, taquipnéia e tremores musculares nos bovinos mais severamente afetados (AJAYI et al., 1978), além de aborto e letargia. A anemia, entretanto, é o maior sinal clínico da anaplasiose e é do tipo macrocítica e normocrômica (JATKAR; KREIER, 1967). Recentemente, Laus et al. (2006), relataram um caso de uveíte crônica secundária à doença sistêmica, factível com anaplasiose em um bovino recém-nascido. O bezerro apresentou febre, apatia, inapetência e desconforto ocular. No exame oftálmico de rotina, os valores de teste da lágrima de Schimer apresentaram-se aumentados, a pressão intra-ocular diminuída, hemorragia conjuntival, uveíte anterior, edema corneal e injeção ciliar em ambos os olhos. No esfregaço sangüíneo desse animal, também foram detectadas hemácias infectadas com corpúsculos de *A. marginale*.

A morte acomete principalmente animais acima de dois anos de idade (RISTIC, 1977 *apud* KOCAN et al., 2003).

Durante a necropsia, é possível verificar que as carcaças dos bovinos acometidos pela anaplasiose apresentam-se emaciadas, desidratadas e, de forma geral, há palidez dos órgãos; em alguns casos, o tecido subcutâneo e as membranas mucosas ficam ictericos. O fígado se apresenta com aumento de volume, dilatação dos sinusóides e necrose centro-lobular. Nos pulmões, há edema, acúmulo de fluido seroso nos alvéolos e infiltração celular. No abomaso observa-se a mucosa edematosa. A vesícula biliar apresenta-se distendida e com conteúdo espesso e escuro. O aspecto do cérebro pode ser normal ou apresentar suave congestão. O coração tem aspecto flácido e com hemorragias petequiais e infiltração de células mononucleares. O baço apresenta aumento de volume e excesso de hemossiderina. Os rins apresentam-se congestos e com infiltração de material proteináceo no lúmen tubular, a vesícula urinária distendida e a urina com coloração marrom amarelada. Em alguns animais as

membranas mucosas do cólon e do reto apresentam-se fortemente congestionadas e levemente edematosas (GALHOTRA et al., 1977).

Os animais que sobrevivem à anaplasmoze aguda desenvolvem infecções persistentes, caracterizadas por repetidos ciclos de riquetsemia que variam de $10^{2.5}$ a 10^7 eritrócitos infectados/ml de sangue (KIESER et al., 1990; ERIKS et al., 1993; FRENCH et al., 1998). Os animais persistentemente infectados são clinicamente saudáveis e servem como reservatórios de *A. marginale* (SCOLES et al., 2005).

2.7 Imunidade Contra *A. marginale*

Bovinos expostos a *A. marginale* vivo ou morto desenvolvem uma resposta imune mediada por células que pode servir como mecanismo de proteção em conjunto com uma resposta imune humoral (CARSON et al., 1975 *apud* BAUTISTA, 1996).

A resposta imune humoral contra *A. marginale* inicia-se com a síntese de IgM, coincidindo com o início da riquetsemia; posteriormente, ocorre a síntese e secreção de IgG e até 30 dias após a crise hemolítica, a proporção observada é de 25% de IgM para 75% de IgG (MURPHY et al., 1966; MADRUGA et al., 2001).

A importância dos anticorpos na imunidade protetora contra *A. marginale* foi corroborada pelas pesquisas de Madruga et al. (1985), ao constatarem que em áreas de estabilidade enzoótica, bezerros com níveis baixos ou inexistência de anticorpos colostrais, desenvolveram a doença. Gale et al. (1992), entretanto, observaram que bovinos que receberam inoculação intravenosa de soro imune contra *A. marginale*, não apresentaram alteração nem no nível de riquetsemia nem na anemia, indicando o provável envolvimento de outros mecanismos de defesa (WYATT et al., 1996).

Outro fato a ser considerado e que também ressalta a importância dos anticorpos está relacionado aos eritrócitos bovinos; essas células não apresentam, na superfície, antígenos da classe I do complexo de histocompatibilidade principal e estrutura de processamento de antígeno, para que possa haver uma resposta imune celular, própria para o combate de organismos intracelulares (MADRUGA et al., 2001).

Os anticorpos participam da imunidade protetora contra *A. marginale* de diferentes modos: podem atuar como opsoninas colaborando no processo de fagocitose, atraindo os macrófagos ativados até os eritrócitos infectados com a riquetsia (CARSON et al., 1975 *apud* CANTOR et al., 1993); impedem que as riquetsias se fixem e penetrem nos eritrócitos (McGAREY; ALLRED, 1994); além disso, também podem estar envolvidos nos processos de lise direta dos corpúsculos iniciais em conjunto com complemento, e citotoxicidade anticorpo-dependente (MADRUGA et al., 2001).

No modelo de resposta imune protetora contra *A. marginale* é fundamental a participação dos linfócitos T ($CD4^+$) produtores de interferon- γ (INF- γ) que estimulam a síntese de IgG2 pelos linfócitos B no gado (ESTES et al., 1994). *In vitro*, tanto IgG1 quanto IgG2 são capazes de se ligarem a macrófagos ativados, mas apenas IgG2 está envolvida no mecanismo de opsonização para monócitos e neutrófilos, sendo provável que essa subclasse seja a mais importante para a fagocitose *in vivo* (McGUIRE et al., 1979 *apud* TUO et al., 2000). Apesar disso, talvez não sejam necessários títulos elevados desta subclasse de anticorpos para controlar a infecção (VALDEZ, et al., 2002).

Por sua vez, o INF- γ ativa macrófagos para estimular a expressão de receptores de fração cristalizável (Fc) e a fusão de fagossomos e lisossomos (BROWN et al., 1998a). Esse estímulo é importante, pois bovinos possuem um receptor de Fc exclusivo nos macrófagos e neutrófilos, cuja estrutura é diferente de qualquer outro receptor de Fc e só se liga à IgG2 (TIZARD, 2002). O INF- γ também estimula a produção de óxido nítrico, substância que tem ação tóxica sobre riquetsias (BROWN et al., 1998a). O óxido nítrico por si só não é altamente

tóxico, entretanto, os produtos gerados de sua reação com o ânion superóxido, tais como peroxinitrito e dióxido de nitrogênio radical são muito tóxicos. Assim, a produção contínua de óxido nítrico permite que os macrófagos eliminem de maneira eficiente vários microrganismos (TIZARD, 2002). Essa é a base da imunidade específica mediada por células, contra patógenos intracelulares obrigatórios que não podem ser alvo direto do complexo de histocompatibilidade maior ou dos linfócitos citotóxicos (PALMER et al., 1999).

As células T $\gamma\delta$ também devem ser avaliadas quanto à participação nos mecanismos de controle da anaplasnose. Animais jovens que apresentam elevados níveis de circulação dessas células são mais resistentes que os adultos à infecção por *A. marginale* (ROBY et al., 1961; JONES et al., 1968 *apud* LAHMERS et al., 2005); além disso, o número dessas células diminui de modo significativo durante a infecção aguda (WYATT et al., 1996), provavelmente devido ao fato de serem seqüestradas do sangue periférico para outros tecidos (LAHMERS et al., 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que células T $\gamma\delta$ secretam IFN- γ em resposta a *A. marginale* e à proteína de superfície denominada MSP2 (LAHMERS et al., 2005). Nos ruminantes, essas células respondem, predominantemente, na reação linfocítica mista, sugerindo que possam reconhecer antígenos estranhos e que também sejam citotóxicas (TIZARD, 2002).

2.8 Progressos na Imunização Contra *A. marginale*

A indução de imunidade protetora após infecção natural ou induzida com cepas menos virulentas é um indicativo da imunoprofilaxia como método de controle da anaplasnose. A despeito da premunicação ser o método mais comum em áreas enzoóticas, há vários inconvenientes quanto ao seu uso (PALMER; McELWAIN, 1995).

A utilização de vacinas vivas com *A. centrale*, que é menos virulento, ou até mesmo com *A. marginale* vivo ou morto, acontece em várias partes do mundo (PIPANO, 1995; BRIZUELA et al., 1998). A base para proteção contra *A. marginale* utilizando-se *A. centrale* como vacina ainda é desconhecida, mas é bem provável que sejam as proteínas de superfície conservadas entre essas espécies (MOLAD et al., 2004).

Apesar de menos eficazes do que as vacinas vivas, vacinas que utilizam organismos mortos também induzem proteção contra riquetsemia elevada reduzindo, assim, o pico de riquetsemia na fase aguda (PALMER, 1989).

A vacinação no primeiro mês de vida, por via endovenosa com amostra homóloga de *A. marginale* criopreservado em dimetilsulfóxido e posterior administração de diidrato de oxitetraciclina por via intramuscular, protegeu os animais de riquetsemias elevadas quando submetidos ao desafio de campo (RIBEIRO et al., 2003). Apesar de ser uma medida de controle indicada seu uso é restrito a propriedades que possuam instalações individuais para bezerros e bom controle de vetores (RIBEIRO et al., 2003).

Vacinas inativadas com organismos intactos ou frações têm protegido os bovinos frente ao desafio. Os avanços no conhecimento da biologia molecular e da bioquímica de *A. marginale* têm permitido a identificação de antígenos comuns a todas as cepas testadas e que induzem proteção no gado imunizado (PALMER; McELWIN, 1995; MONTENEGRO-JAMES et al., 1995; BARBET, 1995).

2.8.1 Proteínas principais de superfície de *A. marginale*: caracterização e importância como imunógenos

Vários estudos demonstraram o valor das proteínas de superfície de *A. marginale* na proteção contra a anaplasnose. Bovinos imunizados com membrana externa da cepa Florida de *A. marginale* foram protegidos contra o desafio homólogo (PALMER et al., 1986).

Montenegro-James et al. (1991) descreveram a eficácia de uma vacina desenvolvida com corpos iniciais purificados da membrana de *A. marginale*; os animais testados apresentaram significativa redução da riquetsemia e mínima alteração do hematócrito; mesmo não induzindo imunidade a prevenção da mortalidade e redução da morbidade já foram um indicativo da importância de imunógenos baseados em corpúsculos iniciais de *Anaplasma*. Bovinos imunizados com membrana externa da cepa Florida de *A. marginale* apresentaram riquetsemia máxima de 0,15% após 33 dias de exposição ao desafio homólogo (BROWN et al., 1998a). Estas descobertas corroboram o potencial das proteínas de membrana externa para serem usadas como componentes de vacinas de proteínas recombinantes ou de ácidos nucleicos para o controle da anaplasmose (ARULKANTHAN et al., 1999).

As proteínas de membrana de *Anaplasma* são capazes de gerar resposta imune protetora através de mecanismos que incluem a lise dos corpos iniciais, bloqueio de receptores ou fagocitose mediada por anticorpos (PALMER et al., 1999).

Com o objetivo de desenvolver vacinas mais eficazes e seguras que previnam a morbidade e a mortalidade, os estudos atuais têm como foco as proteínas principais de superfície de *A. marginale* obtidas na fase aguda da infecção (PALMER et al., 1999).

No decorrer dos anos as pesquisas permitiram a identificação de diversas proteínas em *A. marginale*. Inicialmente foram detectadas e caracterizadas seis proteínas principais de superfície (*Major Surface Proteins*-MSPs) na membrana dos corpúsculos iniciais *A. marginale*, as quais foram denominadas como MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER; McGUIRE, 1984; BARBET et al., 1987; OBERLE et al., 1988; TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993; TEBELE et al., 1991; VISSER et al., 1992). As MSPs são conservadas tanto nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, quanto nas células do carrapato vetor (BARBET et al., 1999). Por meio de técnicas de eletroforese bidimensional quatro novos antígenos protéicos foram identificados na membrana de *A. marginale* e nomeados como Ana 17, 29, 32 e 37 com massa molecular entre 17 e 44 kDa (RIDING et al., 2003). Ana 29 foi caracterizada por Hope et al. (2004), que produziram a proteína recombinante Ana 29, utilizada para imunização de bovinos. Os resultados da imunização variaram em função do adjuvante empregado.

Recentemente, a combinação de técnicas imunológicas e de biologia molecular, mais especificamente, de genômica e proteômica, permitiu que, aproximadamente, 62 novas proteínas presentes em *A. marginale* fossem conhecidas (BRAYTON et al., 2005; LOPEZ et al., 2005; BRAYTON et al., 2006), aumentando as opções para o desenvolvimento de novos imunógenos.

Superfamília MSP1

O complexo MSP1 é um heterodímero formado por MSP1a e MSP1b, que se ligam por pontes dissulfeto e cuja massa molecular varia entre os diferentes isolados geográficos (BARBET et al., 1987; OBERLE et al., 1988; ALLRED et al., 1990; VIDOTTO et al., 1994).

MSP1a é codificada pelo gene *m脾1a* presente em cópia única (ALLRED et al., 1990) e que possui uma série de seqüências de 84-87 pb (correspondentes a 28 ou 29 aminoácidos) repetidas duas a oito vezes, localizadas na região N-terminal. Tais seqüências apresentam uma variação mínima entre os isolados, com 25 resíduos de aminoácidos completamente conservados. Nos isolados brasileiros oriundos do estado de Minas Gerais foram detectadas três a cinco repetições. As variações no número de seqüências repetitivas em cada isolado podem explicar o polimorfismo de tamanho (46-105 kDa) observado entre as amostras de *A. marginale* (ALLRED et al., 1990; FUENTE et al., 2001a; FUENTE et al., 2002a; FUENTE et al., 2004). Apesar das variações, a seqüência de *m脾1a* mantém-se conservada em cada isolado durante o ciclo de vida da riquetsia no hospedeiro vertebrado e no vetor (FUENTE;

KOCAN, 2001; PALMER et al., 2001; BOWIE et al., 2002).

MSP1a está presente nos isolados brasileiros São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Pernambuco (KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). A proteína possui um epitopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal ANA22B1, que reage com proteínas de massas moleculares que variam de 46 a 105 kDa (KANO et al., 2002).

No genoma do isolado Saint Maries foram identificadas três seqüências codificantes com similaridade estrutural para a metade da região C-terminal de MSP1a, designada como proteínas MSP1a-like (MLP2-4). MLP2 e MLP3 possuem respectivamente, 30% e 37% de identidade para a região N-terminal final de MSP1a. MLP3, entretanto, não apresenta seqüência de identidade considerável para MSP1a (BRAYTON et al., 2005).

MSP1b é codificada por uma família multigênica (BARBET; ALLRED, 1991), composta por cinco membros, dos quais dois são genes completos (*msp1 β -1* e *msp1 β -2*) e os demais são genes parciais (pg) (*msp1 β pg1*, *msp1 β pg2*, *msp1 β pg3*) (VISHAKUL et al., 2000). A organização dos genes é similar nos isolados Saint Maries e Florida de *A. marginale*. O percentual de identidade entre os dois isolados é de 95% para *msp1 β -1*; 77% para *msp1 β -2*; 99% para *msp1 β pg1*; 28% para *msp1 β pg2*; e 91% para *msp1 β pg3*). É provável que os genes parciais sejam pseudogenes funcionais que permitam variação antigênica de MSP1b (BRAYTON et al., 2005). As seqüências de *msp1 β ₁* e *msp1 β ₂* mantêm-se conservadas durante as passagens no vetor e no mamífero, mas com pequenas variações atribuídas a eventos de recombinação, seleção de sub-populações de *A. marginale* no hospedeiro vertebrado e até mesmo erros de amplificação (BOWIE et al., 2002). MSP1b é polimórfica entre os diferentes isolados, os quais apresentam variação de 1 a 3 kDa (OBERLE et al., 1988) como resultado de inserções e deleções de nucleotídeos nos genes que formam esta família (CAMACHO-NUEZ et al., 2000).

Dentre seis isolados brasileiros testados para verificar a conservação de MSP1b, apenas dois (Minas Gerais e Paraná-L1) apresentaram epitopos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal AMR36A6, que também reconhece uma proteína de 100 kDa do isolado Florida (KANO et al., 2002). Posteriormente, também foi detectada nos isolados Pernambuco e Mato Grosso do Sul (OLIVEIRA et al., 2003).

O complexo MSP1 está envolvido no mecanismo de infecção das células do hospedeiro (McGAREY; ALLRED, 1994; McGAREY et al., 1994). MSP1a é uma adesina para os eritrócitos bovinos e para as células de carrapatos, enquanto MSP1b é uma adesina apenas para os eritrócitos bovinos (FUENTE et al., 2001b), sendo necessária à infecção, multiplicação e transmissão da riquetsia por carrapatos *Dermacentor* spp e talvez em outras espécies de carrapatos (FUENTE et al., 2001c).

Bovinos imunizados com *A. marginale* desenvolvem uma resposta imune diferencial para MSP1a e MSP1b (KOCAN et al., 2001; GARCIA-GARCIA et al., 2004a, b). A imunização de bovinos com MSP1 estimulou a produção de anticorpos contra MSP1a e MSP1b e protegeu os animais dos desafios homólogo e heterólogo. No desafio homólogo os animais chegaram a apresentar riquetsemia de 4,5%; já no desafio heterólogo, os animais foram totalmente protegidos da riquetsemia (PALMER et al., 1989). Indicando este fato que epitopos que estimulam resposta imune protetora são conservados entre amostras heterólogas de *A. marginale* (BROWN et al., 2002).

A resposta específica de anticorpos contra MSP1a e MSP1b foi estudada em bovinos imunizados e persistentemente infectados (KOCAN et al., 2001). Os animais imunizados com antígenos derivados de cultura de células de carrapatos apresentaram reconhecimento para MSP1 β 1 enquanto os animais imunizados com *A. marginale* oriundo de cultivo de eritrócitos reconheceram MSP1a. Bovinos infectados naturalmente desenvolvem anticorpos para ambos os antígenos (KOCAN et al., 2001; GARCIA-GARCIA et al., 2004a). A imunização de bovinos com MSP1a recombinante em combinação com *A. marginale* derivado

de cultura de células de carrapatos estimulou a produção de elevados títulos de anticorpos contra MSP1a (GARCIA-GARCIA et al., 2004a), sugerindo que os anticorpos que respondem contra MSP1a podem ser importantes no desenvolvimento da imunidade protetora e na redução das infecções por carrapatos (GARCIA-GARCIA et al., 2004b).

Em bovinos imunizados com MSP1a recombinante, ou com *A. marginale* oriundo de cultura de células de carrapatos ou de eritrócitos, ou uma combinação de *A. marginale* de cultura de células de carrapatos e MSP1a recombinante observou-se que os anticorpos são direcionados principalmente contra a região N-terminal dessa proteína (GARCIA-GARCIA et al., 2004b). Nessa região são encontrados dois peptídeos que compartilham a sequência SSAGGQQESS, reconhecida por soros de animais imunizados com MSP1a recombinante, *A. marginale* derivado de eritrócitos ou de cultura de células de carrapatos, ou *A. marginale* de cultura de células em conjunto com MSP1a recombinante (GARCIA-GARCIA et al., 2004b).

Apesar da resposta de anticorpos ser direcionada principalmente contra a região N-terminal, níveis menores de anticorpos também foram detectados contra a região C-terminal (GARCIA-GARCIA et al., 2004b). Brown et al. (2001a) relataram que o soro de gado imunizado com MSP1 reconhece um epitopo na região N terminal e no mínimo um epitopo na região C terminal que induz elevados títulos de anticorpos. A resposta celular, que envolve a participação de linfócitos T CD4⁺, em bovinos imunizados com MSP1 nativa é direcionada contra epitopos conservados na região C terminal de MSP1a altamente conservada entre as amostras de *A. marginale* (BROWN et al., 2001a). Os autores observaram também, a intensa proliferação de células mononucleares de sangue periférico de bovinos expostos a isolados homólogos e heterólogo de *A. marginale*.

Bovinos imunizados com uma vacina de DNA contendo o gene que codifica MSP1b foram parcialmente protegidos do desafio homólogo virulento; os animais foram protegidos de níveis elevados de riquetsemia, mas alguns apresentaram sinais da doença e por esse motivo receberam tratamento. No Western blot os soros dos animais imunizados reconheceram MSP1b (ANDRADE et al., 2000). A imunização de bovinos com MSP1 recombinante e associada a MSP2, não protegeu os animais em experimentos desenvolvidos na Embrapa Gado de Corte (ARAÚJO, 2005).

As diferenças nas respostas de anticorpos para MSP1b entre eritrócitos e cultivo de células de carrapatos no gado imunizado podem ocorrer em função da imunodominância de MSP1a, resultando em títulos mais baixos de anticorpos contra MSP1b quando MSP1a está presente em quantidades maiores nos antígenos derivados de eritrócitos (GARCIA-GARCIA et al., 2004a). Apesar da resposta diferencial, o título de anticorpos contra MSP1a ou MSP1b não chega a apresentar correlação com o nível de proteção contra a infecção por *A. marginale* (GARCIA-GARCIA et al., 2004b).

A análise preditiva de proteínas transmembranares na MSP1a do isolado Virginia de *A. marginale* revelou a existência de um grande domínio hidrofílico dos aminoácidos 1 a 366 e uma região hidrofóbica compreendida entre os aminoácidos 367 e 593. No isolado Florida o domínio hidrofílico estende-se dos aminoácidos 1 a 540 e o domínio hidrofóbico, dos aminoácidos 541 a 767 (BROWN et al., 2002). O domínio hidrofílico contém o epitopo sensível à neutralização EASTSS(S/Q) (ALLRED et al., 1990). O mapeamento dos peptídeos revelou pelo menos cinco epitopos conservados capazes de estimular as células T CD4⁺ em bovinos que expressam os haplótipos *DR-DQ*. Peptídeos representando três epitopos estimularam clones de células T CD4⁺ restrito ao haplótipo DR (BROWN et al., 2002).

Tanto MSP1a quanto MSP1b são glicosiladas. A glicosilação é particularmente abundante na região N terminal de MSP1a que contém os peptídeos repetitivos. No isolado Oklahoma de *A. marginale*, foi demonstrado que os peptídeos repetidos contém 43% de serina/treonina e são, em sua maioria, O-glicosilados (GARCIA-GARCIA et al., 2004c). Os

resíduos serina/treonina estão muito próximos do epitopo sensível à neutralização e ao aminoácido localizado na posição 20 (ALLRED et al., 1990) que tem um papel crítico na adesão de MSP1a ao extrato de células de carrapatos e provavelmente na adesão aos eritrócitos bovinos (FUENTE et al., 2003a). A maioria dos resíduos de serina/treonina foi conservada entre diferentes isolados de *A. marginale*. MSP1b contém apenas 12% de serina/treonina e um único sítio O para glicosilação e sete potenciais sítios para N glicosilação (GARCIA-GARCIA et al., 2004c). Em MSP1a e em MSP1b foram detectados apenas açúcares neutros, indicando este fato que um tipo raro de glicosilação ocorre nas duas proteínas (GARCIA-GARCIA et al., 2004c).

Superfamília MSP2

A superfamília *msp2* contém 56 membros e dentre esses, 16 são pseudogenes; é construída em torno de *msp2*, *msp3* e *msp4*, para os quais existe um sítio completo de expressão no genoma (BRAYTON et al., 2005), no qual há também, sete pseudogenes para *msp2* e sete pseudogenes funcionais para *msp3*; adicionalmente aos pseudogenes funcionais há duas seqüências remanescentes de *msp3* (BRAYTON et al., 2005).

MSP2

MSP2 (36-44 kDa) é uma proteína imunodominante de membrana externa (PALMER; McGUIRE, 1984; PALMER et al., 1994a; BROWN et al., 2004) com regiões conservadas e variáveis (FRENCH et al., 1999). A região central hipervariável estende-se do aminoácido 180 ao 275 e é flanqueada por regiões N e C terminais altamente conservadas. Na região variável 74% dos aminoácidos são hidrofílicos, enquanto na região N terminal (aminoácidos 1 a 180) apenas 45% dos aminoácidos apresenta essa característica, que é ainda menor (30%), na região C terminal (aminoácidos 276 a 411) (FRENCH et al., 1999). A comparação das seqüências preditas de aminoácidos de MSP2 em *A. marginale* e *A. phagocytophilum* revelou uma similaridade de 96% e 87% nas regiões N e C terminais, respectivamente (FRENCH et al., 1999). MSP2 é expressa nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, na glândula salivar do artrópode e em cultura de células de carrapatos (BARBET et al., 1999).

O gene *msp2* é transcrito como parte de um operon de quatro genes com curtos espaços intragênicos; os outros três são denominados como *operon associated genes (opags)* 1, 2 e 3 (BARBET et al., 2000; LÖHR et al., 2002b; BRAYTON et al., 2005). Esse operon contém um promotor na extremidade 5' que é seguido por quatro fases abertas de leitura: *opag3*, *opag2*, *opag1* e *msp2*. OpaG2 e OpaG3 são expressos em eritrócitos de bovinos na fase aguda da doença e em células embrionárias de carrapatos (LÖHR et al., 2002b). Ademais, OpaG2 também é expresso em células embrionárias de carrapatos, intestino médio e glândula salivar de carrapatos, e OpaG3, em células embrionárias (LÖHR et al., 2002b). A organização estrutural do operon de *msp2* em *A. marginale* é muito similar ao sítio de expressão em *A. phagocytophilum* e à extremidade 5' de *omp1* e *p30* de *Erlischia chaffeensis* e *E. canis*, respectivamente. A estabilidade dos genes *omp1* e *opag* de *A. marginale* bem como o padrão policistrônico de transcrição é similar aos dos genes *omp1* e *p30* de *E. chaffeensis* e *E. canis* (LÖHR et al., 2004). Existe sintenia entre o arranjo desses genes e parte da superfamília *msp2* na região do operon de *msp2* em *A. marginale* e também em *A. phagocytophilum*, inclusive com conservação de função (BARBET et al., 2003; LÖHR et al., 2004; BARBET et al., 2005), e também entre os gêneros *Anaplasma* e *Erlischia*; esta sintenia suporta um ancestral comum para os dois gêneros. A divergência observada em *A. marginale* e *A. phagocytophilum* resultou em desenvolvimento ou aquisição de mecanismos para gerar o marcado polimorfismo de MSP2 (LÖHR et al., 2004). Os ortólogos de *msp2* nos membros do

gênero *Erlischia*, como *E. chaffeensis* (OHASHI et al., 1998) estão dispostos como genes completos em um (*E. ruminantium*, *E. chaffeensis*) ou dois (*E. canis*) loci contendo 16-25 parálogos (BRAYTON et al., 2005).

O anticorpo monoclonal ANAF19E2 reage com MSP2 (36 kDa) do isolado Florida de *A. marginale* e também reconhece os isolados brasileiros Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, desta riquetsia (KANO et al., 2002). A proteína também foi detectada nos isolados Pernambuco e Mato Grosso do Sul, utilizando-se os anticorpos monoclonais ANAO50A2, ANAO58A2, ANAO066A2 e ANAO70A2 (OLIVEIRA et al., 2003).

MSP2 é expressa tanto nos períodos de riquetsemia aguda quanto persistente e exibe variantes antigênicas nessas fases (EID et al., 1996; FRENCH et al., 1998). A cada ciclo de riquetsemia ocorre variação na região central da MSP2 expressa sendo esse o único local de polimorfismo estrutural de MSP2, resultando em verdadeiras variantes antigênicas que emergem durante a infecção persistente (FRENCH et al., 1999). Os pseudogenes têm participação essencial no surgimento de novas variantes de MSP2. Os pseudogenes de *msp2* possuem uma região central hipervariável flaqueada por porções conservadas de regiões 5' e 3'. A recombinação de pseudogenes *msp2* dentro de um sítio de expressão funcional possibilita a geração de novas variantes antigênicas e evasão da resposta imune (BRAYTON et al., 2001). A recombinação de um pseudogene completo é seguida por um segundo nível de variação em que pequenos segmentos de pseudogenes, por mecanismo de conversão gênica, produzem combinações de seqüências na região hipervariável de *msp2* (BRAYTON et al., 2002).

A pressão de seleção de MSP2 ocorre na glândula salivar do carrapato independente da resposta do sistema imune bovino. O alinhamento das seqüências de MSP2 obtidas da glândula salivar de *Dermacentor variabilis* persistentemente infectados revelou múltiplas substituições de aminoácidos, inserções e deleções resultando em surgimento de novas variantes de MSP2 (FUENTE; KOCAN, 2001).

A presença de conjuntos diferentes de pseudogenes de *msp2* talvez seja importante para estabelecer uma nova infecção em um animal já infectado, pois se o conjunto de pseudogenes for muito diferente na segunda infecção, as variantes expressas podem escapar da resposta imune existente e estabelecer uma superinfecção (RODRIGUEZ et al., 2005). A complexidade de variantes de MSP2, que é o número de segmentos derivados de diferentes pseudogenes, aumenta com o tempo de duração da infecção. Esse aumento resulta em geração progressiva de sítios de expressão variantes que são mosaicos de seqüências de diferentes pseudogenes (FUTSE et al., 2005).

Por meio de PCR em tempo real, Western blot, e seqüenciamento do DNA verificou-se que as variantes de MSP2 estão presentes no intestino médio do vetor nas primeiras 48 horas de repasto sanguíneo, quando a infecção é adquirida e também na glândula salivar antes que a transmissão pela alimentação seja iniciada, sugerindo que MSP2 seja necessária à infecção (LÖHR et al., 2002a).

Como imunógeno, MSP2 estimula de forma variável as respostas humoral e celular sendo capaz de conferir algum tipo de proteção aos animais vacinados (BROWN et al., 2001b; ABBOTT et al., 2004; ABBOTT et al., 2005; ARAÚJO, 2005). Bovinos imunizados com MSP2 nativa foram protegidos contra o desafio homólogo realizado com isolado Florida de *A. marginale*. O nível de proteção variou de aumento do período pré-patente até a prevenção total da riquetsemia com elevados títulos de anticorpos para o imunógeno (PALMER et al., 1988). Os animais submetidos ao desafio heterólogo com isolado Washington apresentaram resultados semelhantes e com riquetsemias inferiores a 1% (PALMER et al., 1988).

Em bovinos imunizados com MSP2 tendo como adjuvante a interleucina-12 foram detectados elevados títulos de IgG com maior predominância de IgG1 duas semanas após a

quinta inoculação de uma série de seis. Também foram detectadas elevadas respostas proliferativas de células mononucleares de sangue periférico por até nove meses após a imunização (TUO et al., 2000).

A associação dos adjuvantes interleucina 12 ou CpG ODN (oligodeoxinucleotídeo) 2006 à MSP2 é capaz de estimular uma resposta imune mediada por células significativamente maior nos bovinos do que se os mesmos fossem vacinados apenas com MSP2 adsorvida em alúmen (ZHANG et al., 2003). A resposta humoral também foi maior nos animais em que o CpG ODN foi usado; elevados títulos de IgG1 e IgG2 foram detectados na segunda e na terceira imunizações, respectivamente. Com a interleucina 12, títulos elevados de IgG1 e IgG2 foram detectados logo na segunda imunização, entretanto nem todos os animais apresentaram titulação elevada de IgG2 (ZHANG et al., 2003).

Bovinos imunizados com MSP2 tendo a interleucina 12 ou CpG como adjuvantes, desenvolveram altos título de anticorpos, com os níveis de IgG1 sendo consideravelmente mais elevados que IgG2. A resposta de células T CD4⁺ entretanto, foi severamente diminuída conforme observado em diferentes momentos por até um ano após o desafio (ABBOTT et al., 2005).

A imunização de bovinos com MSP2 recombinante e CpG ODN 2006 como adjuvante não protegeu os animais contra desafio heterólogo em experimentos conduzidos na Embrapa Gado de Corte (Mato Grosso do Sul); foi observado, no entanto a indução de significativa resposta humoral (ARAÚJO, 2005).

A resposta de anticorpos IgG é direcionada contra epitopos localizados principalmente na região central hipervariável, enquanto a resposta celular que envolve a participação de células T CD4⁺ e IFN γ é direcionada contra os vários os epitopos distribuídos nas regiões N e C altamente conservadas e hipervariável (ABBOTT et al., 2004).

Além do potencial como imunógeno MSP2 também apresenta considerável valor para diagnóstico. Recentemente foram desenvolvidos testes ELISAs baseados nas proteínas de superfície MSP1 e MSP2 recombinantes. Os ensaios apresentaram elevadas sensibilidade e especificidade, com os dois antígenos sendo reconhecidos por soros de diferentes regiões do Brasil (ARAÚJO et al., 2005).

MSP3

MSP3 é uma proteína imunodominante, hidrossolúvel, presente nos corpos iniciais de *A. marginale* e reconhecida anteriormente como Am86 (PALMER et al., 1986). A denominação atual passou a ser utilizada a partir do isolamento e caracterização de uma proteína de 86 kDa de oito isolados de *A. marginale*, geograficamente diferentes (McGUIRE et al., 1991). Já foi observado, entretanto, a existência de polimorfismo de tamanho nos isolados Virginia, South Idaho e Washington, cuja massa molecular alcança 65 a 86 kDa (ALLEMAN; BARBET, 1996; ALLEMAN et al., 1997). Esses valores podem ser explicados pela existência de variação na região central variável caracterizada por diferenças tão grandes quanto 543 pb e identidade de seqüências tão baixas quanto 68%, conforme revelado pela análise do sítio de expressão de MSP3 dos isolados Florida e Saint Maries (MEEUS et al., 2003). Foi observada variação antigênica nos isolados Zimbabwe (TEBELE et al., 1991) e norte-americanos (ALLEMAN; BARBET, 1996). Entre os isolados brasileiros, apenas a amostra Minas Gerais (AUFV1) apresenta epitopo de MSP3, conforme demonstrado pela reação de uma proteína de 86 kDa com os anticorpos monoclonais AMG75C2 e AMG76B1 (KANO et al., 2002).

MSP3 é codificada por uma família multigênica distribuída através do genoma (ALLEMAN et al., 1997). O gene *mps3* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* tendo sido identificadas várias cópias no genoma dos isolados Florida, Virginia e South Idaho

(ALLEMAN et al., 1997). No genoma de *A. marginale* há um sítio de expressão completo para *msp3*; adicionalmente há sete pseudogenes funcionais para *msp3* (BRAYTON et al., 2005).

Pseudogenes inteiros de *msp3* se recombinam dentro do sítio único de expressão gerando variantes de MSP3. Assim, durante a infecção aguda, múltiplos transcritos de *msp3* são expressos em uma população de *A. marginale*. Apenas o sítio de expressão de *msp3* codifica a proteína completa, incluindo a região C terminal compartilhada por MSP2 e MSP3 (MEEUS et al., 2003). Após evento de duplicação original *msp2* e *msp3* divergiram substancialmente, originando proteínas de 40 e 80 kDa, antigenicamente diferentes (MEEUS et al., 2003).

Na região N terminal de MSP3 há pelo menos um epitopo suficientemente conservado em MSP2 para estimular as células T do gado imunizado com MSP2. Na região N terminal de MSP2 os aminoácidos 46 a 69 são 70,8% idênticos aos aminoácidos 51 a 74 em MSP3, e 116 a 144 em MSP2 e são 82,7% idênticos àqueles nas posições 128 a 156 de MSP3 (MEEUS et al., 2003; BROWN et al., 2004).

A imunização de bovinos com MSP3 nativa purificada propiciou uma demora no pico de riquetsemia sem que houvesse, no entanto diferença estatística no pico de riquetsemia ou severidade da doença quando comparados ao grupo controle (PALMER; McELWAIN, 1995). Elevados títulos de anticorpos para essa proteína foram detectados em animais com infecção aguda ou crônica (PALMER et al., 1986). Também foram detectados elevados títulos de anticorpos (10^3 a 10^6) no soro de bovinos portadores crônicos por até cinco anos (McGUIRE et al., 1991).

MSP4

Trata-se de uma proteína de 31 kDa, conservada geneticamente e estruturalmente em diferentes isolados e, também em *A. centrale*, mas que não foi detectada em *A. ovis* (OBERLE et al., 1993) além dos isolados brasileiros- Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Pernambuco (KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). A identidade entre *A. marginale* e *A. centrale* é de 83% na seqüência de nucleotídeos e 91,7% na seqüência de aminoácidos (MOLAD et al., 2004). MSP4 está presente na riquetsemia no estágio eritrocítico, nas glândulas salivares do vetor e em cultivo de células de carrapato (BARBET et al., 1999). É codificada por um gene de cópia única (OBERLE et al., 1993), localizado entre dois pseudogenes *msp3* e um gene *recA*. Tal organização contribui para tornar essa região do genoma instável e difícil de ser clonada em vetores procarióticos (BRAYTON et al., 2005).

Oberle et al. (1993) relataram que soros de bovinos imunizados com frações de membrana externa de *A. marginale* ligaram-se fortemente à MSP4 nativa e recombinante. De modo contrário, soros de bovinos imunizados com frações de membrana interna, não reconheceram MSP4 (OBERLE et al., 1993). Além disso, soro obtido após a infecção apresentou variação na detecção de MSP4 nativa ou recombinante no teste ELISA. Apenas 20, dentre 26 amostras de soros testados apresentaram títulos de anticorpos detectáveis e muitas amostras reconheceram MSP4 apenas em títulos muito baixos (OBERLE et al., 1993). Variação na detecção de MSP4 também foi relatada por Lopez et al. (2005). Por meio de técnicas de genômica e proteômica os autores identificaram MSP4, que surpreendentemente não reagiu com soro imune; provavelmente, porque MSP4 talvez não seja muito antigênica no gado imunizado com *A. marginale* (BARIGYE et al., 2004 *apud* LOPEZ et al., 2005), sendo essa, uma provável explicação para as variações na detecção dessa proteína. Tanto a MSP4 nativa quanto a recombinante induziram proteção no gado contra desafio homólogo (PALMER; McELWAIN, 1995).

Outros membros da superfamília *msp2*

No genoma de *A. marginale* foram identificados genes com seqüência de identidade para os membros da superfamília *msp2*, que correspondem à família pfam01617, nomeados como *omp1-14* (BRAYTON et al., 2005). Tanto *omp1* quanto *omp14* estão presentes nos cromossomos como genes de cópias únicas; os demais estão organizados em três grupos, em locus distintos: *omp2-5* estão posicionados próximo ao operon *msp2* com *omp4* e *omp5* e *omp2* e *omp3* dispostos em seqüência, com o último par em margem oposta ao operon *msp2*; *omp6-10* também estão arrumados em seqüência, com uma estrutura condizente com a de um operon com cinco genes; e *omp11-13* organizados de maneira similar, em um operon com três genes (BRAYTON et al., 2005; NOH et al., 2006). Os genes *omp1*, *omp4*, *omp7-9* e *omp11* são transcritos e expressos como proteínas em eritrócitos bovinos, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção (NOH et al., 2006). Nas células dos carrapatos infectados, entretanto, a expressão das OMPs 1, 4, 7-9, é consideravelmente menor, chegando a ausência, no caso de OMP11 (NOH et al., 2006).

OMP4, OMP7, OMP10 e OMP14 foram identificadas como alvos de anticorpos por terem sido reconhecidas por IgG2 de bovino, indicando uma resposta estimulada por linfócitos T auxiliares (LOPEZ et al., 2005); todavia, a função dessas proteínas, ainda não foi determinada.

A identidade de aminoácidos entre as proteínas OMP1-14 no isolado Saint Maries e no isolado Florida é alta e está entre 85,3 e 100%. A maior taxa de variação ocorre entre OMP7 (85,3%), devido a substituições de nucleotídeos na metade do gene que mantém a fase de leitura, mas introduz variação no aminoácido (NOH et al., 2006). Os genes que codificam as OMPs 7-9 apresentam grandes trechos de identidade de seqüências nas extremidades 5' e 3' que poderiam mediar eventos de recombinação, como ocorre entre os sítios de expressão de *msp2/msp3* e seus respectivos pseudogenes. As seqüências N e C terminais são relativamente conservadas entre as OMP7-9 (83% de identidade nos aminoácidos 1-150 e 76% de identidade nos aminoácidos 275-403); já a região central, apresenta 18% de identidade nos aminoácidos 151-274. Apesar da recombinação entre os três genes, potencialmente poder gerar variação, parece que esse evento não ocorre ou talvez seja incomum (NOH et al., 2006).

MSP5

É uma das proteínas presentes na membrana externa de *A. marginale*, capaz de induzir imunidade protetora, caracterizada por elevados títulos de anticorpos e proteção contra anemia, no gado inoculado com frações de membrana externa (TEBELE et al., 1991). MSP5 foi detectada nos isolados brasileiros, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Pernambuco de *A. marginale* (KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). Apresenta massa molecular de 19 kDa, é codificada por um gene de cópia única e conservada em *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, sendo, provavelmente, importante para o ciclo de vida da riquetsia (VISSER et al., 1992); também foi detectada em glândulas salivares de carrapatos *Dermacentor andersoni* infectados com a riquetsia (KNOWLES et al., 1996).

A identidade entre a seqüência de nucleotídeos de *msp5* de *A. centrale* e *A. marginale* é de 86,8%; na seqüência predita de aminoácidos da proteína MSP5 a identidade de 92,8% sugere a ocorrência de forte seleção para conservação (MOLAD et al., 2004).

Por ser conservada entre as diferentes espécies de *Anaplasma* e por possuir um epitopo imunodominante e também conservado, reconhecido pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 (VISSER et al., 1992), MSP5 tem sido utilizada, principalmente, como antígeno para a elaboração de testes diagnósticos (VISSER et al., 1992; NDUNG'U et al., 1995). A adaptação

do teste ELISA desenvolvido por Visser et al. (1992) permitiu a identificação de anticorpos contra MSP5 de *A. ovis* em cabras com baixas riquetsemias durante infecções persistentes (NDUNG'U et al., 1995). Anticorpos anti-MSP5 foram detectados no gado infectado com *A. marginale* tanto na fase de infecção aguda e por até 72 meses por meio de ELISA competitivo com MSP5 recombinante (KNOWLES et al., 1996). Reyna-Bello et al. (1998) desenvolveram um ELISA indireto para diagnóstico da anaplasmoze bovina com proteína MSP5 recombinante. Usando esse teste, foram detectados anticorpos contra MSP5 no gado experimentalmente infectado com *A. marginale*, aos 21 dias pós-infecção constatando-se, também, que o título máximo de anticorpos foi alcançado aos 28 dias pós-infecção. Também foram testados 137 soros bovinos de diferentes regiões, dos quais, 64 foram positivos no ELISA com MSP5 recombinante. Dentre esses soros, 57 reagiram positivamente com MSP5 no imunoblotting confirmando a importância de MSP5 como antígeno diagnóstico da anaplasmoze bovina.

Barros et al. (2005) compararam o desempenho de um ELISA indireto com MSP5 recombinante e com antígenos brutos, em estudo epidemiológico na região semi-árida do estado da Bahia. Apesar do fato do ELISA com MSP5 recombinante ter detectado menor número de animais positivos, os dois testes apresentaram desempenho semelhante uma vez que as diferenças observadas foram consideradas insignificantes e atribuídas à maior poli-antigenicidade do antígeno bruto. Silva et al. (2006) também observaram desempenho semelhante entre o ELISA indireto com MSP5 recombinante e o ELISA com corpúsculos iniciais *A. marginale*, além da facilidade na produção e padronização do ELISA com MSP5 recombinante.

São poucos os estudos referentes especificamente à capacidade protetora induzida por MSP5 (PALMER et al., 1994b). Bovinos imunizados com membrana externa de isolado Virginia de *A. marginale* desenvolveram elevados títulos de anticorpos contra MSP5, no desafio com isolado heterólogo Zimbábue. Os animais imunizados apresentaram riquetsemias inferiores aos do grupo controle, mas ainda assim, desenvolveram anemia e, por essa razão, foram considerados parcialmente protegidos. Palmer; McElwain. (1995) também relataram a ausência de proteção contra a anaplasmoze em bovinos imunizados com MSP5 nativa ou recombinante.

Outras proteínas de membrana

Mediante a separação eletroforética bidimensional da membrana da riquetsia e análise por espectrometria de massa daquelas que reagiram com soros (IgG e IgG2) de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*, foi possível detectar novas proteínas de membrana, inicialmente, não detectadas pela anotação genômica. Dentre elas estão AM097 - *conjugal transfer protein*, AM956 - *PepA* citosol amino peptidase, AM254 - fator de alongação Tu e quatro proteínas de função desconhecida: AM197, AM854, AM127, AM387 (LOPEZ et al., 2005).

No genoma de *A. marginale*, isolado Saint Maries, foi identificado um sistema de secreção tipo IV, cuja organização é semelhante a que foi descrita para *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* (OHASHI et al., 2002), e *E. ruminantium* (COLLINS et al., 2005), com um operon contendo *sodB*, *virB3*, *virB4*, e *virB6* e outro, mais distante, com *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* e *virD4*. O gene *virB6* é seguido por três parálogos, e há uma cópia adicional de *virB8* e *virB4* que ocorre afastada e não estão relacionadas a outros genes do sistema de secreção tipo IV (BRAYTON et al., 2005).

Dessas proteínas, VirB9, e VirB10 também reagiram com soros (IgG e IgG2) de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale* (LOPEZ et al., 2005).

As proteínas que são reconhecidas por IgG2 constituem potenciais imunógenos, pois

essa subclasse de imunoglobulina está associada com a resposta imune protetora contra *A. marginale* (BROWN et al., 1998a, b).

A função potencial de cada proteína foi determinada por comparação com proteínas conhecidas em outras bactérias (LOPEZ et al., 2005). VirB9, VirB10 e *conjugal transfer protein* são consideradas parte de um sistema de secreção tipo IV, que está envolvido com a secreção ou a transferência entre células de macromoléculas, proteínas ou complexos proteína-DNA em bactérias Gram negativas tais como, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii*, *Ehrlichia chaffeensis* e *A. phagocytophilum* (CHRISTIE et al., 2000; BARON et al., 2002; OHASHI et al., 2002). A função do sistema de secreção tipo IV ainda não foi definida em *A. marginale*, mas sabe-se que em *Brucella suis* o operon *virB* é necessário para a sobrevivência intracelular e para multiplicação (O'CALLAGHAN et al., 1999). O mecanismo pelo qual esse objetivo é alcançado ainda não foi estabelecido, mas há duas prováveis explicações: uma, é que o sistema VirB de *Brucella* seja usado para transportar um imunomodulador que ajuda a bactéria a evadir as defesas do hospedeiro e estabelecer uma infecção crônica. A outra, é que o complexo VirB transporte algum tipo de mediador que perturbe a via endossomal das células infectadas e permite ao microrganismo estabelecer o compartimento intracelular em que se multiplica (O'CALLAGHAN et al., 1999). Então, da mesma forma como ocorre em *Brucella*, o operon *virB* também pode ser fundamental para a sobrevivência de *Anaplasma* no eritrócito (LOPEZ et al., 2005). É provável que tenha essa mesma função em *Ehrlichia canis*, agente etiológico da Erlichiose canina incluído na mesma ordem de *Anaplasma*. O gene *virB9* de *E. canis* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* alcançando massa molecular de 33 kDa (FELEK et al., 2003). Em *Helicobacter pylori*, o sistema tipo IV contribui para a evasão do sistema imune do hospedeiro (RAMARAO et al., 2000). Essa bactéria apresenta atividade antifagocítica relacionada com a síntese de novo de proteínas e um tipo de sistema de secreção tipo IV. O fenótipo antifagocítico depende de diferentes genes *vir* de virulência que codificam componentes de um sistema de secreção tipo IV. A capacidade de evadir o engolfamento por parte dos fagócitos, possivelmente coopera com a habilidade do patógeno estabelecer uma infecção crônica (RAMARAO et al., 2000).

O fator de alongamento (EF-Tu), que corresponde à função de AM254 (LOPEZ et al., 2005) pode desempenhar duas funções, dependendo de sua localização citoplasmática ou na superfície celular (GRANATO et al., 2004). No citoplasma bacteriano, exerce um papel central na síntese protéica, mas em outros microrganismos pode permanecer na superfície funcionando como um fixador do patógeno às células do hospedeiro (LOPEZ et al., 2005).

Em *Escherichia coli* e *Lactobacillus johnsonii* o EF-Tu tem sido descrito como associado à superfície celular (JACOBSON; ROSENBUSCH, 1976 *apud* GRANATO et al., 2004). Em *L. johnsonii*, o EF-Tu é descrito como uma proteína de superfície com características de fator de adesão capaz de mediar a fixação da bactéria às células intestinais de humanos (GRANATO et al., 2004). Em *Mycobacterium leprae* e *Mycoplasma pneumoniae* EF-Tu foi identificado como uma proteína associada à parede celular (MARQUES et al., 1998; DALLO et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da área de Sanidade Animal do Centro Nacional e Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Embrapa, no município de Campo Grande-MS.

3.2 Extração de DNA genômico de *A. marginale*

O DNA genômico de *A. marginale* foi obtido a partir de amostras de 350 µL de sangue total de bezerros Aberdeen-Angus, infectados experimentalmente com isolado Rio Grande do Norte da riquetsia, e mantido em área de isolamento da Embrapa Gado de Corte.

O DNA foi purificado utilizando-se o *kit Easy DNA* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, para extração de amostras de sangue.

A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliados por espectrofotometria, em aparelho GeneQuant Pro (Pharmacia); uma alíquota do DNA também adicionada ao tampão da amostra 6x para análise em gel de agarose a 1% com Tampão Tris-acetato-EDTA (TAE 1x) pH 8,0. A massa molecular dos produtos foi estimada por comparação com o marcador 1KB plus de 100 a 12.000pb (INVITROGEN®). O gel foi submetido a eletroforese a 80V, sendo, posteriormente, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), visualizado em transiluminador ultra-violeta (T26m- Bioagency), fotografado em câmera digital Kodak (modelo BC290) e analisado pelo programa Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec).

3.3 Amplificação dos genes *virB9*, *virB10* e *am254* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *virB9*, *virB10* e *am254* foram baseados nas seqüências do genoma do isolado Saint Maries, disponíveis no Genbank (número de acesso: NC_004842), usando-se o programa OligoPerfect Designer (Invitrogen).

Os oligonucleotídeos desenhados foram:

- *AM254-F* (5' ATGACAGAAGGGAGAAAGCC 3')
- *AM254-R* (5' CTACTCCAAAATCTCAGTTATGATACC 3')
- *Virb9-F* (5' ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGC 3')
- *Virb9-R* (5' TCAAAGCACCGTATTCACTACTTC 3')
- *Virb10-F* (5' TTGAGTTTAGGGATGTCAGACG 3')
- *Virb10-R* (5' CTACCTACGCACCGCCTC 3')

A amplificação dos genes foi realizada por meio de PCR, em reações preparadas para um volume final de 50 µL, contendo 5,0 µL de tampão 10x (10 mM de Tris-HCl pH 8,3; 50 mM de KCl); 1,5 µL MgCl₂ (50 mM); 1,0 µL de uma mistura de dNTPs (10,0 mM de cada), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (100 ng/µL); 2,0 µL de DNA (100 ng/µL); 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL CenBiot®).

As amplificações foram realizadas em termociclador PCR Express (Hybaid), programado da seguinte forma: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto, e extensão a 72°C por um minuto e 40 segundos. Adicionalmente, foi realizada extensão final a 72°C por sete minutos e resfriamento a 4°C para cessar a amplificação.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados conforme descrição no item 3.2, utilizando-se, entretanto, gel de agarose a 0,8%.

3.4 Clonagem de genes a partir dos produtos de PCR

Os produtos das reações de amplificação dos genes de *A. marginale* foram utilizados para ligação ao plasmídeo linearizado pGEMT[®]-Easy (Promega), em ligação tipo T/A. Esse tipo de ligação torna-se possível, pois a enzima Taq DNA polimerase utilizada na PCR, possui atividade transferase terminal capaz de acrescentar uma desoxi-adenosina (A) à extremidade 3' dos fragmentos amplificados e o plasmídeo possui um único resíduo desoxi-timina (T) livre em cada extremidade 3'. As ligações foram realizadas com 5 µL do tampão de ligação 2x (60mM Tris-HCl, pH 7,8; 20 mM MgCl₂), 1 µL de vetor pGEM-T Easy (50 ng), 3 µL de produto de PCR, 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL) e incubadas a 4°C por uma noite.

O produto de cada ligação foi utilizado para transformação de células *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa- Gado de corte. Esses produtos foram transferidos para tubos contendo 100 µL das células a serem transformadas, previamente descongeladas em gelo, sendo posteriormente, mantidas em gelo por 30 minutos. Após esse período os tubos foram colocados em banho-maria a 42°C por 30 segundos e imediatamente transferidos para o gelo por dois minutos. Em câmara de fluxo laminar, adicionou-se 250 µL de meio SOC em cada tubo; após vedação os tubos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação (TE 421- Tecnal) a 200 rpm e 37°C por 30 minutos para em seguida retornarem à câmara de fluxo laminar. Todo o conteúdo de cada tubo foi semeado em ágar Luria-Bertani (LB) com 100 µg/mL de ampicilina (LB-amp), 0,5 mM de isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Invitrogen) e 80 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosídeo (X-Gal), e incubados por 16-18 horas a 37°C.

Para identificar os clones bacterianos que possuíam os insertos de interesse, foi realizada a PCR de colônia. As reações de PCR foram preparadas conforme descrito anteriormente com os oligonucleotídeos iniciadores de cada gene. Para cada gene, cinco a 10 colônias foram suspensas individualmente na reação de PCR, incubadas em banho-maria a 94°C por 10 minutos para lise das células e inativação das nucleases. Os demais tempos e temperaturas foram os mesmos do item 3.2.

3.5 Purificação de genes recombinantes

Os clones selecionados pela técnica de PCR de colônia foram cultivados em 10 mL de caldo CircleGrow (BIO101, Inc. Ref 3006-142) com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma) (CG-amp) a 37°C, por 14 horas, sob agitação (250 rpm). Em seguida, realizou-se a extração de DNA plasmidial utilizando-se o o *kit Wizard Plus SV* (Promega[®]) conforme a orientação do fabricante, e eletroforese em gel de agarose 0,8% e visualização, conforme descrito no item 3.2.

3.6 Subclonagem dos genes em plasmídeo de expressão pET-47b(+)

Uma alíquota de 5 µL de cada extração plasmidial (cerca de 1 µg de DNA) foi submetida à digestão com 2 µL da enzima *EcoRI* (Invitrogen) (10 U/µL), 2 µL de tampão 10 x da enzima (React 3) e 11 µL de água ultra-pura, totalizando 20 µL de reação. Como o vetor pGEM-T- Easy possui dois sítios para *EcoRI* adjacentes ao sítio de clonagem, a digestão com essa enzima visou a liberação dos genes clonados. Foram realizadas três reações de digestão a 37°C por duas horas para cada extração plasmidial. O volume total de cada digestão foi

submetido à eletroforese em gel fino de agarose a 0,8%, posteriormente corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador UV. As bandas correspondentes aos insertos de cada gene foram rapidamente cortadas do gel com auxílio de lâminas de bisturi e extraídas do gel com *kit* de purificação S.N.A.P Gel Purification (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. Uma alíquota de cada gene purificado foi analisada em gel de agarose 0,8% para verificar a qualidade da purificação.

Os insertos liberados pela digestão com *EcoRI* foram ligados ao plasmídeo de expressão pET-47b(+) (Novagen) (**Figura 1**), previamente digerido com essa enzima e defosforilado com Alkaline phosphatase, calf intestinal (CIAP- Promega). Todo o produto de cada ligação foi usado para transformar células *E. coli* DH5α (100 µL), por choque térmico, as quais foram semeadas em placas com meio LB-ágar com canamicina (30µg/mL) e incubadas a 37°C por 18 horas.

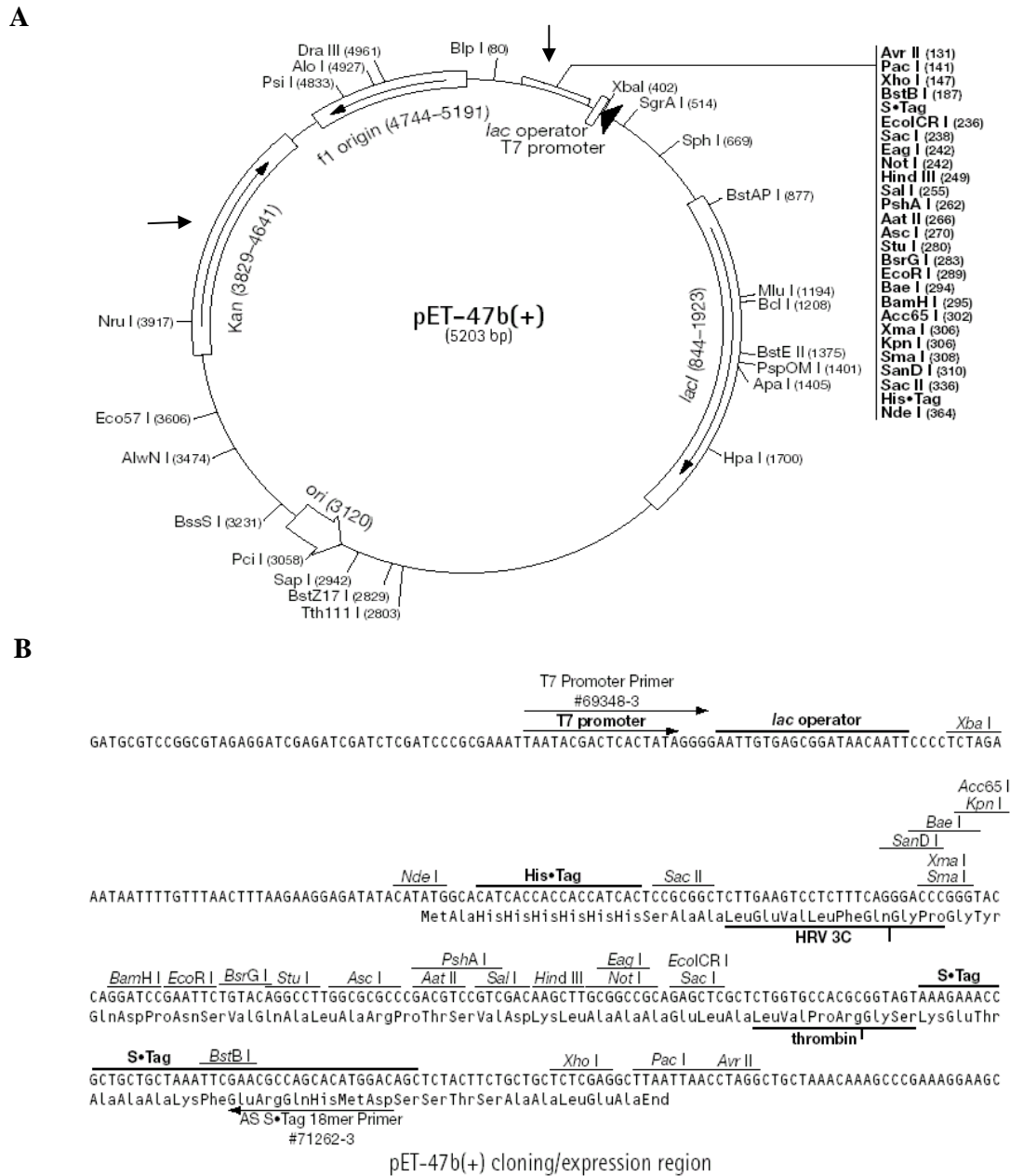


Figura 1. Mapa físico do plasmídeo de expressão pET-47b(+). Em **A**: plasmídeo fechado; (↓) indica os sítios de clonagem para diversas enzimas de restrição, incluindo *EcoRI* e seis extremidades de ligação à histidina (His•tag). (→) indica o sítio de resistência à canamicina. Em **B**: plasmídeo aberto.

Fonte: www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB415.pdf

As certificações de ligação inserto-vetor e de orientação dos insertos foram feitas por PCR de colônia, com o oligonucleotídeo iniciador a montante T7 (vetor) e a jusante de cada gene. As reações de PCR foram preparadas conforme descrito anteriormente. Cinco a 10 colônias de cada gene foram suspensas individualmente na reação de PCR e aquecidas a 94°C por 10 minutos para lise das células e inativação das nucleases. Em seguida, as reações foram submetidas à amplificação utilizando-se as mesmas temperaturas e tempos de desnaturação, anelamento e extensão descritos anteriormente. Após amplificação, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e seguindo-se os procedimentos encontrados no item 3.2.

Os clones selecionados foram cultivados em 10 mL de caldo Circlegrow com canamicina (30 µg/mL) (CG-can), a 37°C, por 12 horas, sob agitação (250 rpm). Em seguida, foi realizada extração de DNA plasmidial, com o *kit Wizard Plus SV* (Promega), segundo instruções do fabricante.

Os plasmídeos purificados foram usados para transformação de células de *E. coli* Rosetta (Novagen) quimicamente competentes. O protocolo de transformação foi o mesmo utilizado anteriormente, entretanto para o cultivo das células Rosetta utilizou-se meio Circlegrow com canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). As placas com as células transformadas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

3.7 Avaliação da indução dos genes *virB9*, *virB10* e *am254*.

Um clone de cada gene foi selecionado e cultivado em 5mL de caldo Circlegrow com canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), a 37°C, por 12 horas, sob agitação (250 rpm). Em seguida, os pré-inóculos foram cultivados em 200mL do mesmo caldo, até que as suspensões bacterianas atingissem uma densidade óptica de 0,6 com filtro de 600nm. Aliquotas de 2 mL das culturas bacterianas foram retiradas antes da indução da expressão, centrifugadas a 18.000 x g por um minuto, e os sedimentos mantidos a -20°C. Adicionou-se IPTG às culturas bacterianas e os tubos agitados a 250 rpm por seis horas, a 37°C. Decorridas seis horas de indução, as culturas foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 10.000 x g, a 4°C; o sobrenadante foi descartado e os sedimentos suspensos em 10mL de tampão fosfato 50mM. As suspensões foram sonicadas (*output* 40) (Branson Sonifier 250) seis vezes, por 20 segundos, em gelo. Amostras de 2 mL dos sedimentos lisados foram centrifugadas a 18.000 x g por 10 minutos, a 4°C, para obtenção das frações solúvel e insolúvel.

3.8 Purificação das proteínas recombinantes

Essa etapa foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em resina de agarose-níquel (*ProBond Purification Kit* - Invitrogen®), conforme as instruções do fabricante. Foram centrifugados 200 mL de cada cultura por cinco minutos a 3200 x g. Os sedimentos foram suspensos em 8 mL tampão de lise com guanidina (6M guanidina-HCL, 20 mM NaPO₄.12 H₂O, pH 7,8 e 500 mM NaCl) para lisar as proteínas a serem purificadas e agitados em vórtex por 10 minutos. Após a homogeneização, cada lisado foi sonificado em gelo com pulsos de 50 segundos, em intervalos de 50 segundos, por três vezes e centrifugado a 3200 x g por 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, cada lisado foi vertido em colunas previamente preparadas para purificação. As colunas para purificação foram preparadas com 5 mL de resina de agarose/níquel Probond (Invitrogen) e 8 mL de tampão de ligação em condições desnaturantes (8 mM de uréia, 20 mM de NaPO₄.12 H₂O, pH 7,8 e 500 mM de NaCl). Após a adição do lisado bacteriano, as colunas foram agitadas suavemente por 30 minutos, para a ligação da resina com proteína recombinante. A resina foi sedimentada e o sobrenadante removido. Após lavagem da coluna com 8 mL de tampão de ligação em

condições desnaturantes sob leve agitação manual por dois minutos, a resina foi sedimentada e o sobrenadante retirado. Essa etapa foi realizada por duas vezes, sendo seguida de nova lavagem com tampão de lavagem em condições desnaturantes (8 mM de uréia, 20 mM de $\text{NaPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, pH 6,0 e 500 mM de NaCl), homogeneizando-se por dois minutos, manualmente, também duas vezes. As colunas foram novamente lavadas por três vezes, com intervalos de dois minutos, sob agitação suave, com tampão de lavagem em condições nativas (50 mM de $\text{NaPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, 0,5 mM de NaCl e 20mM de Imidazole pH 8,0). Sedimentou-se a resina e coletou-se o sobrenadante. As proteínas foram eluídas com 12 mL de tampão de eluição em condições nativas (50 mM de $\text{NaPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, 0,5 M de NaCl e 250 mM de imidazole). O sobrenadante foi coletado e uma alíquota de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS)-poliacrilamida a 12%.

3.9 Análise das proteínas recombinantes por eletroforese

As análises foram realizadas conforme protocolo do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa-Gado de corte. Amostras das culturas induzidas para a produção de proteínas recombinantes e das frações protéicas purificadas, foram suspensas em 200 μL de tampão da amostra 2x, homogeneizadas em vórtex, fervidas por cinco minutos, homogeneizadas em vórtex e, então submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12%, a 100V, com tampão Laemli 1x. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie, sob agitação suave, por uma hora.

3.10 Western blot

Extratos brutos de *Escherichia coli* Rosetta com os genes *am254*, *virB9* e *virB10* com ou sem indução por IPTG e AM254, VirB9 e VirB10 recombinantes purificadas foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12%, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram transferidos para membrana de nitrocelulose. Para realização dessa etapa o gel de poliacrilamida foi colocado sobre cinco folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência; a membrana de nitrocelulose foi colocada em contato como gel e cinco folhas de papel de filtro também embebidas em tampão foram colocadas sobre esse conjunto, que foi fixado entre placas esponjosas, acondicionado em formas específicas e submerso em cuba contendo tampão de transferência. Aplicou-se corrente elétrica de 100V por 90 minutos, em sistema úmido (Biorad). Após a passagem das moléculas protéicas, a membrana foi corada com Ponceau S para visualização das bandas e, em seguida, descorada com água destilada. Foram cortadas tiras longitudinais correspondentes a cada poço da corrida eletroforética e o marcador de massa molecular (Broad Range Protein, Promega- V849A) foi guardado ao abrigo da luz. As faixas cortadas da membrana foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5%, dissolvido em PBST pH 7,2, durante 12 horas. Posteriormente foram submetidas a cinco lavagens, de um minuto cada, com PBST e incubadas com anticorpo monoclonal anti 6x-histidina (Amersham) diluído a 1:3000, por 30 minutos. Realizou-se nova lavagem como as anteriores e adicionou-se o conjugado anti-IgG total de camundongo (Sigma- A9044) ligado à peroxidase, diluído a 1:3000 em PBST pH 7,2, por uma hora sob agitação. As membranas foram submetidas ao mesmo protocolo de lavagem e foi adicionado ácido diaminobenzidínico (Sigma)/ H_2O_2 para revelação das bandas protéicas. A reação foi interrompida com água destilada.

3.11 Determinação da concentração das proteínas recombinantes

As análises foram realizadas de acordo com protocolo do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa-Gado de corte. As proteínas recombinantes foram dialisadas frente a tampão fosfato 50 mM por 12 horas, a 4°C. Posteriormente, foram concentradas em membrana de diálise coberta por sílica, a 4°C. Para determinação da concentração protéica, amostras de albumina sérica humana, com concentrações definidas, e das proteínas recombinantes, foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12%. Os géis foram corados com azul de Coomassie, fotografados e as imagens digitalizadas. As concentrações das proteínas recombinantes foram determinadas em sistema Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec), por interpolação com os dados obtidos com albumina sérica humana.

3.12 Ensaios de imunoadsorção enzimática com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes

Para padronização dos ELISAs com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes, diluições ótimas das proteínas recombinantes e soros foram determinadas pela avaliação de duas amostras de soros de bovinos negativos e quatro positivas para anticorpos contra *A. marginale*, pela Imunofluorescência indireta (dados não mostrados).

Dentre os protocolos testados, escolheu-se o que apresentou as maiores diferenças nas densidades óticas entre soros positivos e soros negativos.

Microplacas de 96 poços (Costar, 3590) foram adsorvidas respectivamente com 3,25, 10,0 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{poço}$ das proteínas purificadas VirB9, VirB10 e AM254 diluídas, em salina fosfatada de Dulbecco (DPBS), pH 7,2, por uma noite, a 4°C. As placas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado dissolvido em PBST (100 $\mu\text{L}/\text{poço}$), por 60 minutos, a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, adicionou-se 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ dos soros diluídos em PBST a 1:400, incubando-se por 60 minutos a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas conforme descrito anteriormente. Adicionou-se às placas 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ do conjugado anti-IgG de bovino ligado a peroxidase (Sigma, ref. A-7414), diluído em PBST a 1:10.000. As placas foram incubadas mais uma vez a 37°C por um período de 30 minutos e submetidas a outra etapa de lavagem semelhante às anteriores. Foram adicionados 50 $\mu\text{L}/\text{poço}$ do cromógeno/substrato *o*-fenildiamino (P-1526, Sigma/ H_2O_2) e após dez minutos adicionou-se H_2SO_4 (2,5 N) com o objetivo de parar as reações, as quais foram quantificadas em leitor EL-800 (Bio-Tek) com filtro de 490 nm.

Foram testados 72 soros de bovinos negativos para *A. marginale*, certificado por PCR para *mcp5* e ELISAs para MSP1a (ARAÚJO, 2005) e MSP5. Também se utilizaram 72 soros de bovinos positivos para a riquetsia, infectados experimentalmente com isolado Rio Grande do Norte, nos referidos testes.

Também foram avaliados soros de bovinos infectados com isolados heterólogos (Pernambuco- Zona da Mata e Pernambuco- Agreste), coletados em quatro momentos (pré-infecção, 5°, 15° e 35° dia pós-infecção).

3.13 Análise estatística

As comparações das médias dos soros negativos e positivos nos ELISAs foram feitas com teste T, com nível de significância de 5% com programa InStat. GraphPad InStat-GraphPad Software V2.05a 950422S.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação dos genes, *virB9*, e *virB10 am254* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As ampliações dos genes *virB9*, *virB10* e *am254* por PCR resultaram em fragmentos de 839, 1336 e 1204 pb, respectivamente, e estavam de acordo com o tamanho dos genes no isolado americano Saint Maries (**Figura 2**).

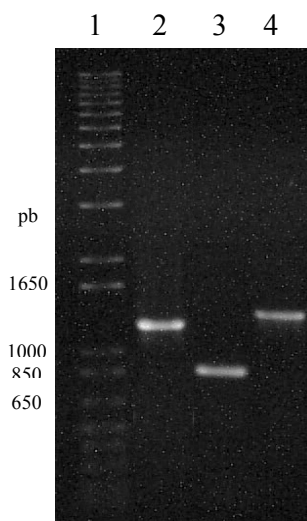


Figura 2. Amplificação dos genes *am 254*, *virB9* e *virB10* por reação em cadeia da polimerase do isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de *Anaplasma marginale*. Linhas-1: marcador de pares de bases 1 kb plus (Invitrogen), 2: *am254*, 3: *virB9*, 4: *virB10*.

4.2 Clonagem de genes a partir dos produtos de PCR

As ligações dos genes *virB9*, *virB10* e *am254* ao vetor pGEM-T puderam ser constatadas pela PCR de colônia resultando em bandas na altura dos pares de bases dos genes pesquisados.

4.3 Subclonagem em pET-47b(+) e expressão dos genes

Os genes *virB9*, *virB10* e *am254*, clonados em pGEM-T Easy e cortados com enzima *EcoRI* puderam ser subclonados na orientação correta no vetor pET-47b(+), como foi possível evidenciar pela PCR de colônia (dados não mostrados).

A indução dos genes *virB9*, *virB10* e *am254* com IPTG resultou em bandas protéicas de aproximadamente 31, 60 e 47 kDa, respectivamente (**Figura 3**), sendo essa massa compatível com a esperada pela modelagem *in silico* dos genes no programa Edit Sequence (DNASTar), associada à cauda de seis histidinas, codificada pelo vetor pET-47b(+), com exceção de VirB10, cuja massa molecular obtida (60 kDa) foi superior ao esperado (47 kDa). Foi alcançada uma boa purificação de VirB9, porém VirB10 e AM254 ainda apresentaram pequena contaminação por proteínas de *Escherichia coli*.

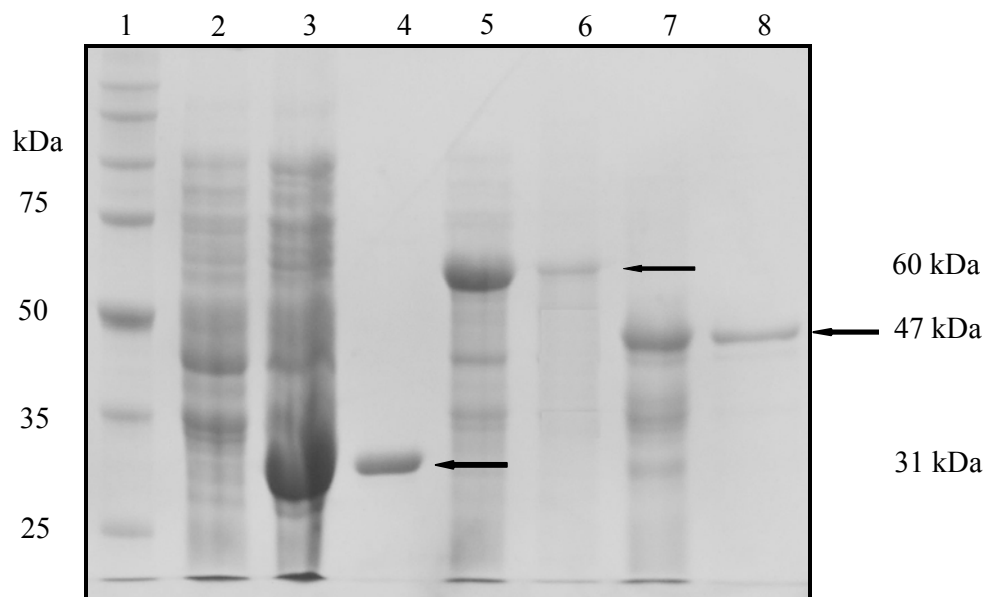


Figura 3. Expressão de genes de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de *Anaplasma marginale* após seis horas de indução com IPTG. Linhas- 1: marcador de massa molecular (Promega); 2: extrato bruto de *Escherichia coli*; 3: indução de *virB9*; 4: purificação de VirB9; 5: indução de *virB10*; 6: purificação de VirB10; 7: indução de *am254*; 8: purificação de AM254.

4 Western blot

O sucesso da produção de proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254 foi determinado por meio de Western blot. As proteínas recombinantes transferidas para membrana de nitrocelulose, foram reconhecidas por anticorpo monoclonal específico anti-histidina. A interação antígeno-anticorpo foi possível, pois as proteínas recombinantes possuem, em sua estrutura, seis caudas de histidinas adicionadas pelo vetor de expressão pET-47b(+) e que reagiram com anticorpo monoclonal anti-histidina (**Figura 4**).

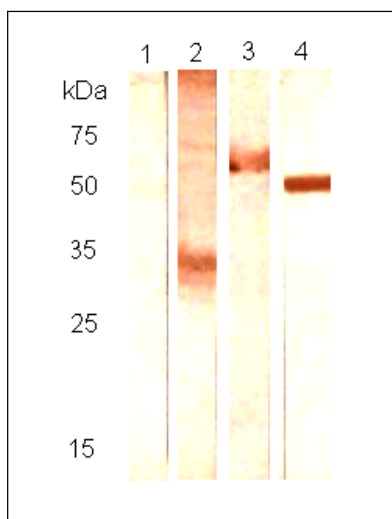


Figura 4. Western blot com proteínas VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de *Anaplasma marginale* com anticorpo monoclonal anti-histidina. Linhas: 1- extrato de *Escherichia coli* – Rosetta, 2- VirB9, 3-VirB10, 4-AM254.

4.5 Ensaios de imunoadsorção enzimática com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes

As proteínas recombinantes purificadas foram testadas em relação à capacidade de reconhecimento de anticorpos contra *A. marginale*. Para tal, um teste ELISA foi padronizado utilizando-se várias diluições de soros, proteínas e conjugado, sendo selecionado para cada proteína, o protocolo que apresentou como resultado as maiores razões entre soros positivos e negativos, testados previamente pela IFI (dados não mostrados). Assim, foram selecionados os procedimentos correspondentes aos valores de 3,013; 3,236 e 3,470 para VirB9r, VirB10r e AM254, respectivamente. Então, para a sensibilização das placas, foram utilizadas 3,25; 10,0 e 2,5 ng/poço de VirB9r, VirB10r e AM254r, respectivamente.

Nas **Figuras 5, 6 e 7**, pode-se observar a distribuição das densidades ópticas no ELISA de 72 soros de bovinos negativos para *A. marginale*, e 72 soros homólogos de bovinos positivos para a riquetsia. Previamente, o sangue dos animais foi testado pela PCR para o gene *msp5* de *A. marginale* e os soros foram submetidos ao teste ELISAs com MSP1a (ARAÚJO et al., 2005) e MSP5 estabelecendo-se o diagnóstico de positivos ou negativos.

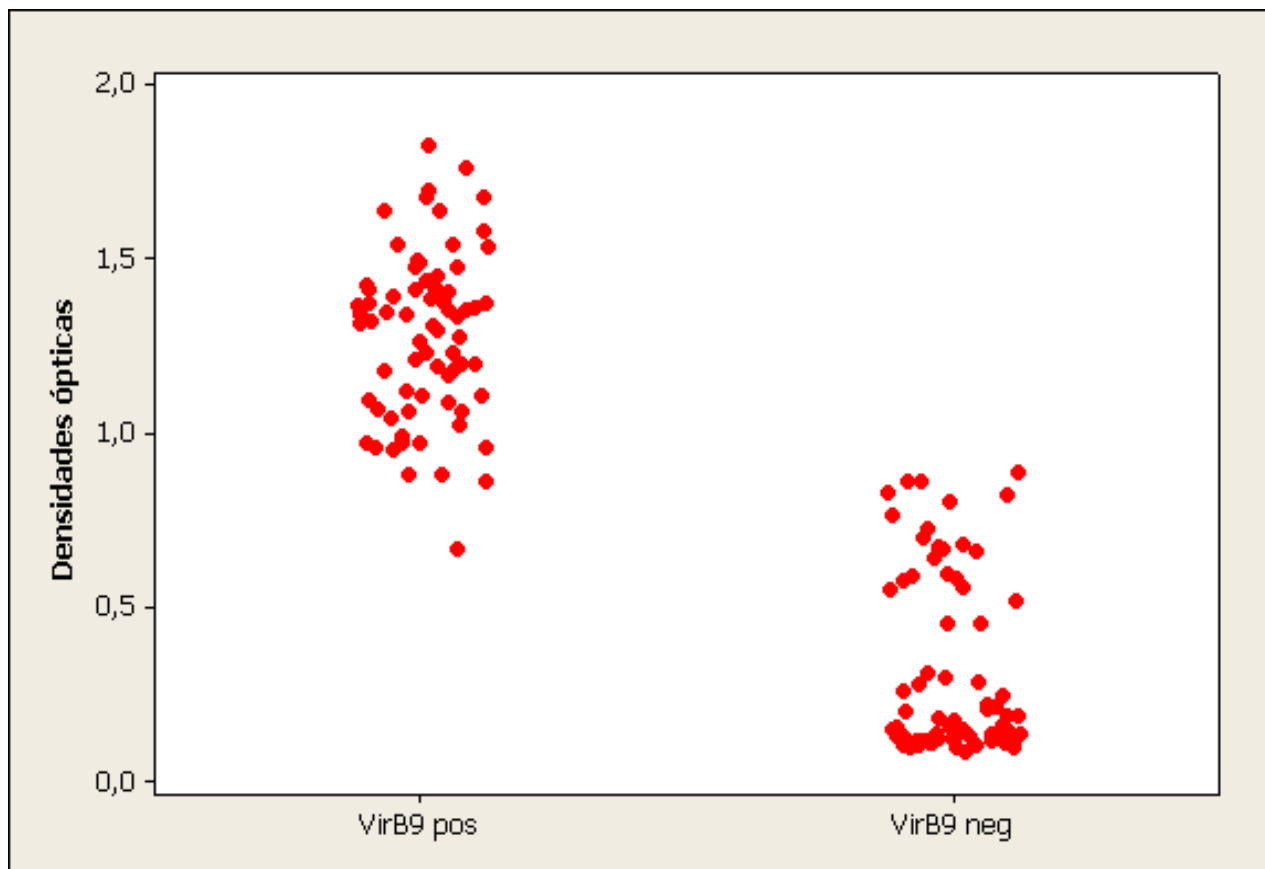


Figura 5 . Distribuição das densidades ópticas de 72 soros de bovinos positivos para *Anaplasma marginale*, e 72 soros de bovinos negativos para a riquetsia, analisados no ELISA com VirB9 recombinante de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de *A. marginale*.

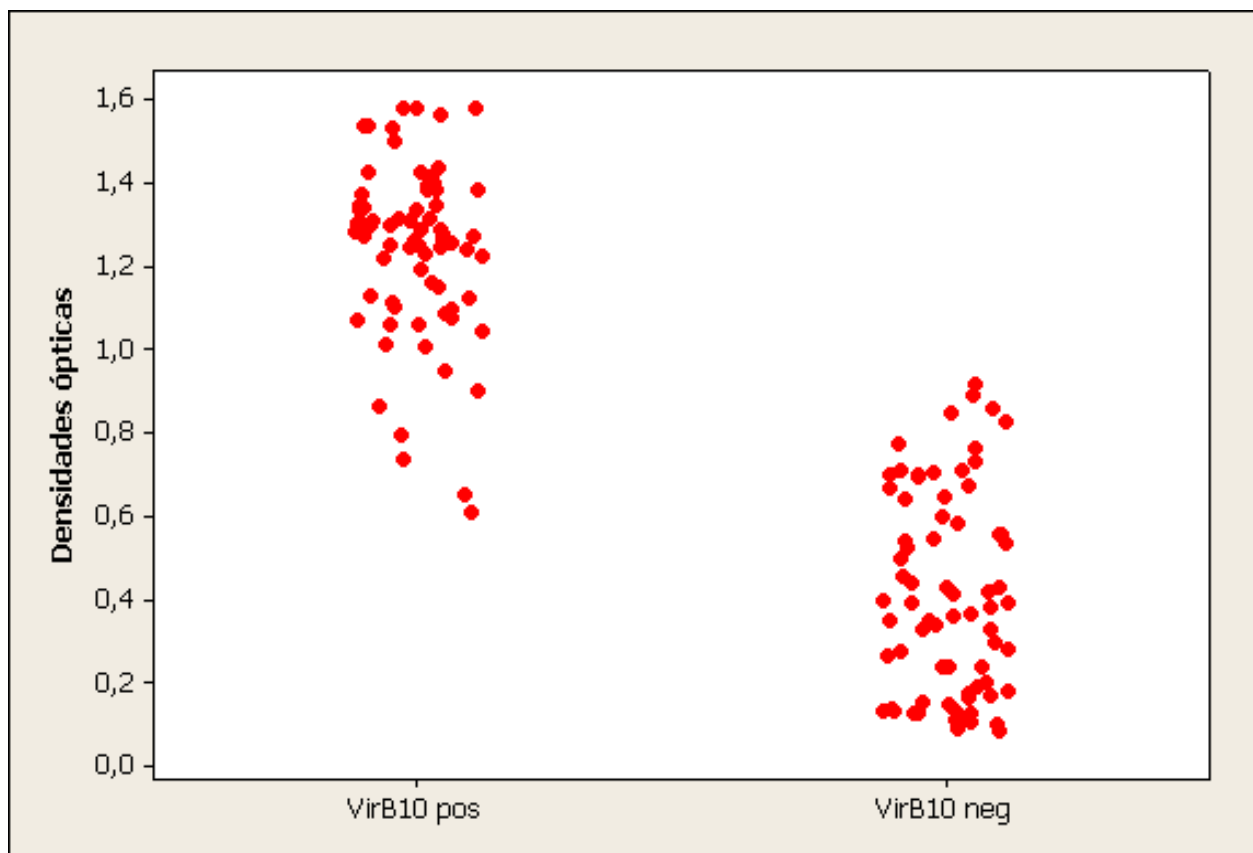


Figura 6. Distribuição das densidades ópticas de 72 soros de bovinos positivos para *Anaplasma marginale* e 72 soros de bovinos negativos para a riquêtsia, analisados no ELISA com VirB10 recombinantes de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de *A. marginale*.

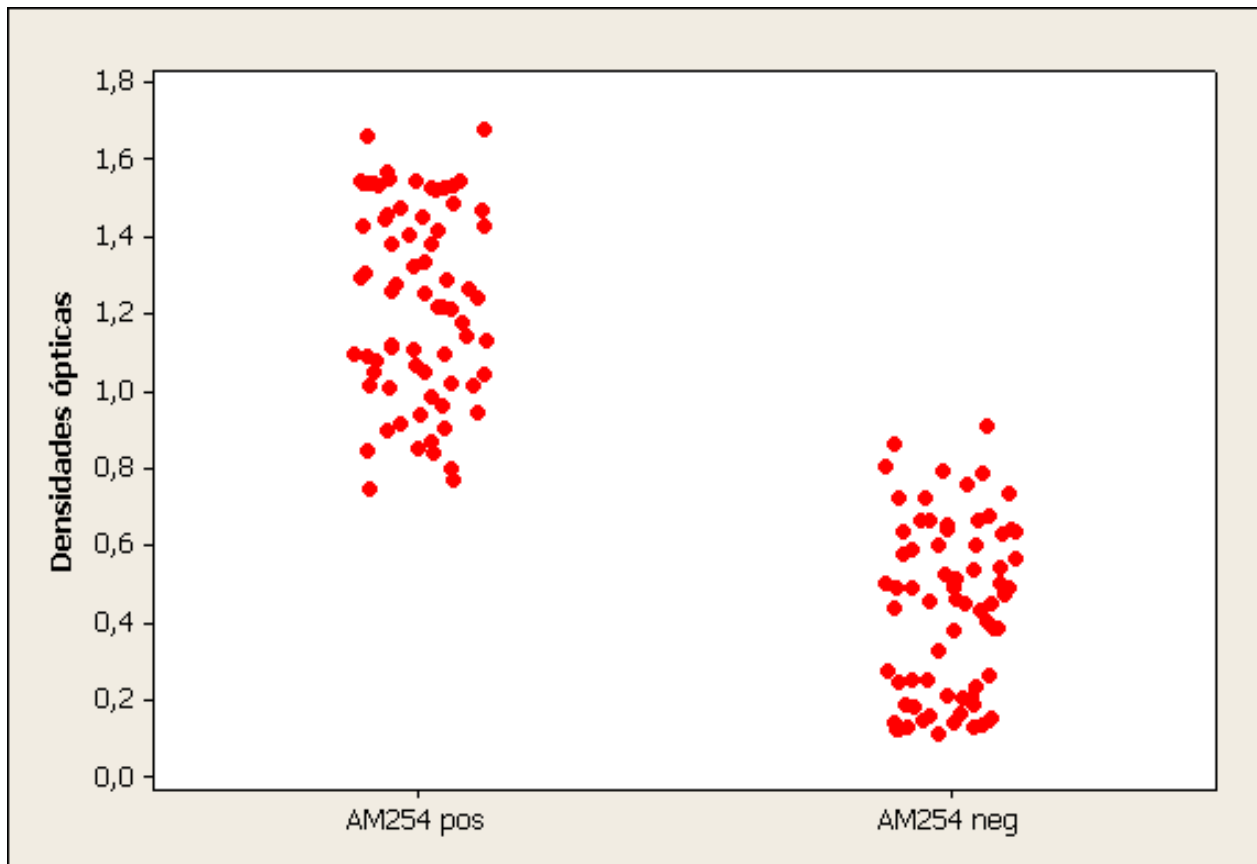


Figura 7. Distribuição das densidades ópticas de 72 soros de bovinos positivos para *Anaplasma marginale*, e 72 soros de bovinos negativos para a riquetsia, analisados no ELISA com AM254 recombinante de isolado brasileiro (Rio Grande do Norte) de *A. marginale*.

Na **Tabela 1**, pode-se verificar a média das densidades ópticas de 72 soros de bovinos negativos para *A. marginale*, e 72 soros de bovinos positivos para a riquetsia, analisados nos ELISAs com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes.

Pelo teste T, nos três ensaios, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os soros positivos e negativos, demonstrando que os ensaios discriminaram soros positivos dos negativos, indicando que os epítomos imunogênicos das proteínas recombinantes presentes foram reativos e, provavelmente, essas proteínas não sofreram alterações estruturais significantes nestas regiões. Com esses resultados, pôde-se concluir que as proteínas VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes possuem epítomos que reconhecem anticorpos presentes no soro de bovinos infectados com isolado homólogo.

Tabela 1. Média das densidades ópticas de 72 soros de bovinos negativos para *Anaplasma marginale* e 72 soros homólogos de bovinos positivos para a riquetsia, analisados nos ELISAs com VirB9, VirB10 e AM254 recombinantes.

Proteína	Média das densidades ópticas (dp)		Valor de p
	Soros positivos	Soros negativos	
VirB9	1,288 (0,2375)	0,324 (0,2565)	< 0,0001
VirB10	1,240 (0,2076)	0,414 (0,2442)	< 0,0001
AM254	1,235 (0,2507)	0,442 (0,2225)	< 0,0001

Em relação à distribuição das densidades ópticas, é possível notar (**figuras 5, 6 e 7**), nos três ensaios realizados, a existência de sobreposição de resultados positivos e negativos. A investigação mais profunda desses resultados permitiu determinar as densidades ópticas em que ocorreram as sobreposições e estão apresentadas na **Tabela 2**. A riquetsemia dos animais em que os soros positivos apresentaram as mesmas densidades ópticas dos soros negativos foi analisada. Em VirB9 a riquetsemia foi de 0,01 a 0,5 (%), em VirB10, de 0,01 a 1,50 (%) e em AM254, de 0,00 a 7,00 (%) (os dados de riquetsemia foram obtidos em Araújo, 2005).

Tabela 2. Densidades ópticas máximas e mínimas de soros homólogos no teste ELISA com proteínas recombinantes e valores de densidades ópticas (n=144) correspondentes a sobreposição de resultados.

Proteína	Densidades ópticas				Limites de sobreposição de densidades ópticas de positivos e negativos (n. soros)
	Soros positivos		Soros negativos		
	máxima	mínima	máxima	mínima	
VirB9	1,83	0,67	0,89	0,09	0,67-0,89 (16)
VirB10	1,58	0,61	0,92	0,09	0,61-0,92 (24)
AM254	1,68	0,75	0,91	0,11	0,75-0,91 (15)

Na **Tabela 3** estão apresentados os valores em percentuais e o número de soros que apresentaram densidades ópticas iguais entre positivos e negativos no teste ELISA para cada proteína recombinante. A verificação dos soros que apresentaram esse comportamento, permite afirmar que não houve um padrão de reação, ou seja, os soros com densidades ópticas coincidentes entre positivos e negativos não foram os mesmos em todos os ensaios.

Tabela 3. Soros homólogos positivos (72) e negativos (72) testados por PCR para *msp5* (sangue) e por ELISA indireto com as proteínas recombinantes MSP1a e MSP5 que apresentaram valores de densidades ópticas iguais entre positivos e negativos no ELISA com as proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254.

Soros que apresentaram sobreposição de densidades ópticas no ELISA com proteínas recombinantes		
Proteína	% Soros positivos (n. de soros)	% Soros negativos (n. de soros)
VirB9	5,55 (4)	16,67 (12)
VirB10	8,33 (6)	25,00 (18)
AM254	12,5 (9)	8,33 (6)

Os soros de bovinos infectados com isolados heterólogos (Pernambuco Zona da Mata e Pernambuco Agreste) reconheceram todas as proteínas recombinantes, mostrando que as mesmas possuem epítomos conservados (**Figura 8**). Essa é uma característica essencial para proteínas candidatas a imunógenos, especialmente para enfermidades como a anaplasmose, que possui ampla distribuição. As diferenças entre as densidades ópticas observadas nos diferentes momentos pós-infecção, podem ser explicadas pelas riquetsemias alcançadas em cada animal.

O bovino infectado com isolado Pernambuco-Zona da Mata de *A. marginale* apresentou riquetsemia inferior à do bovino infectado com isolado Pernambuco- Agreste (**Tabela 4**). Os valores de densidades ópticas menos elevados detectados no soro do bovino infectado com isolado Zona da Mata são coerentes com a riquetsemia consideravelmente mais baixa e com pouca variação nos diferentes momentos de coleta pós-infecção. Com base na análise do gráfico (**Figura 9**) e considerando o teste aplicado, é possível afirmar que nesse bovino houve uma resposta inicial, com a produção de IgG, seguida de declínio e posterior aumento de anticorpos. Apesar das densidades ópticas não serem as mesmas, esse padrão de resposta imunológica foi detectado no ELISA com as três proteínas utilizadas para a realização do teste.

O bovino infectado com isolado Pernambuco- Agreste de *A. marginale* apresentou riquetsemia crescente (**Tabela 4**) durante o período de observação e consideravelmente superior. Nesse animal, houve intensa produção de anticorpos em resposta ao antígeno, seguida de discreta diminuição e posterior queda acentuada das densidades ópticas.

A produção de anticorpos contra cada um dos isolados de *A. marginale* pôde ser detectada utilizando-se concentrações 2,5; 3,25 e 10,0 ng/poço das proteínas recombinantes AM254, VirB9 e VirB10, respectivamente, para a execução do ELISA. As proteínas recombinantes foram capazes de revelar um padrão na resposta imune humoral, nos diferentes momentos de coleta após a imunização.

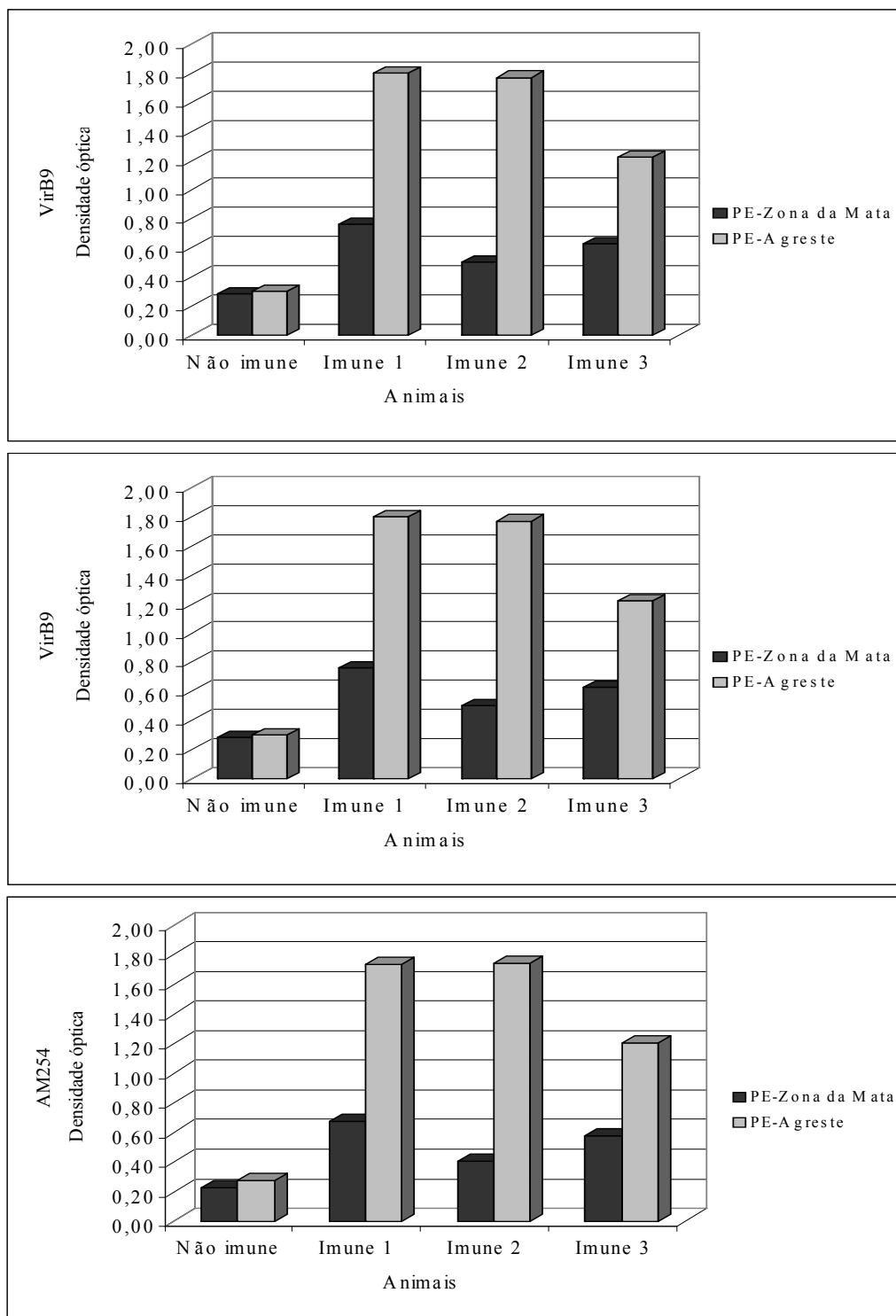


Figura 8. Avaliação do potencial imunogênico das proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254 de *Anaplasma marginale*, isolado brasileiro Rio Grande do Norte, contra isolados heterólogos Pernambuco- Zona da Mata e Pernambuco- Agreste. Imune 1: soro obtido no 5º dia pós-infecção; Imune 2: soro obtido no 15º dia pós-infecção; Imune 3: soro obtido no 35º dia pós-infecção.

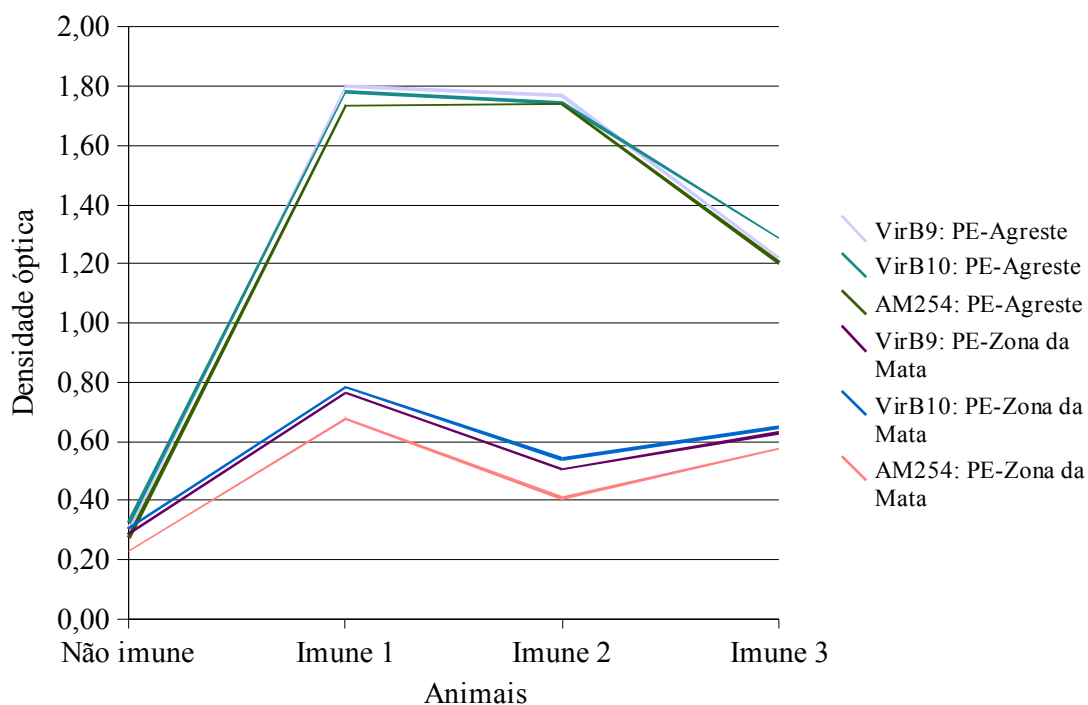


Figura 9. Produção de IgG em bovinos imunizados com *Anaplasma marginale* isolados Pernambuco (PE)- Zona da Mata e Pernambuco (PE)- Agreste. Soros submetidos ao teste ELISA com as proteína recombinantes VirB9, VirB10 e AM254. Imune 1: soro obtido no 5º dia pós-infecção; Imune 2: soro obtido no 15º dia pós-infecção; Imune 3: soro obtido no 35º dia pós-infecção. Resultados expressos como densidade óptica dos soros no teste ELISA.

Tabela 4. Riquetsemia dos animais inoculados com isolados heterólogos (Pernambuco-Zona da Mata e Pernambuco- Agreste) brasileiros, de *Anaplasma marginale*. Soro imune 1: soro obtido no 5º dia pós-infecção; Imune 2: soro obtido no 15º dia pós-infecção; Imune 3: soro obtido no 35º dia pós-infecção.

Isolado	Soro imune 1	Soro imune 2	Soro imune 3
Zona da Mata	0%	>0,1%	>0,1%
Agreste	0%	2%	5,5%

5 DISCUSSÃO

Para alcançar os objetivos propostos no presente estudo, foram amplificados vários genes, selecionados com base no genoma de *Anaplasma marginale* (BRAYTON et al., 2005) e nas proteínas de membrana do isolado americano, identificadas por meio de técnicas de genômica e proteômica (LOPEZ et al., 2005). Para a escolha das proteínas incluídas no experimento, considerou-se o potencial imunogênico daquelas que reagiram com IgG2 de bovinos imunizados com membrana externa de isolado americano de *A. marginale* (LOPEZ et al., 2005).

Inicialmente, foram amplificados os genes *am097*, *am197*, *am854*, *am956* (dados não mostrados), *virB9* e *virB10* e *am254*, entretanto, conseguiu-se apenas a expressão das proteínas codificadas pelos genes *virB9*, *virB10* e *am254*. Esse fato, no entanto, não exclui as proteínas não expressas de futuras pesquisas, pelo contrário, alterações na metodologia utilizada podem propiciar a expressão das mesmas e a investigação como potenciais imunógenos. No caso de *am197*, a clonagem em plasmídeo pGEM-T Easy apresentou grande dificuldade.

As proteínas recombinantes VirB9 e AM254 apresentaram massa molecular correspondente ao esperado, de acordo com Lopez et al. (2005). VirB10, entretanto, apresentou massa molecular de 60 kDa, que é consideravelmente superior aos 31 kDa descritos por Lopez et al. (2005) para o isolado americano Saint Maries, discordando, também, do resultado obtido por Macmillan et al. (2006), que por meio de técnicas de proteômica detectaram uma proteína de membrana em *A. marginale* com massa molecular de 55 kDa, posteriormente identificada como VirB10.

A massa molecular de proteínas está diretamente ligada à composição de aminoácidos. Modificações químicas como acetilação, hidroxilação, fosforilação, glicosilação e até mesmo adição de nucleotídeos, podem ocorrer nos terminais N e C, como também na seqüência de aminoácidos da proteína (TURNER et al., 2000). Essas alterações, bem como a degradação parcial de proteínas, podem resultar em variação entre a massa molecular esperada e a massa molecular obtida (LOPEZ et al., 2005).

Há relatos de variação de massa molecular em MSP1, uma outra proteína de membrana de *A. marginale* (OBERLE et al., 1988; ALLREAD et al., 1990). Diferentes isolados de *A. marginale* apresentaram variação de 70-105 kDa para MSP1, havendo, inclusive, divergência para o mesmo isolado (OBERLE et al., 1988). Garcia-Garcia et al. (2004c) demonstraram que as variações observadas em MSP1a e MSP1b ocorrem como consequência de glicosilação, particularmente abundante na região N- terminal de MSP1a que contém peptídeos repetidos.

Outra provável explicação para a diferença observada é a possibilidade de VirB10 possuir uma região central hipervariável, como ocorre em MSP2 (outra proteína de membrana de *A. marginale*) cuja massa varia de 36-44kDa (BROWN et al., 2004).

Uma das etapas a serem executadas na tentativa de esclarecer o(s) motivo(s) da variação observada na massa molecular de VirB10 obtida no presente estudo, é verificar se outros isolados brasileiros de *A. marginale* são semelhantes ou divergentes em relação à massa de VirB10. Posteriormente, a determinação da seqüência de aminoácidos que compõe a proteína permitirá a identificação de regiões conservadas entre os diferentes isolados.

Quanto à purificação, embora tenham sido utilizados agentes desnaturantes protéicos, como guanidina-HCl e uréia em altas molaridades, o protocolo de purificação híbrido, no qual foram realizadas lavagens finais e eluição em condições nativas, aparentemente não alterou os sítios de ligação para formação do complexo antígeno-anticorpo, não alterando, provavelmente, a estrutura terciária de cada proteína recombinante.

Em relação ao ELISA com as proteínas recombinantes, nos três ensaios com soros

homólogos, os antígenos foram reconhecidos por IgG. Apesar da existência de sobreposição de densidades ópticas para soros positivos e negativos, isso não interferiu na capacidade de discriminar entre positivos e negativos em cada teste.

Nos testes com soros heterólogos, as proteínas recombinantes também foram reconhecidas por IgG, antes que houvesse riquetsemia detectável microscopicamente. A menor quantidade de imuno-complexos detectados nos ELISAS realizados com soros oriundos do bovino imunizado com isolado Pernambuco-Agrete de *A. marginale*, é compatível com a riquetsemia mais baixa observada nos exames seqüenciais realizados no bovino experimentalmente infectado com o isolado com citado.

As reações das proteínas obtidas no presente estudo com IgG de soros homólogos e heterólogos estimulam o prosseguimento de pesquisas que avaliem o potencial imunogênico das mesmas. Mesmo tendo sido testado pequeno número de isolados, outros soros heterólogos poderão ser submetidos ao mesmo protocolo de estudo estabelecido por esse trabalho, esclarecendo-se, assim, se essas proteínas são reconhecidas por diferentes isolados de *A. marginale*, representativos dos isolados brasileiros.

Pesquisas futuras poderão incluir uma etapa de análise sobre o reconhecimento de VirB9, VirB10 e AM254 por anticorpos da classe IgG2, por serem essas as imunoglobulinas associadas a respostas protetoras contra a anaplasiose (TUO et al., 2000). Da mesma forma, a investigação da indução de resposta celular por essas proteínas assume importância, pois diferentes tipos celulares estão envolvidos na resposta imune contra *A. marginale* (BAUTISTA, 1996; BROWN et al. 1998a; LAHMERS et al., 2005) e a capacidade de estimular resposta imune celular é, também, uma característica desejável em candidatos potenciais a imunógenos.

Outro campo a ser explorado é o do uso de VirB9, VirB10 e AM254 em testes diagnósticos, uma vez que distinguem de forma significativa entre soros positivos e negativos para *A. marginale*, e até mesmo na elaboração de kits com base nessas proteínas.

Considerando, também, a função em outros microrganismos das proteínas contempladas neste estudo, como a sobrevivência intracelular após a fagocitose em *Brucella suis* (O'CALLAGHAN et al., 1999) e o envolvimento nas etapas de adesão e fixação de *Lactobacillus johnsonii* em células intestinais de humanos (GRANATO et al., 2004), torna-se necessário que suas funções também sejam determinadas em *A. marginale*, pois podem estar relacionados à evasão do sistema imune ou à patogenicidade, como em outros agentes etiológicos.

As ferramentas propiciadas pela biologia molecular e pela engenharia genética têm permitido melhorar as vacinas existentes e o desenvolvimento de novas vacinas (KREUZER, 2002). VirB9, VirB10 e AM254 obtidas com este estudo, pelas características e possibilidades apresentadas são potenciais candidatas à produção de imunógenos.

6 CONCLUSÃO

Com este estudo, foi possível concluir que:

1. É possível produzir e purificar as proteínas recombinantes AM254, VirB9 e VirB10 de *Anaplasma marginale*

2. As proteínas recombinantes mostraram-se antigênicas, sendo reconhecidas por soros de bovinos imunizados com isolados brasileiros homólogo e heterólogos da riquetsia, corroborando o potencial como imunógenos dessas proteínas.

3. A expressão dos genes através do uso de vetores de expressão induzida não interferiu com o potencial imunogênico das proteínas recombinantes.

4. As proteínas recombinantes obtidas durante este estudo podem ser usadas em pesquisas futuras para avaliação do potencial de imunização contra anaplasnose, apresentando as seguintes vantagens:

4.1. podem ser produzidas em larga escala em *Escherichia coli*,

4.2. fácil processo de purificação,

4.3. conservação estrutural dos epítomos imunogênicos independente da expressão em organismo heterólogo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, J. R.; PALMER, G. H.; KEGERREIS, K. A.; HETRICK, P. F.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. Rapid and long-term disappearance of CD4⁺ T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. *Journal of Immunology*, v. 174, n. 11, p. 6702-6715, 2005.

ABBOTT, J. R.; PALMER, G. H.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. *Anaplasma marginale* major Surface protein 2 CD4⁺ T-cell epitopes are evenly distributed in conserved and hypervariable regions (HVR), whereas linear B-cell epitopes are predominantly located in the HVR. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 12, p. 7360-7366, 2004.

AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. *Research in Veterinary Science*, v. 25, p. 76-81, 1978.

ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.

ALLRED, D. R.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; LEIB, S. R.; HARKINS, T. M.; McELWAIN, T. F.; BARBET, A. F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.

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

ARAÚJO, F. R. *Avaliação das proteínas recombinantes MSP1a e MSP2 de Anaplasma marginale, associadas a oligonucleotídeo CpG 2006 como adjuvante, como imunógenos contra a anaplasmoze bovina*. 2005. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

ARAÚJO, F. R. ; MELO, V. P. S. ; RAMOS, C. A. N. ; MADRUGA, C. R. ; SOARES, C. O. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, N. F. ; ARAÚJO, G. S.; ALVES, L. C. ; TORRES JUNIOR, R. A. A.; FRAGOSO, S. P.; ARAUCO, P. R. C.; BACANELLI, G.; OLIVEIRA, M. B.; SANTOS, L. R. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 3481-3287, 1999.

BARBET, A. F.; LUNDGREN, A.; YI, J.; RURANGIRWA, F. R.; GUY H. PALMER, G. H. Antigenic Variation of *Anaplasma marginale* by Expression of MSP2 Mosaics. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 11, p. 6133-6138, 2000.

BARBET, A. F.; AGNES, J. T.; MORELAND, A. L.; Anna M. LUNDGREN, A. M.; ALLEMAN, A. R.; NOH, S. M.; BRAYTON, K. A.; MUNDERLOH, U. G.; PALMER, G. H.. Identification of functional promoters in the *msp2* expression loci of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Gene* n. 353, p. 89- 97, 2005.

BARBET, A. F.; MEEUS, A. F.; BELÁNGER, M.; BOWIE, M. V.; TI, J.; LUNGREN, A. M.; ALLEMAN, A. R.; WONG, S. J.; CHU, F. K.; MUNDERLOH, U. G.; JAURONN, S. D. Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and immunity*, v. 71, n.4, p. 706-1718, 2003.

BARBET, A. F.; BLENTLINGER, R.; YI, J.; LUNDGREN, A. M.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. . *Infection and Immunity*, v. 67, n. 1, p. 102-107 1999.

BARBET, A. F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 43-49, 1995.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; McGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.

BARON, C.; O'CALLAGHAN, D.; LANKA, E. Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Molecular Microbiology*, v. 43, p. 1359-1365, 2002.

BAUTISTA, C. R. La respeusta imune en la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinária*, v. 7, p. 315-329, 1996.

BOWIE, J. V.; FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*, v. 282, p. 95-102, 2002.

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

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; LUNDGREN, A.; YI, J.; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 1151-1159, 2002.

BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 98, n. 7, p. 4130-4135, 2001.

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

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; MEEUS, P. F.; BARBET, A. F.; KEGERREIS, K.A.; McGUIRE, T. C. CD4⁺ T lymphocytes from *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) vaccinees recognize naturally processed epitopes conserved in MSP3. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 6, p. 3688-3692, 2004.

BROWN, W. C.; McGUIRE, T.; MWAANGI, W.; KEGERREIS, A. K.; MACMILLAN, H.; LEWIN, A. H.; Guy H. PALMER, G. H. Major Histocompatibility Complex Class II DR-Restricted Memory CD4⁺ T Lymphocytes Recognize Conserved Immunodominant Epitopes of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 10, p. 5521-5532, 2002.

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

BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; ZHU, D.; LEWIN, H. A.; SOSNOW, J.; PALMER, G. H. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte

epitopes that elicit strong recall responses. *Journal of Immunology*, v. 166, p. 1114-1124, 2001b.

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

BROWN, W. C.; ZHU, D.; SHKAP, V.; McGUIRE, T. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4⁺ T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 5414-5422, 1998b.

CAMACHO-NUEZ, M.; MUNOZ, M. L.; SUAREZ, C. E.; McGUIRE, T. C.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of polymorphic *msp1b* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 4, p. 1946-1952, 2000.

CANTOR, G. H.; PONTZER, C. H.; PALMER, G. H. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 37, n. 3-4, p. 343-350, 1993.

CARSON, C.; SELLS, D. M.; RISTIC, M. Cell-mediated immunity in bovine anaplasmosis and correlation with protection induced by vaccination (a review). *Veterinary Parasitology*, n. 2, p. 75-81, 1976.

CHRISTIE, P. J., VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends of Microbiology*, v.8, p.354-360, 2000.

DALLO, S. F.; KANNAN, T. R.; BLAYLOCK, M. W.; BASEMAN, J. B. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, v. 46, p. 1041-1051, 2002.

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

EID, G.; FRENCH, D. M.; LUNDGREN, A. M.; BARBET, A. F.; TERRY F. McELWAIN,

T. F.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* Rickettsemia. *Infection and Immunity*, V. 64, n. 3 , p. 836-841, 1996.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cellular Immunology*, v. 154, n. 1, p. 287-295, 1994.

FELEK, S.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Sequence and Expression Analysis of *virB9* of the Type IV Secretion System of *Ehrlichia canis* Strains in Ticks, Dogs, and Cultured Cells *Infection and Immunity* , v. 71, n. 10, p. 6063–6067, 2003.

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

FRENCH, D. M.; MCELWAIN, T. F.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

FUENTE, J.; PASSOS, L. M.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F.; FACURY-FILHO, E. J.; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 121, n. 3-4, p. 307-316, 2004.

FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Veterinary Microbiology*, v. 91, p. 265-283, 2003a.

FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; GARCIA-GARCIA, J. C.; RODRÍGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; FRICHE PASSOS, L. M.; BARBOSA RIBEIRO, M. F.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 88, p. 275-285, 2002a.

FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary Parasitology* v.97 p. 65-76, 2001a.

FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 8, p. 5151-5156, 2001.

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

FUENTE, J.; GARCIA- GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; McEWEN, B. R.; CLAWSON, D.; KOCAN, K. M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *International Journal for Parasitology* 31 p. 1705-1714, 2001c.

FUTSE, J. E.; BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D.; PALMER, G. H. Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. *Molecular Microbiology*, n.57, p. 212-221, 2005.

GALE, K. R.; LEATCH, G.; GARTSIDE, M.; DIMMOCK, C. M. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitology Research*, v. 78, p. 410-415, 1992.

GALHOTRA, A. P.; GAUTAM, O. P.; BANERJEE, D. P.; CHAUBAN, H. V. S.; SINGH, R. P.; KALRA, D. S. Pathological changes in bovine anaplasmosis. *Indian Veterinary Journal*, v. 54, p. 599-601, 1977.

GARCIA-GARCIA, J. C.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; JOHNSON, T. J.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. S.; KOCAN, K. M. Differential expression of the *msp1a* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 261-272, 2004a.

GARCIA-GARCIA, J. C., FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T. Mapping of B-cell epitopes in the N terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 98, n. 3-4, p. 137-151, 2004b.

GARCIA-GARCIA, J. C.; FUENTE, J.; BELL-EUNICE, G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 5, p. 3022-3030, 2004c.

GE, N. L.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; MURPHY, G. L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive in situ hybridization. *Journal of Medical Entomology*, v. 33, p. 911-920, 1996.

GRANATO, D., G. E. BERGONZELLI, R. D. PRIDMORE, L. MARVIN, M. ROUVET, I. E. CORTHE'SY-THEULAZ. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4, p. 2160-2169, 2004.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*, n. 21, p. 8-10, 2002.

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; WILLADSEN, P. A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. *Vaccine*, v. 22, n. 3-4, p. 407-415, 2004.

JATKAR, P. R.; KREIER, J. P. Pathogenesis of anemia in *Anaplasma* infection. *The Indian Veterinary Journal*. V. 44, n. 5, p. 393-399, 1967.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R. C.; VIDOTTO, M. C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n.4, p. 177-179, 2001.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infection and Immunity*, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.

KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; McGUIRE, T.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.

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

KOCAN, K. M.; FUENTE, J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, v 112, p. 295-305, 2003.

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

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GUGLIELMONE, GARCIA-GARCIA J. C.; Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale* for survival in cattle and ticks. *Experimental and Applied Acarology*, v. 28, p. 9-25, 2002.

KOCAN, K. M.; HALBUR, T.; BLOUIN, E. F.; ONET, V.; FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SALIKI, J. T. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Veterinary Parasitology*, n. 102, p. 151-161, 2001.

KREUZER, H.; MASSEY, A. *Engenharia genética e biotecnologia*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed 2002, 434p.

LAHMERS, K. K.; NORIMINE, J.; ABRAHAMSEN, M. S.; PALMER, G. H.; BROWN, W. C. The CD4⁺ T cell immunodominant *Anaplasma marginale* major surface protein 2 stimulates $\gamma\delta$ T cell clones that express unique T cell receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 2, p. 199-208, 2005.

LAUS, J. L.; ORTIZ, J. P. D.; VICENTI, F. A. M.; BRITO, F. L. C.; WEHRLE, L. M.; CASTRO-NETTO, A.; LISBÃO, C. B. S. Uveitis due to anaplasmosis in a newborn Holstein calf. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 6, p. 1232-1235, 2006.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of biotechnology*, n. 73, p. 1-33, 1999.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 9, p. 5324-5331, 2003.

LÖHR, C. V.; BRAYTON, K. A.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H. Characterization of the *Anaplasma marginale* *msp2* locus and its synteny with the *omp1/p30* loci of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. *Gene*, v. 325, p. 115-121, 2004.

LÖHR, C. V.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 11, p. 114-120, 2002a.

LÖHR, C. V.; BRAYTON, K. A.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; BARBET, A.F.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 11, p. 6005-6012, 2002b.

LOPEZ, J. E.; SIEMS, W. F.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; McGUIRE, T. C.; NORIMINE, J.; BROWN, W. C. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 12, p. 8109-8118, 2005.

MacMILLAN, H.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; MUNSKE, G.; SIEMS, W. F.; BROWN, W. C. Analysis of the *Anaplasma marginale* major surface protein 1 complex protein composition by tandem mass spectrometry. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 13, p. 4983-4991, 2006.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*, Embrapa Gado de Corte. 2001, 360 p.

MADRUGA, C. R., KESSLER, R. H.; GOMES, A.; SCHENK, M. A. M.; ANDRADE, D. F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *A. marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 135-142, 1985.

MARQUES, M.; CHITALE, A., S.; BRENNAN, P. J.; PESSOLANI, M. C. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity*, v.66 p. 2625–2631, 1998.

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

McGAREY, D. J.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D.R.

Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 4594-4601, 1994.

McGUIRE, T. C.; DAVIS, W. C.; BRASSFIELD, A. L.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 4, p. 788-793, 1991.

MEEUS, P. F.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Molecular Microbiology*, v. 47, n. 3, p.633-643, 2003.

MELÉNDEZ, R. D. Future perspectives on veterinary hemoparasite research in the tropics at the start of this century. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 253-258, 2000.

MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; MICHAELI, S.; SHKAP, V. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, v. 100, n. 1-2, p. 55-64, 2004.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JONHSON, W. C.; GOLF, W. L. Development of conventional subunits vaccines for anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 255-266, 1995.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M. A.; BENITEZ, M. T.; LEON, E.; BAEK, B. K.; GUILLEN, A. T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitology Research*, v. 77, n. 2, p. 93-101, 1991.

MUNODZANA, D.; McELWAIN, T. F.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 6, p. 2619-2624, 1998.

MURPHY, F. A.; OSEBOLD, J. W.; AALUND, O. Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. *Journal of Infectious Diseases*. V. 116, p. 99-106, 1966.

NDUNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 3, p. 675-679, 1995.

NOH, S. M.; BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; AGNES, J. T.; DARK, M. J.; BROWN,

W. C.; BASZLER, T. V.; PALMER, G. H. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale msp2* gene superfamily outer membrane proteins. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 6, p. 3471-3479, 2006.

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

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

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; M. L. BOSCHIROLI, M. L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y.; RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*, v.33, n. 6, p. 1210–1220, 1999.

OHASHI, N.; ZHI, N.; LIN, Q.; RIKIHISA, Y. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 4, p. 2128-2138, 2002.

OHASHI, N.; ZHI, N.; ZHANG, Y.; RIKIHISA, Y. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 1, p. 132-139, 1998.

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

PACHECO, R. C.; VIDOTTO, O.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; KAWASAKI, P.; PRUDÊNCIO, L. B.; MARANA, E. R. M.; PEREIRA, A. L. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n. 3, p. 235-244, 2004.

PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P.; RODRIGUEZ, J. L.; GNAD, D. P.; HOLLIS, L. C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K. A. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 5381-5384, 2004.

PALMER, G. H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity.

Veterinary Immunology Immunopathology, v. 85, n. 1-2, p. 1-8, 2002.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 631-635, 2001.

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

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

PALMER, G. H.; EID, G.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 3808-3816, 1994a.

PALMER, G. H.; MUNODZANA, D.; TEBELE, N.; USHE, T.; McELWAIN, T. F. Heterologous strain challenge of cattle immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 42, n. 3-4, p. 265-273, 1994b.

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

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

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

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

PIPANO, E. Live vaccines against hemoparasitic disease in livestock. *Veterinary*

Parasitology, v. 57, p. 213-231, 1995.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 47, p. 235-251, 1998.

RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S.D.; BACKERT, S.; MEYER, T.F. *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Molecular Microbiology* v. 37, n. 6, p. 1389-1404, 2000.

RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J.; PASSOS, L. M. J.; SATURNINO, H. M.; MALACCO, M. A. F. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmose bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 55, n.1, p. 21-26, 2003.

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

RISTIC, M.; WATRACH, A. M. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *American Journal of Veterinary Research*, v. 24, n. 99, p. 267-277, 1963.

RODRIGUEZ Jr, J. L.; PALMER, G. H.; KNOWELES Jr., D. P.; BRAYTON, K. A. Distinctly different msp2 pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene* n.361, p. 127-132, 2005.

SCOLES, G. A.; BROCE, A. B.; LYSYK, T. J.; PALMER, G. H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal Medical Entomology*, v. 42, n. 4, p. 668-675, 2005.

SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 1026, p. 95-102, 2004.

SILVA, V. M. G.; ARAÚJO, F. A.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, M. A. O.; FRAGOSO, S. P.; SANTOS, L. R.; RAMOS, C. A. N.; BACANELLI,

G.; TORRES Jr, R. A. A. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 511-516, 2006

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

THEILER, A. "*Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease." Report to the Government, Transvaal, South Africa. Veterinary Bacteriology, Department of Agriculture (1908-9,1910), p. 7-64, 1910.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária- uma introdução*, 6ed, São Paulo: Roca. 2002, 532p.

TUO, W.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ZHU, D.; BROWN, W. C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 1, p. 270-280, 2000.

TURNER, P. C.; McLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. *Biologia molecular*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, 287p.

VALDEZ, R. A.; McGUIRE, T. C.; BROWN, W. C.; DAVIS, W. C.; JORDAN, J. M.; KNOWLES, D. P. Selective in vivo depletion of CD4⁺ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 2, p. 417-424, 2002.

VIDOTTO, M. C.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. JR. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.

VIRESHAKUL, N.; KAMPER, S.; BOWIE, M. V.; BARBET, A. F. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene* n. 253, p. 45-53, 2000.

VISSER, E. S.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. P. JR. The *Anaplasma marginale* *msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

WAGHELA, S. D.; CRUZ, D.; DROLESKEY, R. E.; DeLOACH, J. R.; WAGNER, G. G. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. *Veterinary Parasitology*, v. 73, p. 43-52, 1997.

WYATT, C. R.; DAVIS, W. C.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C. Effect on intraerythrocytic *Anaplasma marginale* of soluble factors from infected calf blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. v. 64, p. 4846-4849, 1996.

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

Anexo

Anexo A. Valores das densidades ópticas obtidas por meio de ensaio ELISA de soros homólogos de bovinos, 72 positivos e 72 negativos para *Anaplasma marginale* com as proteínas recombinantes VirB9, VirB10 e AM254 de *A. marginale*.

Soro	VirB9 neg	VirB10 neg	AM254 neg	Soro	VirB9 pos	VirB10 pos	AM254 pos
1	0,86	0,39	0,8	1	1,5	1,43	1,53
2	0,59	0,33	0,64	2	1,48	1,39	1,54
3	0,67	0,36	0,63	3	1,34	1,3	1,43
4	0,89	0,43	0,91	4	1,41	1,22	1,55
5	0,83	0,5	0,79	5	1,41	1,31	1,55
6	0,52	0,3	0,67	6	1,38	1,29	1,57
7	0,6	0,4	0,57	7	1,35	1,31	1,46
8	0,64	0,42	0,65	8	1,26	1,23	1,33
9	0,86	0,53	0,87	9	1,43	1,39	1,54
10	0,28	0,17	0,25	10	1,39	1,25	1,55
11	0,66	0,43	0,67	11	1,41	1,34	1,54
12	0,67	0,42	0,68	12	1,48	1,3	1,66
13	0,45	0,28	0,51	13	0,67	1,24	1,38
14	0,58	0,4	0,64	14	1,38	1,31	1,47
15	0,46	0,29	0,41	15	1,22	1,34	1,53
16	0,77	0,39	0,74	16	1,45	1,31	1,54
17	0,68	0,44	0,73	17	1,36	1,31	1,54
18	0,59	0,33	0,66	18	1,33	1,25	1,53
19	0,56	0,35	0,44	19	1,41	1,4	1,45
20	0,81	0,35	0,45	20	1,18	1,16	1,26
21	0,83	0,54	0,73	21	1,17	1,13	1,14
22	0,56	0,34	0,54	22	1,49	1,28	1,48
23	0,73	0,46	0,76	23	1,32	1,26	1,41
24	0,7	0,37	0,81	24	1,37	1,25	1,49
25	0,11	0,67	0,5	25	1,2	1,54	1,21
26	0,1	0,6	0,46	26	1,23	1,58	1,27
27	0,12	0,59	0,44	27	1,36	1,54	1,28
28	0,11	0,65	0,49	28	1,36	1,53	1,24
29	0,15	0,67	0,51	29	1,58	1,58	1,29
30	0,12	0,7	0,5	30	1,76	1,57	1,31
31	0,14	0,86	0,67	31	1	1,26	0,99
32	0,1	0,64	0,46	32	1,11	1,44	1,15
33	0,11	0,54	0,39	33	1,05	1,26	0,9
34	0,13	0,71	0,49	34	1,37	1,5	1,22
35	0,16	0,7	0,49	35	1,2	1,37	1,04
36	0,12	0,92	0,64	36	1,2	1,12	0,86
37	0,19	0,71	0,45	37	1,12	1,35	1,05
38	0,1	0,77	0,54	38	1,07	1,39	1,07
39	0,12	0,56	0,39	39	0,88	1,04	0,84

40	0,13	0,7	0,48	40	1,07	1,38	1,1
41	0,12	0,77	0,53	41	0,96	1,02	0,8
42	0,13	0,89	0,59	42	1,1	1,23	0,95
43	0,13	0,71	0,6	43	0,97	1,42	1,12
44	0,13	0,83	0,58	44	0,96	1,2	0,94
45	0,11	0,56	0,38	45	1,11	1,31	1,05
46	0,21	0,85	0,61	46	1,07	1,28	1,01
47	0,12	0,74	0,5	47	0,87	1,13	0,87
48	0,15	0,55	0,33	48	1,02	1,29	1,01
49	0,14	0,11	0,13	49	0,98	1,1	1,3
50	0,18	0,15	0,14	50	1,28	1,34	0,85
51	0,12	0,1	0,16	51	1,39	1,28	1,22
52	0,11	0,09	0,25	52	1,83	1,58	1,08
53	0,15	0,13	0,18	53	1,68	1,43	1,42
54	0,17	0,13	0,11	54	1,54	1,06	1,46
55	0,11	0,11	0,15	55	0,96	0,66	1,02
56	0,09	0,09	0,19	56	1,54	1,35	1,39
57	0,2	0,2	0,13	57	1,09	0,61	1,43
58	0,19	0,19	0,21	58	1,44	0,9	0,75
59	0,25	0,17	0,14	59	1,68	1,26	0,92
60	0,14	0,14	0,17	60	1,64	1,07	1,11
61	0,14	0,13	0,13	61	1,54	1,01	1,68
62	0,15	0,13	0,21	62	1,19	0,74	1,02
63	0,16	0,11	0,16	63	1,3	0,8	1,25
64	0,14	0,13	0,28	64	1,64	1,06	1,11
65	0,29	0,27	0,15	65	0,89	0,87	1,55
66	0,31	0,24	0,22	66	1,43	1,1	1,33
67	0,22	0,18	0,26	67	0,97	0,95	0,77
68	0,19	0,18	0,19	68	1,35	1,27	0,97
69	0,14	0,13	0,13	69	1,24	1,09	1,1
70	0,22	0,24	0,14	70	1,33	1,15	1,1
71	0,26	0,15	0,23	71	1,31	1,08	0,9
72	0,3	0,24	0,27	72	1,7	1,25	1,18

Anexo B. Valores das densidades ópticas obtidas por meio de ensaio ELISA com as proteína recombinantes VirB9, VirB10 e AM254 de soros de bovinos imunizados com *Anaplasma marginale* isolados Pernambuco (PE)- Zona da Mata e Pernambuco (PE)- Agreste. Imune 1: soro obtido no 5º dia pós-infecção; Imune 2: soro obtido no 15º dia pós-infecção; Imune 3: soro obtido no 35º dia pós-infecção.

Soro	AM254		VirB9		VirB10	
	ZM	Agreste	ZM	Agreste	ZM	Agreste
Pré-imune	0,23	0,23	0,285	0,305	0,305	0,32
Imune 1	0,675	0,675	0,765	1,80	0,785	1,78
Imune 2	0,405	0,405	0,505	1,77	0,54	1,745
Imune3	0,575	0,575	0,63	1,22	0,65	1,285

Anexo C. Soluções

1. Tampão Dubellico'S (DPBS) pH entre 7,2 e 7,4

KH₂PO₄: 0,2g

NaCl: 9,0g

H₂O q.s.p: 1,15g

Autoclavar por 30 minutos

Obs: a água deve ser destilada e deionizada.

2. Salina fosfatada tamponada- PBS

Solução A: Na₂HPO₄.2H₂O- 1,42g

água destilada- 1000ml

Solução B: NaH₂PO₄.2H₂O- 1,38g

água destilada- 1000ml

Solução A: 360mL

Solução B: 140mL

NaCl: 5,8g

H₂O destilada q.s.p.: 1000 ml

Ajustar o pH para 7,2

3. Salina fosfatada tamponada com Tween-20- PBST 0,1% pH 7,2

PBS pH 7,2: 1000 ml

Adicionar 1mL de Tween-20

4. Solução Substrato (pH 5,0)

Solução ácido cítrico 0,1M

Ácido cítrico: 0,96g

H₂O destilada: 50mL

Solução Na₂HPO₄

Na₂HPO₄: 1,42g

H₂O destilada: 50mL

Solução substrato (uso)

Solução	P/ 1 placa
Ác. Cítrico	1,5 mL
Na ₂ HPO ₄	1,6 mL
H ₂ O destilada	3,125 mL
OPD	3,75 mg
H ₂ O ₂	3,75µL

O OPD e peróxido de hidrogênio devem ser acrescentados no momento do uso.
Preparar 50µl/poço da solução substrato.

5. Solução de parada

H₂SO₄: 13,3 mL

H₂O destilada q.s.p.: 100mL

6. Tampão para transferência

Glicina: 2,93g

Trisbase: 5,81g

SDS: 0,375g

Metanol: 200mL

H₂O destilada q.s.p.:1000mL

7. Tampão Laemli (pH 8,3)

Trisbase: 3,03g

Glicina: 14,42g

SDS: 1g

H₂O destilada q.s.p.:1000mL

Anexo D. Meio de cultivo Luria Bertani- LB

Triptone: 5g

Extrato de levedura: 2,5g

NaCl: 5g

H₂O destilada q.s.p.:500ML