

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM  
BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE EPITOPOS DA PROTEINA 1 MAIOR  
DE SUPERFÍCIE DE *Anaplasma marginale* EM *Escherichia coli* E *Bacillus  
subtilis***

**KEILA DAYANE DO ESPIRITO SANTO PEREIRA**

**MANAUS**

**2015**

KEILA DAYANE DO ESPIRITO SANTO PEREIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE EPITOPOS DA PROTEINA 1 MAIOR  
DE SUPERFÍCIE DE *Anaplasma marginale* EM *Escherichia coli* E *Bacillus  
subtilis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação Multi-Institucional em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas, como requisito para o Título de  
Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Dr. Luis André Morais Mariúba

MANAUS

2015

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P436c Pereira, Keila Dayane do Espírito Santo Pereira  
CLONAGEM E EXPRESSÃO DE EPITOPOS DA PROTEINA 1  
MAIOR DE SUPERFÍCIE DE *Anaplasma marginale* / Keila Dayane  
do Espírito Santo Pereira Pereira. 2018  
67 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Luis André Morais Mariúba  
Dissertação (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Epítopos. 2. Anaplasmosse bovina. 3. MSPs. 4. *Bacillus subtilis*.  
I. Mariúba, Luis André Morais II. Universidade Federal do  
Amazonas III. Título

KEILA DAYANE DO ESPIRITO SANTO PEREIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE EPITOPOS DA PROTEINA 1 MAIOR DE SUPERFÍCIE DE *Anaplasma marginale* EM *Escherichia coli* E *Bacillus subtilis***

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Biotecnologia**, no Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, área de concentração em Agroflorestal.

APROVADA EM: 02/04/2015

**BANCA EXAMINADORA**



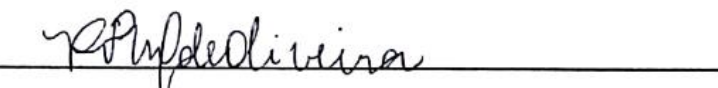
---

**Prof. Dr. Luís André Moraes Mariúba**



---

**Prof. Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira**



---

**Prof. Dra. Roseane Pinto Martins de Oliveira**

Manaus, 02 de Abril de 2015.

**DEDICATÓRIA**

*Ao meu amado Deus,  
e aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

*Acima de tudo ao meu Criador, ao meu único e eterno Deus. Àquele que me proporcionou essa vitória, essa tão sonhada conquista. A Ele que fiel e justo, bondoso, compassivo e amoroso. Que em nenhum momento, apesar de meus deslizes, deixou de ser fiel para comigo.*

*Aos meus pais, Antenor e Raimunda Pereira que sempre me incentivaram a estudar e manter-me firme nos princípios por eles ensinados.*

*Ao meu amado Pastor Leandro e sua esposa Fabiana que me incentivaram a não desistir dos planos de Deus para minha vida principalmente nas etapas mais difíceis dessa conquista.*

*As amigas mais chegadas que irmãs Erika Sâmia, Nubia Pereira, Daniele Albuquerque por todo incentivo, paciência e orações para que essa etapa fosse concluída com êxito.*

*Ao meu querido orientador Luis André Mariúba pela tão grande paciência em ensinar-me todos os procedimentos, e por toda a orientação recebida, sem seus ensinamentos, essa etapa seria difícil e árdua.*

*Aos meus amados colegas de laboratório, Alessandra, Fernanda, Jennifer, Ruth, Francilene, Lucas, Polyane, Walter, Késsia Caroline, Ana Paula, Ivaníldes, Yury Chaves, Andreia, Allan, Ruan, Lorrane, Eliz, Fhabiane, Paloma, Mayana, Paula Taquita, Diogo Castro, Felipe, Francisco e em especial Edilene Martins e Juliane Corrêa por toda ajuda nos momentos mais difíceis durante a fase do experimento.*

*Aos Doutores Paulo Nogueira e Patricia Orllandi pelo apoio ao longo de todo o projeto e por me permitir fazer parte do grupo de pesquisa.*

*À Universidade Federal do Amazonas especificamente ao Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, pela colaboração e parceria sempre que necessário. Em especial sou imensamente grata a Eneidine Assunção (Dina).*

*Jamais deixaria de agradecer a todo incentivo recebidos pela amada e maravilhosa Nubiane Trucy, como sempre disse: você é uma mulher fantástica, um presente que Deus colocou em minha vida.*

*Ao Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-AM por propiciar a realização deste projeto de pesquisa.*

*À Fundação de Apoio à Pesquisa do Amazonas (FAPPEAM) e pela concessão da bolsa.*

*A todos, sem exceção, que direta ou indiretamente contribuíram para realização dessa etapa tão importante em minha vida.*

*Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!  
Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor,  
o seu Deus, estará com você por onde você andar".*

*Josué 1:9*

*Confie no Senhor de todo o seu coração e não  
se apoie em seu próprio entendimento;  
reconheça o Senhor em todos os seus  
caminhos, e ele endireitará as suas veredas.*

*Provérbios 3:5-6*



## RESUMO

**Introdução:** Anaplasmosse bovina é uma doença que acomete ruminantes, especificamente bovinos no Brasil gerando prejuízos econômicos. Dentre os sinais clínicos apresentados de maior ênfase, a febre que caracteriza altos picos de parasitemia assim como, a anemia que pode levar o animal a óbito. As formas de combate à doença através das medidas profiláticas e produtos existentes no mercado não são eficientes. Animais imunizados com proteínas de superfície de *Anaplasma marginale* (MSPs) apresentam resposta imune humoral, os epítomos imunodominantes de MSP1 $\alpha$  tem mostrado excelente alternativa para a imunidade adaptativa, pois a imunidade contra *A. marginale* está associada com estas proteínas, que são expostas na superfície *rickettsia* e são facilmente acessíveis pelo sistema imune do hospedeiro, pode ser neutralizado por anticorpos contra epítomos expostos. Neste estudo, o objetivo foi expressar epítomos imunogênicos da proteína MSP1 $\alpha$  em *E. coli* e *Bacillus subtilis*. **Material e métodos:** Dessa forma, foram construídas duas quimeras (q1ANAP-pHT43 e q2ANAP-pRSET) com epítomos de proteína de superfície de *Anaplasma marginale*. **Resultados e Conclusão:** A purificação e a expressão da proteína em *E. coli* com vetor q2ANAP-pRSET apresentou resultados satisfatórios demonstrando que a proteína é solúvel, enquanto que a expressão em *Bacillus subtilis* não apresentou resultados. A validação da proteína foi realizada com soro de animais infectados com a doença. Assim, podemos concluir-se que epítomos de q2ANAP possuem epítomos imunogênicos, possibilitando a realização de novos estudos visando avaliar a resposta imune protetora de bovinos infectados.

**PALAVRAS – CHAVE:** Epítomos, Anaplasmosse bovina, MSPs

## ABSTRACT

**Introduction:** Bovine Anaplasmosis is a disease that affects ruminants, especially cattle in Brazil generating economic losses. Among the clinical signs, fever are present in high peaks of parasitemia, as well as anemia, which can lead the animal to death. Ways to combat the disease on the market are not efficient. Animals immunized with surface proteins of *Anaplasma marginale* (MSPs) showed the humoral immune response, and immunodominant epitopes of MSP1 $\alpha$  has being proven an excellent alternative to adaptive immunity. Since immunity to *A. marginale* is associated with these proteins, which are exposed on the surface rickettsia and are easily accessible by the host immune system, can be neutralized by antibodies against epitopes exposed. In this study, the objective was to express immunogenic epitopes of MSP1 $\alpha$  protein in *E. coli* and *Bacillus subtilis*. **Methods:** In this way, two proteins (q1ANAP and q2ANAP) were designed with surface protein epitopes of *A. marginale*. **Results and Conclusion:** Purification and protein expression in *E. coli* with q2ANAP-pRSET vector showed satisfactory results demonstrating that the protein is soluble, whereas in *Bacillus subtilis* no expression was obtained. The validation of the protein was performed with sera from animals infected with the disease. Thus, we can conclude that q2ANAP has immunogenic epitopes and further studies can be realized aiming to evaluate the protective immune response of infected cattle.

**Keywords:** Epitopes, Anaplasmosis bovine, MSPs

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - (A) Carrapato da família Ixodidae mostrando a forma tegumentar rígida da fêmea parcialmente ingurgitada. (B) fêmea da família Argasidae. ....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b> - Visão geral do mecanismo imune e moléculas envolvidas na barreira potencial do patógeno.....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b> – Esquema pRSET A com inserção do gene MSP e o aminoácido Alanina_Linkers.....	<b>32</b>
<b>Figura 4</b> -Vetor de clonagem para inserto de <i>Anaplasma marginale</i> . ....	<b>32</b>
<b>Figura 5</b> - Mapa vetor de expressão pHT43.....	<b>34</b>
<b>Figura 6</b> - Análise do perfil de extração plasmidial (a esquerda) e digestão com a Enzima Eco RI (a direita), visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8% .....	<b>42</b>
<b>Figura 7</b> - Perfil de eletroforese em gel de agarose 1% do fragmento q1ANAP clonado em vetor pHT43.....	<b>42</b>
<b>Figura 8</b> -Western Blot da q1ANAP-pHT43 após a indução em <i>E. coli</i> . ....	<b>43</b>
<b>Figura 9</b> - Perfil de indução através de <i>Western Blot</i> com pRSET A em <i>E. coli</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 10</b> - Gel de SDS - PAGE após a indução do gene em pHT43 em <i>E. coli</i> . ....	
<b>Figura 11</b> – “Imunoblot” utilizando soros de animais infectados com Anaplasmose contra a proteína q2ANAP.....	<b>45</b>
<b>Figura 12.</b> Curva de crescimento de <i>B. subtilis</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 13</b> – Sequenciamento do gene MSP de <i>Anaplasma marginale</i> . ....	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2</b> - Tipos de <i>Anaplasma spp.</i> .....	<b>59</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ELISA	Teste de Imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
DTT	Ditiotreitol
IPTG	Isopropílico $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MSP	Maior Proteína de Superfície
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
TPB	Tristeza Parasitária Bovina
TBE	Tris-borato-EDTA
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-majior-beta-D-galacto-piranósideo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1 Epidemiologia</b> .....	18
2.2 Anaplasmosse Bovina.....	19
<b>2.3 Detecção clínica e patológica</b> .....	21
2.3.1 Diagnóstico clínico patológico.....	21
2.3.2 Diagnóstico laboratorial .....	22
2.4 Controle e Tratamento.....	22
<b>2.5 A importância das proteínas de superfície de <i>Anaplasma marginale</i></b> .....	23
<b>2.6 Vacinas recombinantes</b> .....	26
<b>2.7 Epítomos como candidatos Vacinais</b> .....	26
<b>2.8 Vacinas produzidas a partir de Tecnologia de DNA Recombinante</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	30
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>4.1 Cepas e Vetores</b> .....	31
<b>4.2 Desenho de gene sintético</b> .....	31
<b>4.3 Ligação em <i>pGEM®-T Easy Vector Systems</i></b> .....	32
<b>4.4 Transformação de <i>E.coli</i> em TOP 10</b> .....	33
4.5.1 Extração plasmidial com <i>kit QIAprep® Miniprep Handbook</i> .....	33
<b>4.6 Subclonagem em pHT43</b> .....	33
4.6.1 Transformação e crescimento em células de <i>E.coli</i> cepa BL 21 .....	34
4.6.2 Sequenciamento .....	35
<b>4.7 Cultivo e Indução com IPTG</b> .....	36
4.7.1 Em <i>E.coli</i> .....	36
4.7.2 Em <i>Bacillus subtilis</i> .....	36
4.7.3 Extração da proteína por lise celular - sonicação .....	37
<b>4.8 Análise e confirmação da proteína MSP1<math>\alpha</math></b> .....	37
4.8.1 Gel de Poliacrilamida .....	37
4.8.2 Western blot.....	38
4.8.2 Purificação da proteína recombinante .....	38
4.8.3 Liofilização da proteína recombinante .....	39
4.8.4 Immunoblotting.....	39

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	40
<b>5.1 Seleção dos Epítomos</b> .....	40
<b>5.2 Clonagem da q1ANAP em pHT43</b> .....	41
<b>5.3 Indução da q1ANAP-pHT43 em <i>E. coli</i></b> .....	42
<b>5.4 Indução e purificação da q1ANAP-pHT43 em <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	43
<b>5.5 Indução e purificação da q2ANAP-pRSET em <i>E. coli</i></b> .....	43
<b>5.6 Testes de <i>Western Blot</i> com anticorpo <i>Anti – His</i> e com soro de animais infectados com <i>A. marginale</i></b> .....	44
CONCLUSÃO .....	44
REFERÊNCIAS .....	48
ANEXOS .....	59
Anexo 1 – Espécies de <i>Anaplasma spp.</i> .....	59
Anexo 2 – Protocolos .....	60
Anexo 3 - SEQUENCIAMENTO .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária no Brasil cresce ao longo dos anos, conseqüentemente, a exportação de carne bovina acompanha esse crescimento. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) comprovam que há um aumento na exportação de carne bovina de animais do Brasil.

O sistema de criação de animais tem como objetivo principal a alta produtividade. Um dos maiores entraves da produtividade tem sido os endoparasitas e ectoparasitas comprometendo a saúde do animal levando-o a óbito (SILVA, 2012). Dentre as doenças parasitárias destaca-se a Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que tem como agentes etiológicos, o protozoário do gênero *Babesia* e a riquetsia *Anaplasma*, que juntas geram perdas econômicas e oneram o custo de produção aumentando os investimentos com medicamentos e combate das doenças (GRISI et al. 2002; KOCAN et al. 2013).

A enfermidade, além das perdas econômicas, predispõe o animal à miíase e abscessos, rápido emagrecimento e queda na produção de leite e carne, abortamento e casos de alta parasitemia causando anemia severa podendo levar o animal à óbito (TIRLONE, 2014).

Os animais infectados por TPB são encontrados em vários continentes como Europa (DE LA FUENTE et al. 2004), Ásia (LIU et al. 2005), Oriente Médio (MOLAD et al. 2006), África (TEMBUE et al. 2011) e América (KOCAN, 2004).

No Brasil, os agentes mais comuns dentre os gêneros são *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* causadores das doenças Babesiose e Anaplasmose, respectivamente (ARAÚJO et al. 1997, SANTOS et al. 2006).

A anaplasmose bovina é uma doença encontrada em regiões que apresentam clima tropical e subtropical tendo como principal transmissor o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (KOCAN et al. 2003). Para Marana e Vidotto (2001) entre as espécies de *Anaplasma spp.*, a *A. marginale* é a mais patogênica e de maior importância para os bovinos no Brasil.

Estudos recentes apontaram a região nordeste, em constante situação de estabilidade enzoótica, e a região Norte aponta alta incidência de *A. marginale* nos rebanhos dos estados de Rondônia e Acre, o que ocorre de forma homogênea, fato explicável pelas condições climáticas favoráveis e não isenta as demais regiões do Brasil com alta incidência (GONÇALVEZ et al. 2000; BRITTO et al. 2007; SOUZA et al. 2013).

O controle da patologia inclui vacinação, quimioterapia e manejo sanitário (GEALE, 2011) assim, os testes sorológicos apresentam melhores resultados na avaliação em aspectos



epidemiológicos, e com os avanços da Biologia Molecular tornou possível, novas estratégias de prevenção contra Anaplasmosse Bovina utilizando técnicas que imunizam o animal, além disso, auxiliam nas tomadas de decisões para o desenvolvimento de vacinas elaboradas com epítomos.

Vacinas contendo cepas atenuadas da *Rickettsia* também têm sido avaliadas como medicamentos contra anaplasmosse em bovinos, estas porém não imunizam totalmente o animal, visto que, previnem contra o estágio momentâneo da doença e não impedem que novas infecções sejam obtidas (KOCAN, 2003).

Proteínas de superfície (MSPs) encontradas na membrana externa de *A. marginale* são capazes de induzir resposta imunológica protetora contra desafios homólogos e heterólogos. Elas conferem importância na imunização contra a doença, sendo caracterizadas em estudos com eritrócitos de bovinos infectados pela *Rickettsia* (TEBELE et al. 1991).

A MSP1 tem sido extensivamente estudada, tratando-se de um complexo de dois polipeptídios ligando covalentemente MSP1a e MSP1b com massas moleculares de 100 e 105 kDa respectivamente. Elas conferem importância na imunização contra a doença, sendo caracterizadas em estudos com eritrócitos de bovinos infectados pela *rickettsia* (TEBELE et al. 1991), mostrando em alguns estudos uma grande relação entre a resposta humoral contra determinados epítomos de MSP1a e a proteção a doença.

Logo, o desenvolvimento de pesquisas que facilitem a combinação e produção destes epítomos podem levar ao desenvolvimento de novas ferramentas e viabilizar o desenvolvimento de futuros estudos, os quais buscarão uma análise detalhada do potencial vacinal destas regiões.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anaplasmosse

A doença Anaplasmosse é amplamente conhecida e distribuída em regiões de clima tropical e subtropical, diferente de outras espécies de *Anaplasma spp.* patogênicas e não patogênicas que estão presentes em todos os continentes (Kocan et. al., 2003). Cavalcante (2007) apontou fatores que influenciam na situação epidemiológica da *A. marginale*, tais como, condições climáticas marginais para o desenvolvimento do carrapato transmissor e controle intensivo do mesmo e também grau de resistência da raça do rebanho.

A Anaplasmosse, assim como as demais doenças do complexo da Tristeza Bovina Parasitária, possui maior incidência em animais com deficiência imunológica seja por subnutrição ou por serem recém-nascidos. Gonçalves et al. (2011) explicam que o conhecimento da clínica e da epidemiologia da enfermidade em uma região é importante para o diagnóstico e estabelecimento de medidas terapêuticas e profiláticas adequadas, evitando assim, a manifestação da doença em surtos e melhor implantação de sistemas de controle da doença e conseqüentemente aumentando o entendimento da complexa ação do vetor que traz prejuízos a pecuária.

Na década de 1990 a situação epidemiológica da Anaplasmosse no Brasil era tida como de estabilidade enzoótica, havendo poucas áreas que apresentavam condições de instabilidade, fato explicado pelas características climáticas e ecológicas desfavoráveis ao desenvolvimento dos transmissores da doença (SOUZA et al. 2000). Souza et al. (2013), em estudos mais recentes, apontaram que a região nordeste do Brasil ainda apresenta situação de estabilidade enzoótica para a anaplasmosse.

Na região Norte, Britto et. al. (2007) apontaram que há alta incidência de *A. marginale* nos rebanhos dos estados de Rondônia e Acre, o que ocorre de forma homogênea, portanto, caracteriza-se como situação de estabilidade enzoótica, explicável pelas condições climáticas favoráveis.

O controle sanitário é fator básico para a comercialização de produtos com origem animal, seja para atender o mercado interno quanto o internacional. A presença de doenças em rebanhos de bovinos pode trazer inúmeros prejuízos à economia, e principalmente aos produtores, tais como: suspensão do direito de comercialização, queda na produção, necessidade de investimento em medicação e tratamento para combate e prevenção,

mortalidade de animais, contaminação de outros rebanhos, infertilidade temporária de machos e fêmeas entre outros (GONÇALVES, 2000).

De acordo Tirlone (2014) o parasita do gado *Rhipicephalus microplus* causa grandes prejuízos na produção pecuária. Entre as perdas diretas estão perdas econômicas causadas por lesões na carcaça, predispondo o hospedeiro a miíase e abscessos, anemia, rápido emagrecimento e queda na produção de leite e carne. Já as perdas indiretas estão à transmissão do patógeno causador de TPB (Tristeza parasitaria bovina).

No Brasil, Grisi et al. (2002) estimam que as perdas causadas pelos carrapatos e TPB superam 2 bilhões de dólares por ano. As perdas econômicas geradas afetam o grau de competitividade da pecuária brasileira, pois oneram o custo de produção e exigem maior investimento em desenvolvimento tecnológico para combate à doença.

A relevância da pecuária não está restrita ao agronegócio nacional, segundo o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Brasil é o líder mundial em exportação de carne bovina desde 2008, sendo que 75% da produção nacional estão voltadas para atender o mercado interno. Até 2020, o MAPA estima um crescimento de 44,5% do mercado mundial de consumo de carnes, visando manter sua condição de principal exportador, o governo brasileiro atualizou em 2009 a legislação referente aos requisitos sanitários para controle da produção animal destinada à exportação.

## 2.2 Anaplasmosse Bovina

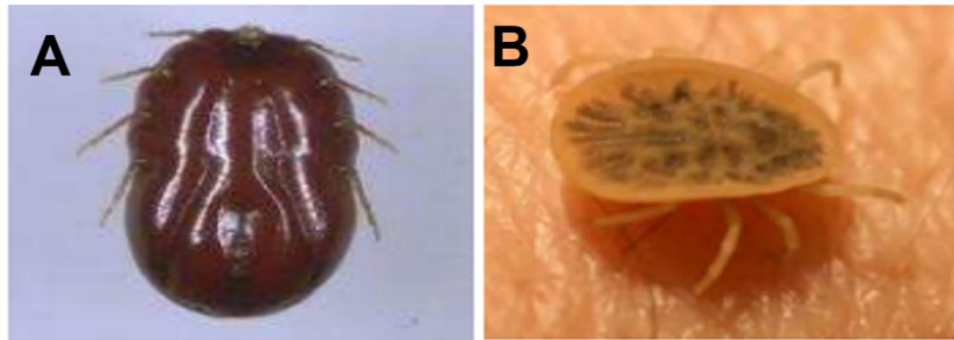
*Anaplasma marginale* é uma bactéria intra-eritrócitária obrigatória Gram negativa da ordem das Rickettsíases pertencente à família das Anaplasmataceae causadora da Anaplasmosse bovina (DUMLER et al. 2001).

A doença foi descrita primeiramente por Sir Arnold Theiler em 1910 (SOUZA et al. 2001; MARANA e VIDOTTO, 2001; ARAÚJO et al. 2003) reconhecendo os “pontos marginais” encontrados nos eritrócitos de animais doente no momento da invasão.

Atualmente, o gênero *Anaplasma* é composto por seis espécies: *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum* conforme ANEXO A, este último, infecta seres humanos e animais domésticos e selvagens e a mais patogênica em bovinos no Brasil é a *A. marginale* (DE LA FUENTE et. al. 2010; TATE et al. 2013).

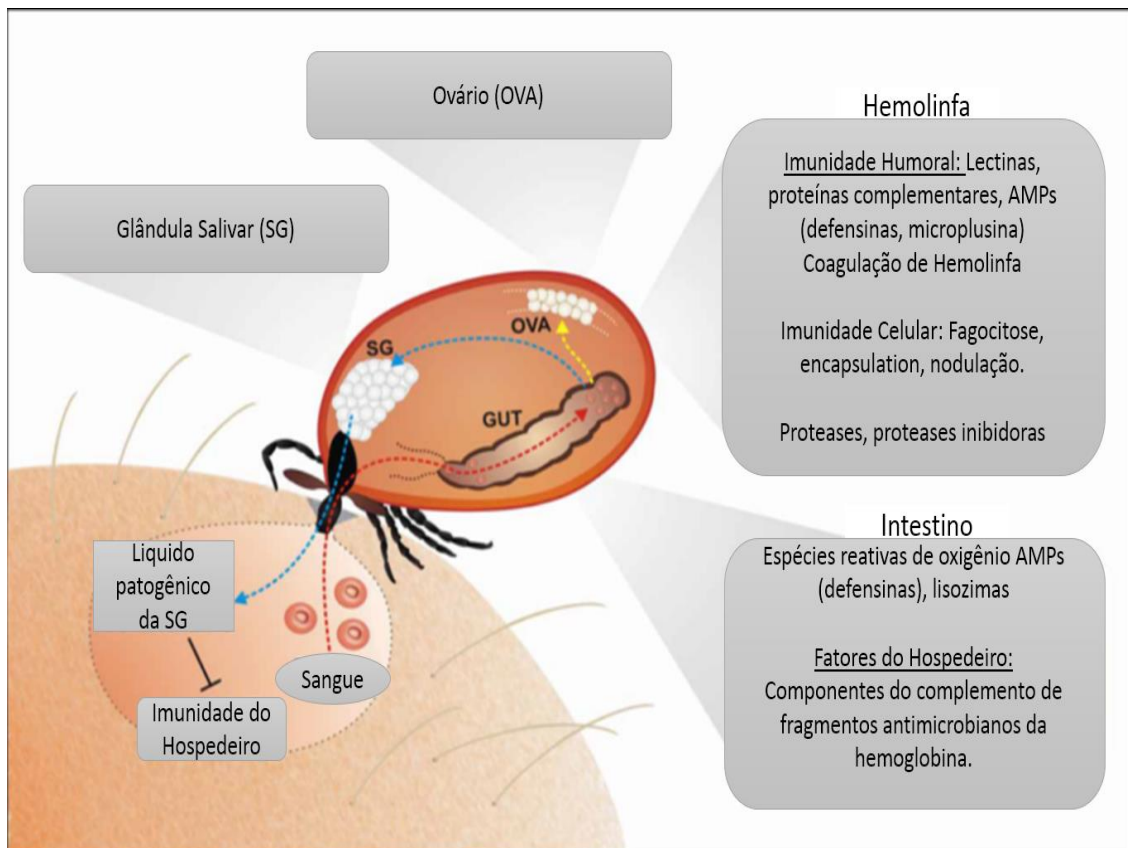
O principal vetor e agente transmissor da doença é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* um ectoparasita ixodídeos hematófago e monóxeno, de acordo com

(MASSARD et al.2004; MATHIAS, 2013) Figura 1. A *Rickettsia A. marginale* é veiculada durante o repasto sanguíneo ao hospedeiro. Anatomicamente, os órgãos mais ativos desenvolvidos do vetor os ovários e os intestinos, onde o patógeno se desenvolve e reproduz,



**Figura 1** - (A) Carrapato da família Ixodidae mostrando a forma tegumentar rígida da fêmea parcialmente ingurgitada. (B) fêmea da família Argasidae. Fonte: Osvaldo Pires, 2014.

como pode ser visualizado na Figura 2 (KOCAN et al.2010; GRAU et al. 2013; (HAJDUŠEK et al. 2013).



**Figura 2** - Visão geral do mecanismo imune e moléculas envolvidas na barreira potencial do patógeno. Fonte: HAJDUŠEK, 2013.

O parasita alimenta-se de sangue do hospedeiro, secreções sebáceas e substratos de tecidos na superfície da pele do animal causando injúrias na carcaça, animais que conseguem se recuperar da doença normalmente permanecem infectados sendo apenas reservatórios do vetor (KESSLER, 2001). Outras formas de transmissão que não envolvem o carrapato são descritas por Ribeiro et al. 1995; Kessler, 2001; Grau, 2013.

Em ruminantes, o período de incubação da infecção pode variar de 07 a 60 dias, tendo em média 28 dias dependendo do número de organismos patogênicos que veiculam na corrente sanguínea do animal (KOCAN et al. 2003).

A doença acomete os eritrócitos dos bovinos onde os corpúsculos iniciais se multiplicam por divisão binária, assim, células parasitadas são retiradas da corrente sanguínea pelo sistema fagocitário mononuclear resultando em anemia branda à severa e icterícia (RICHEY, 1990; KOCAN et al. 2003).

## **2.3 Detecção clínica e patológica**

### **2.3.1 Diagnóstico clínico patológico**

O diagnóstico de Anaplasmosose pode ser avaliado de acordo com a incidência, prevalência e soroprevalência em determinada região. Na sintomatologia a febre é caracterizada como um dos sinais mais graves da doença podendo atingir 40° C ou mais, fase que ocorre no pico da infecção podendo o animal vir a óbito (KOCAN et al. 2010).

Outros sintomas são a anemia hemolítica, dispneia, anorexia, perda de peso, micção frequente, palidez da pele e das membranas e mucosas, aumento na taxa de respiração também são de alta relevância para o diagnóstico clínico. O volume globular cresce à medida que aumenta a parasitemia, normalmente esses sinais são bem evidentes nos animais tornando-os letárgicos e fracos e nos casos crônicos (KOCAN et al. 2010).

Em alta parasitemia animal torna-se inapetente, hipoglicêmico e desidratado, o líquido extracelular aumenta e conseqüentemente leva a hipovolemia e insuficiência renal além da diminuição da excreção de H<sup>+</sup> (GARRY, 1994).

Em casos clínicos é necessário um diagnóstico com exames laboratoriais como esfregaço de sangue corados (técnica pouco sensível para baixos níveis de parasitemia) e procedimentos sorológicos e moleculares (KOCAN et al. 2010).

Para o diagnóstico anatomopatológico são necessárias necropsias do baço e fígado onde são verificadas as lesões que demonstrem regiões anêmicas e ictéricas, linfonodos intumescidos, bile densa e grumosa, vesícula biliar distendida ou congestão cerebral. O baço

desempenha um importante papel no desenvolvimento e manutenção da imunidade retirando os eritrócitos da circulação o que justifica sua necropsia para análise do grau de anemia (VIDOTTO 1999).

Animais cronicamente infectados apresentam difícil diagnóstico direto, assim, é necessário uso de técnicas mais acuradas, métodos de diagnósticos que apresentem altos níveis de sensibilidade e especificidade utilizando técnicas laboratoriais (KOCAN et al. 2010, AUBRY e GEALE, 2011).

### 2.3.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser direto ou indireto, a escolha do qual método usar é baseado na necessidade da pesquisa de acordo com a facilidade na obtenção dos reagentes, infraestrutura e capacidade técnica do laboratório e da especificidade e sensibilidade do método utilizado.

**Diagnóstico direto:** São usadas técnicas como esfregaço sanguíneo (corados pelo Método de Giemsa) é a mais utilizada nos casos de parasitemia aguda, e testes sorológicos são mais eficientes para casos crônicos de acordo com Vidotto e Marana (1999). Técnicas como sondas de DNA e PCR (Reação em cadeia da Polimerase) são utilizadas para detecção de antígenos devido à alta sensibilidade e especificidade e em baixa parasitemia.

**Diagnóstico indireto:** Estudos pioneiros (KLAUS e JONES, 1968) afirmam que o diagnóstico indireto se aplica a estudos com anticorpos e levantamentos epidemiológicos, ajudando a analisar o estado dos animais portadores e consequentemente o melhor controle da *Rickettsia*. Alguns testes são considerados os mais utilizados dentre eles podemos destacar: aglutinação, ensaio imunoenzimático (ELISA), Imunofluorescência Indireta, e cELISA (Ensaio imunoenzimático por competição). Este tipo de diagnóstico é empregado para pesquisas com anticorpos anti *A. marginale*, detectando o grau de proteção do rebanho e ajudando no controle de enfermidade.

## 2.4 Controle e Tratamento

Desde que a doença foi descoberta, formas variáveis de combate são exigidas de acordo com a região geográfica em que a doença se manifesta. O controle de artrópodes com aplicação de carrapaticidas, vacinação e aplicação de antibióticos apresentam resultados razoáveis (KOCAN, 2010).

A quimioprofilaxia consiste na aplicação de antibióticos como as tetraciclina e oxitetraciclina, na identificação da doença recomenda-se um diagnóstico principalmente do agente etiológico utilizando o exame do esfregaço sanguíneo. Medicamentos antibacterianos podem ser administrados em animais aos 30 dias de idade com 2 a 4 aplicações de tetraciclina em intervalos de 21 dias (GONÇALVES, 2000).

Para Kocan et al. (2000) o uso de antibióticos como tetraciclina é amenizador da doença combatendo os sintomas causados pela *rickettsia*, porém não age imunizando o animal de forma a evitar novas infecções. Comumente, o uso de antibióticos de forma exagerada gera riscos de resistência de estirpes de micro-organismos.

O uso de dipropionato de imidocarb é empregado quando não se consegue identificar o nível da doença, quando os sinais clínicos não são evidentes e o agente transmissor também não é identificado, em tais situações a transmissão pode ocorrer através de protozoário, que causa Babesiose, ou pela *Rickettsia* que causa anaplasmoze (MAPA, 2001).

Quando o tratamento é realizado corretamente, antes do aparecimento dos sintomas graves como elevados graus de anemia, há uma considerável recuperação no quadro clínico, conseqüentemente a ineficácia do tratamento nessa fase agrava o quadro sintomatológico, sendo necessário medidas extremas como transfusão de sangue caso o animal não venha a óbito (MAPA, 2001).

As vacinas encontradas comercialmente têm sido uma das medidas profiláticas não tão eficazes, mas comumente usada, utilizam organismos vivos e mortos como preparado (KOCAN e al. 2010). Tais vacinas contêm cepas atenuadas da *Rickettsia* (avaliadas como vacinas vivas) contra anaplasmoze em bovinos, não imunizam o animal apenas amenizam contra o estágio momentâneo da doença e não impedem que novas infecções sejam obtidas (KOCAN, 2003).

Vacinas veterinárias assumem um papel importante na sociedade visto que desempenham o papel de elevar a saúde animal e o bem estar animal e contribuem para a saúde pública além da produção de alimentos considerando que os animais domésticos compõem a principal proteína animal na alimentação humana como é o caso dos bovinos (ROTH, 2011).

Atualmente, as proteínas de membrana externa do patógeno, as MSPs (MSP1 – MSP5), estão ganhando destaque na composição dos imunógenos de proteção como candidatos promissores a vacinas eficazes de combate à doença e imunização ao animal (LOPEZ et al. 2007; ARAUJO et al. 2008).

## **2.5 A importância das proteínas de superfície de *Anaplasma marginale***

As proteínas de superfície (MSP) encontradas na membrana externa de *A. marginale* são capazes de induzir resposta imunológica protetora contra desafios homólogos e heterólogos. São importantes na imunização contra a doença, tem sido caracterizada em estudos com eritrócitos de bovinos infectados pela *Rickettsia* (TEBELE e PALMER, 1991).

A diversidade genética de *A. marginale* tem sido caracterizada usando as MSPs onde os genes estão envolvidos na interação hospedeiro e vetor. Essa interação deve-se a evolução dos genes por pressões exercidas da resposta imune do hospedeiro (DE LA FUENTE et al. 2005).

Junior et al. (2010) descrevem que as proteínas de superfície nas membranas dos patógenos de *A. marginale* são potenciais candidatos para o desenvolvimento de vacinas alcançando a resposta imune protetora nos hospedeiros.

São encontradas em *A. marginale* seis tipos de proteínas de superfície, segundo Araújo et al. (2003), que tem sido o foco dos estudos para o desenvolvimento de vacinas. A MSP 1 (denominada de MPS1a e MSP1b), MSP2, MSP 3, MSP 4 e MSP 5. Entender as particularidades dessas proteínas é de fundamental importância para a produção de vacinas recombinantes que auxiliem no combate a doenças como anaplasmose.

**MSP 1** - Tem sido extensivamente estudada, é um complexo de dois polipeptídios ligando covalentemente MSP1a e MSP1b com massas moleculares de 100 e 105 kDa respectivamente. Uma das grandes funções da MSP1 é de adesina relatadas por McGarey et al. (1994) que se liga ao eritrócito do hospedeiro.

MSP1a é codificada pelo gene *mSP1 a* que está diretamente relacionado com as interações patógeno-hospedeiro (DE LA FUENTE et al. 2005). Estudos comprovam que está relacionada à adesão, à infecção e à transmissão do organismo e também contribui para a imunidade (MCGAREY, 1994; DE LA FUENTE, 2005a; DE LA FUENTE, 2005b). Possui uma variação de tamanho em diferentes isolados de *A. marginale* que compreende um intervalo de 46 a 105 kDa (Kilodalton) de acordo com isolados de MSP1a encontrados no Brasil segundo Kano et al. (2002) o que justifica um número variável de blocos repetitivos de 28 a 29 aminoácidos ricos em serina na região N- terminal (OBERLE et al. 1988), a qual é alvo de reconhecimento de anticorpos monoclonais: ANA22B1 e ANA15D2 (MCGUIRE et al. 1984; ALLRED et al. 1990). Kocan et al. (2003) e De La Fuente et al. (2003) justificam que a porção de MSP1a seja uma eficiente adesina as células dos eritrócitos bovino devido as repetições in tandem.



MSP1b é codificada por família multigênica de 100 kDa onde estudos realizados na Flórida demonstraram que há uma divisão desta proteína em MSP1b1 e MSP1b2 (DE LA FUENTE et al. 2001; BOWIE et al. 2002), que são codificadas por dois genes. Apresentam um polimorfismo mínimo de isolados 3 kDa que consideram que sejam mosaicos (OBERLE et al. 1988). Os polipeptídios de MSP1b apresentam uma sequência conservada de 5 blocos o que pode demonstrar uma pequena variação de cópias segundo McGarey et al. (1994).

**MSP 2** - é codificada por família de genes polimórficos, conhecida como uma proteína imunodominante de superfície, suas ligações carregam pontes dissulfeto (VIDOTTO et al. 1994). Nas espécies de *Anaplasma ssp.* a estrutura de MSP2 é bem semelhante e pode ser justificada pela proteção cruzada induzida por *A. centrale* (DE LA FUENTE et al. 2001; KOCAN et al. 2001).

**MSP 3** - conhecida como proteína imunodominante em infecções naturais e experimentais também codificada por uma família multigênica com tamanho de aproximadamente 36 kDa. Estudos pioneiros de Alleman et al. (1997) mostraram que essa proteína pode codificar blocos de aminoácidos que estejam relacionados com a família multigênica MSP2.

**MSP 4** - é codificada por gene de cópia única com tamanho de 31 kDa. É encontrada na membrana externa e interna das Rickettsias de *A. marginale* (OBERLE et al. 1993).

**MSP 5** - Assim como a MSP1 tem sido alvo dos estudos, com tamanho de aproximadamente 19 kDa sendo considerada uma proteína altamente conservada apresenta-se na forma monomérica, contendo pontes dissulfeto intramoleculares e intermoleculares (TEBELE e PALMER 1991).

Tais proteínas encontram-se expostas na superfície da Rickettsia sendo facilmente identificadas pelo sistema imunológico do hospedeiro.

A importância das proteínas de superfície foi analisada por estudos pioneiros de Palmer e McGuire (1984), que verificavam a neutralização da infectividade da Rickettsia por soro contra corpúsculos iniciais (CI), tais corpúsculos em preparações de *A. marginale* apresentaram resposta imune protetora em bovinos contra desafios homólogos e heterólogos em baixas riquettsemias e anemia branda quando comparados com animais não imunizados (PALMER, 1994), dessa forma proteínas de superfície estão altamente envolvidas na indução de resposta imune.

Alguns estudos correlacionam as MSPs justificando suas vantagens e usos em pesquisa na busca de resposta imune. As proteínas MSP1 têm como predominante classe de anticorpo empregado IgG que são reconhecidas na região carboxiterminal (C) e não região N terminal (BROWN et al, 2001). Nas MSP 5 o epítipo imunodominante é reconhecido por um

anticorpo monoclonal ANAF16C1 que requer as regiões C e N terminais indicando por sua natureza conformacional (MUNODZANA et al, 1998).

As características dessas proteínas conferem grande relevância para estudos com imunização visto que apresentam sensibilidade e especificidade. Animais imunizados com MSP1 reagem com resposta imune humoral satisfatória.

## 2.6 Vacinas recombinantes

A resposta imune em bovinos para combater a *Rickettsia* que transmite Anaplasmosose tem sido estudada. Com os avanços nos estudos das proteínas de superfície é possível induzir resposta imune protetora nos animais (ALMAZÁN et al. 2012; PALACIOS et al. 2014).

Dentre as MSPs com maior destaque nas pesquisas que respondem imunogenicamente, a MSP1a apresenta maior importância visto que seus epítomos estão presentes na sequência carboxiterminal em seus isolados, uma característica fundamental para vacinas recombinantes (DE LA FUENTE et al. 2001; BOWIE et al. 2002). Tanto MSP1a e MSP1b podem estimular e auxiliar nas respostas efetoras dos linfócitos T.

Outra proteína em evidência como promissora para vacinas recombinantes é a MSP2, segundo French et al. (1998) e Brown et al. (2001), tal proteína apresenta uma variação dentre os ciclos da riquetssemia e possui epítomos do tipo Th para sequências isoladas de *A. marginale*. Durante a rickettsemia aguda reage alguns ensaios demonstraram que a imunidade primária como resposta diminuindo a infecção (PALMER e MCGUIRE, 1984).

As demais MSPs (MSP 3, MSP 4 e MSP5) apesar de suas características marcantes não possuem grande potencial como vacinas recombinantes, visto que na grande maioria dos estudos, tais proteínas, apresentaram características como promissoras para diagnóstico (MUNODZANA et al. 1998; REYNA-BELLO et al. 1998; BROWN et al. 2001). Para Molad et al. (2006) e De la Fuente et al. (2005) MSP4 e MSP5 podem ser utilizadas para mimetizar a proteção induzida pela vacina viva de *A. marginale* e *centrale*.

Os estudos com imunização contra Anaplasmosose estão focados na obtenção de frações antigênicas, dessa forma, animais imunizados com MSPs nativas ou recombinantes apresentam baixos índices de anemia e Rickettsemia (DE LA FUENTE et al 2005).

A identificação das MSPs e análises das sequências genômicas, tornaram-se de fundamental importância para o avanço das pesquisas no uso como candidatos vacinas contra Anaplasmosose (NOH et al. 2008).

## 2.7 Epítomos como candidatos Vacinais

Com o avanço da Proteômica, tornou-se possível os estudos com epítomos, que são considerados determinantes antigênicos derivados de aminoácidos protéicos de um antígeno com a função de interagir com receptores de células B, as imunoglobulinas, ou receptores de células T, ativando assim, resposta imune (DE GROOT, 2006).

As células T e B tem a capacidade de reconhecer antígenos com características distintas. As células T reconhecem antígenos associados à membrana de superfície do complexo de histocompatibilidade principal conhecido como MHC, enquanto as células B reconhecem antígenos livres (MENDEL, 1996).

Uma das principais funções das células B é produzir e secretar anticorpos em resposta à ação do patógeno, o reconhecimento dessa interação ocorre a nível molecular de acordo com a complementaridade entre a região de ligação do receptor e uma porção do antígeno reconhecido como epítopo, essa interação ocorre não-covalentemente o que garante a especificidade.

Nas células T, o receptor, comparado com os receptores de células B possuem diferenças estruturais, os receptores de células T reconhecem epítomos de antígenos sob a forma de peptídeos ligados a molécula de superfície, o MHC.

Os epítomos são classificados como contínuos (possuem sequência contínua) e descontínuos (é conformacional, compostos de vários fragmentos dispersos ao longo da sequência da proteína) conforme descreve HUANG e HONDA (2006). A grande maioria dos epítomos apresenta-se na forma descontínua, sua identificação é importante para compreender e reconhecer a proteína analisada, que são uteis em diagnóstico de doenças e formulação de vacinas.

Uma vacina é considerada efetiva quando consegue desencadear uma forte resposta de células B e T, dessa forma, é importante a escolha e o mapeamento dos peptídeos que contenham potencial vacinal (DE GROOT, 2006).

Sette e Fikes (2003) consideram que a identificação dos epítomos adequados utilizados em diagnóstico ou intervenção terapêutica ou profilática é um fator importante para vacinas a base de epítomos.

Epítomos funcionais de MSP1a baseados nos estudos de Santos et al. (2013) foram capazes de induzir respostas imunes e humorais em ratos confirmando assim que vacinas a base de epítomos são possíveis e mais estudos precisam ser elaborados. A detecção de anticorpos baseia-se na totalidade dos antígenos com seus múltiplos epítomos de forma a apresentar sensibilidade e especificidade.

Kawasaki et al. (2007) demonstram que as proteínas de superfície de MSP4 possuem um potencial de imunogênico contra anaplasmoze, mas pouco se sabe sobre sua estrutura e função além de sua indução as respostas imunitárias protetoras. Nesse estudo, percebeu que existem epítomos conservados e sugeriu a utilização de subunidades para o desenvolvimento de vacinas.

Assim, além das vacinas que utilizam antígenos de agentes infecciosos em sua composição, outras formas de combate a doenças por meio de vacinas têm sido estudadas como as vacinas oriundas da Tecnologia do DNA Recombinante (KANO et al. 2007).

### **1.8 Vacinas produzidas a partir de Tecnologia de DNA Recombinante**

Vacina é uma das formas mais eficientes e menos dispendiosa de combate a doenças infecciosas e, apesar de seus grandes benefícios, ainda existem doenças que não possuem vacinas para o seu combate tanto para animais como humanos (KANO et al. 2007).

O surgimento de novas tecnologias para elaboração de vacinas sintéticas tem tomado impulso ao longo dos anos com as chamadas vacinas de DNA recombinante (AUBRY e GEALE, 2011).

O avanço da biologia molecular trouxe novas estratégias para obtenção e produção de antígenos, otimizando assim, novas maneiras de apresentar os antígenos ao sistema imune desenvolvendo vacinas mais seguras e eficazes, consideradas vacinas de segunda geração, vacinas que utilizam antígenos purificados provenientes de fontes naturais ou sintéticas (RODRIGUES, et al. 2004).

As vacinas de terceira geração são vacinas gênicas com introdução de genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos imunogênicos em DNA plasmidial. Esse tipo de vacina sintética foi descrito em 1990, quando no músculo de camundongos o plasmídeo que continha o gene repórter que codifica galactosidase expressou a proteína por inoculação indireta (RODRIGUES, et al. 2004).

O resultado satisfatório da imunização com DNA depende de alguns fatores como: natureza dos antígenos, concentração do DNA administrado, ligação no ponto específico do antígeno codificado pelo plasmídeo, além da idade e saúde do animal e da espécie dos animais vacinados de acordo com Rainczuk et al. (2003) e Morel et. al. (2004).

Uma das grandes vantagens de vacinas veterinárias está na redução do uso de antibiótico, o uso extensivo desses medicamentos tem causado preocupações devido à resistência das bactérias, quando administrados aleatoriamente para combater as infecções em

animais de companhia e de produção como bovinos, ovelhas, caprinos, suínos entre outros (SINGER et al. 2003). Outra vantagem é o baixo custo de produção comparada com as já existentes comercialmente.

Com a utilização da Tecnologia do DNA Recombinante é possível induzir a produção de anticorpos e a resposta imune protetora humoral e celular estimulando linfócitos T CD4<sup>+</sup> e também T CD8<sup>+</sup> (NAGATA et al. 2004). Permite modificações nas sequencias gênicas com objetivo de melhorar a resposta imunológica do hospedeiro (RAIN CZUK et al. 2003; ZHENG et al. 2005).

Alguns fatores podem influenciar na resposta imune tais como: tipo de patógeno, espécie animal, vias de infecção ou imunização, formulação da vacina e forma do antígeno (MOREL et al. 2004; NAGATA et al. 2004; KANO et al. 2007).

Para isso, há a necessidade e utilização de adjuvantes que tem como função aumentar a imunogenicidade do antígeno, vacinas com DNA apresentam CpGs imunoestimuladoras e receptor Toll Like (TLR)-9 dependente da resposta imunológica inata que contribuem para eficácia da vacina conforme descreve Ulmer et al. (2006).

Vacinas de DNA podem ser administradas utilizando-se inoculação direta do plasmídeo pelas vias: intrabursal, intraorbital, intravenosa, intratraqueal, intradérmica, intramuscular, oral e subcutânea, as quais apresentaram bons resultados de indução da resposta imune (CONG et al. 2005; LI et al. 2006).

Ao longo dos anos outras formas de combate vêm sendo estudadas, sendo estas vacinas que utilizem proteínas de superfície da cepa de *A. marginale*, capazes de induzir resposta imune protetora com uso de imunógenos (TOBELE et al. 1991). Tais proteínas tem sido o alvo para nova geração de vacinas utilizando técnicas moleculares como forma de impedir a infecção no rebanho e interferir na capacidade vetorial do carrapato.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Expressar uma combinação de epítomos da MSP1a de *Anaplasma marginale* em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Clonar e expressar epítomos de MSP1 $\alpha$  de *Anaplasma marginale* em *E. coli* e *B. subtilis*.
- Analisar o reconhecimento de soros de animais infectados com *A. marginale* com os epítomos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Geral de Biodiversidade do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ /AM. Inserido num projeto maior que tem por objetivo a elaboração de uma vacina contra Anaplasmosse bovina. Este estudo teve a finalidade de selecionar as regiões imunogênicas da proteína MSP1 $\alpha$  de *Anaplasma marginale* e construir uma quimera recombinante contendo esses epítomos, assim como, a validação do mesmo.

### 4.1 Cepas e Vetores

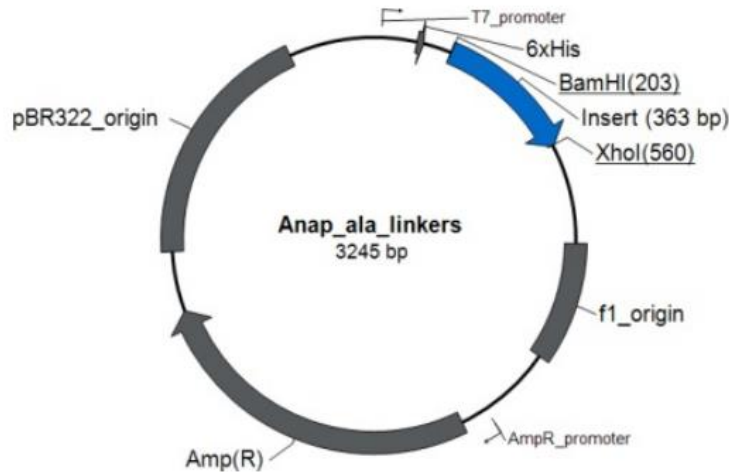
Para construção da proteína recombinante MSP1 $\alpha$  foram utilizados os hospedeiros *Escherichia coli* (cepas TOP 10 e BL 21) e *Bacillus subtilis* cepa (WW02). E os plasmídeos pGEM®-T Easy Vector Systems como vetor de clonagem e pHT 43 e pRSETA como vetor de expressão.

### 4.2 Desenho de gene sintético

A seleção dos epítomos de MSP1 $\alpha$  de *A. marginale* foi realizada em trabalhos anteriores realizados por nossa equipe através dos programas IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/tutorial.jsp>) e Center for Biological Sequence Analysis CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Estes programas predizem a localização dos epítomos lineares de células B, hidrofobicidade e acessibilidade destas sequências. Além disso, um grande levantamento bibliográfico foi realizado em bancos de artigos e patentes nacionais e internacionais através da ferramenta “Derwent innovation”.

Assim, duas quimeras (associação de epítomos em uma mesma sequência) foram desenhada contendo quatro epítomos de *A. marginale*. A primeira continha uma cauda de polihistidina, (cauda poli A) sendo os epítomos separados por sítios de restrição (sendo sintetizada pela empresa IDT na forma de “gblock”, não clonada em vetor plasmidial) a essa quimera denominamos **q1ANAP-pHT43**. Na segunda, os mesmos epítomos foram separados por “linkers” de alanina e comprada clonada em vetor pRSET A (Invitrogen) a qual denominamos **q2ANAP-pRSET**. Segundo Ávila (2011), a adição desse “Linker” (ALA-Linker) proporciona maior mobilidade ao gene o que facilita a expressão da proteína, visto que

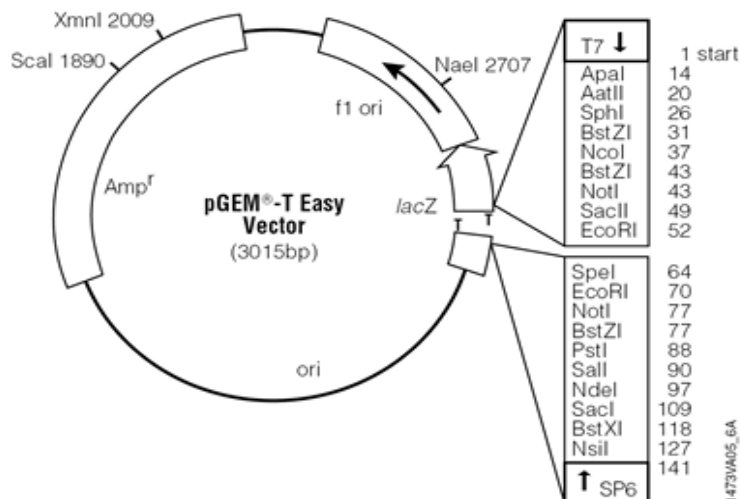
Alanina é considerado um aminoácido não reativo e por seu grupo metila, servindo como um excelente espaçador de acordo com a figura 3.



**Figura 3** – Esquema pRSET A com inserção do gene MSP e o aminoácido Alanina\_Linkers.

#### 4.3 Ligação em *pGEM®-T Easy Vector Systems*

A ligação foi realizada seguindo as instruções do fabricante (IDT, para adenilação do gene sintético, e Promega) para um volume final de 10µl. Para isso, foram utilizados: 5µl tampão 2x T4 DNA ligase, 1µl de *pGEM®-T Easy Vector Systems*, 3µl de inserto, 1µl de enzima de ligação T4 ligase. Em seguida, o sistema de ligação foi encubado no termociclador a 16° C por uma noite e, no dia seguinte, foi realizada a transformação. O mapa do vetor de clonagem pode ser visualizado na Figura 4. Após a ligação foi realizada a transformação utilizando a célula hospedeira bacteriana *E.coli* TOP 10.



**Figura 4** -Vetor de clonagem para inserto de Anaplasma marginale.



#### 4.4 Transformação em TOP 10

O processo de transformação bacteriana realizou-se por eletroporação em *E.coli*, cepa TOP 10. A transformação foi possível, adicionando à cubeta de 0,2 cm de espessura delicadamente, para evitar criar bolhas, 10µl da alíquota do sistema de ligação (seção anterior) e 50µl da célula competente TOP 10 e levada ao eletroporador para ser submetida ao choque elétrico de 1900 volts. Imediatamente, após o choque elétrico a célula com sistema de ligação foram ressuspensa em 450µl de meio SOB e incubadas a 37°C por 1 hora, sob agitação constante.

Por conseguinte, foi realizado o plaqueamento adicionando 200µl do transformado em placas de Petri contendo meio LB Agar (antibiótico Ampicilina, 0,2 % a concentração de X-Gal, IPTG) e incubadas a 37° C em estufa por 16 horas. Os clones transformados com o plasmídeo são identificados por meio visual das colônias brancas, que demonstram resistência ao antibiótico, e as colônias em azuis são as que não apresentam o plasmídeo com o inserto. Após identificação das células de interesse (células brancas), ou seja, células transformantes, foi feito o procedimento de extração plasmidial.

##### 4.5.1 Extração plasmidial com *kit QIAprep® Miniprep Handbook*

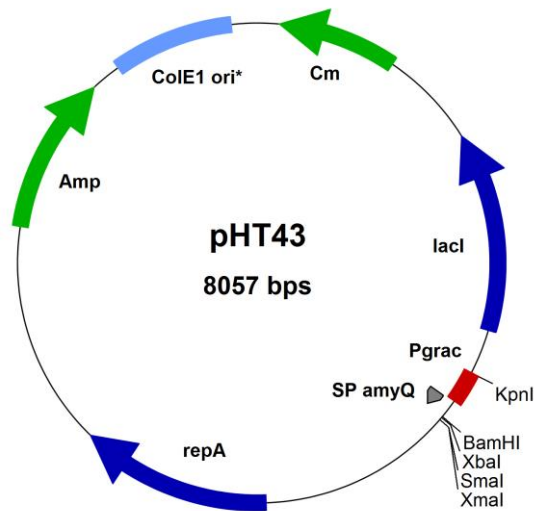
As colônias brancas (transformantes) foram inoculadas em 3ml de meio LB contendo Ampicilina, o inóculo foi aliquoteado em microtubo sendo centrifugado 14.000 rpm por 5 minutos e descartado o líquido extraído a partir do *pellet*.

Para extração Plasmidial utilizamos o *kit QIAprep® Miniprep Handbook* de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante descrito em ANEXO.

O sucesso dessa etapa de extração plasmidial foi confirmada por técnicas eletroforéticas em gel de agarose 1% a 100 volts. Para confirmar a ligação do inserto no vetor foi realizada a digestão utilizando a enzima *EcoRI* Invitrogen™ para posterior subclonagem.

#### 4.6 Subclonagem em pHT43

Com a confirmação com gel de agarose a ligação em *pGEM®-T Easy Vector Systems* deu-se início a etapa de subclonagem no vetor de expressão pHT43, Figura 5. O vetor foi digerido do vetor de clonagem com as enzimas *BamHI* e *SmaI*, assim como o vetor de expressão pHT43 (Figura 5) com as mesmas enzimas.



**Figura 5** - Mapa vetor de expressão pHT43.

As bandas digeridas do inserto e do plasmídeo foram retiradas do gel e purificadas pelo *kit QIAGEN® Plasmid Gel Purification Handbook* em Anexo, em seguida realizada a ligação. A ligação realizou-se na proporção 1:3 (vetor/inserto) com o objetivo de unir as extremidades coesivas. Para o sistema de ligação do inserto com o plasmídeo PHT43 foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®), seguindo as orientações do fabricante.

#### 4.6.1 Transformação e crescimento em células de *E.coli* cepa BL 21

O produto resultante da ligação (fragmento Anap + vetor pHT 43) foi utilizado 1µl em microtubo contendo 50µl de células competentes de *E.coli* cepa BL 21 e encubadas em gelo por 5 minutos. Em seguida, o volume total foi adicionado a cubeta de eletroporação para choque térmico a 1.900 V. Após choque adicionou-se ao conteúdo 450 µl de LB+ (contendo glicose 0,4% e MgCl<sub>2</sub> 20 mM final) para crescimento por 1 hora a 37° C sob agitação constante. Com o sucesso da subclonagem do fragmento ao vetor de expressão, as colônias foram selecionadas e analisadas por sequenciamento. O plasmídeo pRSETA com a sequência do gene sofreu a transformação aconteceu sob as mesmas condições que o pHT43.

Após o crescimento, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina. Logo, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 12 horas.

As colônias recombinantes, que apresentaram resistência a ampicilina, foram escolhidas aleatoriamente, repicadas organizadamente em uma segunda placa de LB Agar com Ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 h.

#### 4.6.2 Transformação e crescimento em células de *Bacillus subtilis* cepa WW02

Foi preparado 200 mL de meio LB e autoclavado. Após o esfriamento do meio, foi adicionado o antibiótico cloranfenicol (34mg/mL), e distribuído em placas.

Também foi preparado o meio LS para um volume final de 30 mL e dividido em alíquotas de 10 mL para tubos falcons estéreis. Esperou-se descongelar as alíquotas de 1 mL (T1, T2 e T3 com intervalos de 4 em 4 horas) armazenadas a -80°C, e foi inoculado 500 µL de cada cultura em meio LS. As alíquotas de 10 mL foram submetidas a um banho-maria a 30°C por cerca de duas horas para obtenção da competência das células. Após a incubação foi retirado uma alíquota de cada amostra de 1 mL (T1, T2 e T3) para microtubos em duplicata e foi adicionado em cada alíquota 10 µL de EGTA (0,1 M) e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação foi adicionado 10 µL do plasmídeo pHT43 (concentração de 122 ng/µL) e 30 µL em cada amostra T1, T2 e T3. Foram realizados os controles positivo (isento de DNA) e controle negativo (somente o plasmídeo e 1 mL da cultura de cada tempo juntamente com 10 µL de EGTA). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4.000 rpm a 20°C.

Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados e utilizou-se o *pellet*. O *pellet* foi ressuspendido e adicionado nas placas de Petri contendo meio LB com antibiótico cloranfenicol (34µg/mL). Para a homogeneização do inóculo na placa de Petri, foram utilizadas pequenas esferas de vidro. Após o espalhamento, as placas foram incubadas e invertidas a 37°C durante a noite.

#### 4.6.2 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado para o conhecimento da sequência de bases nitrogenadas correspondente ao gene em questão. O sequenciamento das amostras (plasmídeo com o inserto das sequencias codificadas do gene) pela Plataforma de Sequenciamento da FIOCRUZ/AM. Para esta reação, utilizou-se o oligo universal T7 e um analisador genético Abi 3100 (*Applied Biosystems*).

A análise do sequenciamento foi realizada por Bioinformática utilizando as ferramentas disponíveis *online* BLASTp (NCBI) e PROTPARAM (Expasy).

## 4.7 Cultivo e Indução com IPTG

### 4.7.1 Em *E.coli*

As colônias transformadas foram cultivadas em 3 ml de LB contendo o antibiótico, ampicilina (100µl/mL) por 16 horas a 37 °C sob agitação constante.

Após o crescimento das colônias, foi adicionado 1,5mL deste pré-inóculo em 200 mL de meio LB para o cultivo de ambos os hospedeiros contendo os respectivos antibióticos. Posteriormente, foi incubado a 37 °C sob agitação constante até atingir uma absorbância de  $A_{600} = 0.6$  D.O. Ao esse crescido foi adicionado o reagente indutor IPTG na concentração final de 1mM. Antes do crescido foi retirado uma alíquota considerada T0 como parâmetro para o crescimento nas demais alíquotas coletadas.

Após a adição do indutor IPTG o conteúdo foi incubado a 37 °C sob agitação constante, três horas depois foi coletado uma alíquota de 50 mL, considerada T1 do crescido e centrifugado a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Seis horas após iniciada a indução foi coletada outra alíquota de 100mL do crescido e centrifugado a 4.000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C, esta alíquota foi considerada T2 e uma última alíquota de 1mL foi coletada no dia seguinte a indução, também centrifugada sob as mesmas condições das coletas anteriores. Todos os sobrenadantes resultantes da centrifugação em *E. coli* foram descartados.

### 4.7.2 Em *Bacillus subtilis*

As colônias transformadas foram cultivadas em 3 ml de LB contendo o antibiótico, clorofenicol (34µg/mL) por 16 horas a 37 °C sob agitação constante.

Após o crescimento das colônias, foi adicionado 1,5mL deste pré-inóculo em 200 mL de meio LB para o cultivo de ambas as hospedeiras contendo os clorafenicol. Posteriormente, foi incubado a 37 °C sob agitação constante até atingir uma absorbância de  $A_{600} = 0.7 - 0.8$  D.O. A esse crescido foi adicionado reagente indutor IPTG na concentração final de 1mM e foi retirada uma alíquota de 10 mL da cultura que foi identificada como T0, após 3 horas de indução foi coletado outra alíquota de 50 mL e identificada como T1. Outra alíquota como T2 em 6 horas de indução e a última alíquota como T3 sob o cultivo overnight (no dia seguinte após a indução).

As alíquotas T0, T1, T2 e T3 foram centrifugadas por 20 min a 4000 x g a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado do pellet e tanto sobrenadante quanto o pellet

foram armazenados conforme descritos pelo fabricante Mobitec em Anexo. Todo o sobrenadante resultante da centrifugação após indução foram armazenados.

#### 4.7.3 Extração da proteína por lise celular - sonicação

Os sedimentos bacterianos induzidos após centrifugação foram sonicados em tubos para centrifugação tipo falcons de 50 mL com solução MCAC-O composto por PMSF (inibidor de protease), cloreto de sódio, glicerol, Tris pH 7,9 e água MiliQ (ultra pura). Para cada 50 mL de centrifugados foram utilizados 2,5 da solução MCAC-O, descritos em Anexo B.

Os lisados foram sonicados com pulsos de 20, 40, 60, 80 e 100 potência por 30 segundos de sonicação com 30 segundos de intervalo, sendo duas vezes para cada pulso. Os sonicados foram centrifugados a 14000 x g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram reservados e separados dos pellets para preparação das amostras em corrida de gel de poliacrilamida e purificação.

### 4.8 Análise e confirmação da proteína MSP1 $\alpha$

#### 4.8.1 Gel de Poliacrilamida

A proteína recombinante foi analisada por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (running gel) e 5% (stacking gel) contendo acrilamida/bisacrilamida, Tris 1M Ph 8.8, persulfato de amônia a 10% (APS); duodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 6 $\mu$ l de Temed e água MiliQ para compor um volume final de 15 ml conforme recomendações do Maniatis e colaboradores (1989).

As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de corrida, para o tampão de corrida os componentes são Tris 0,01M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4% e em seguida, após adição das amostras (pellet e sobrenadante ao tampão e corrida) foram desnaturadas por aquecimento á 95°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 94V até a coloração do azul de bromofenol alcance a extremidade inferior do gel.

Ao término da corrida de gel de poliacrilamida, o gel foi retirado e mergulhado em solução *Comassie* (contendo metanol 30%, ácido acético 10%, Comassie Blue 0,5% e Água 59,5%) por aproximadamente 3 horas para fixação (corar) da proteína. Coradas as proteínas foram submetidas a solução descorante, com todas os reagentes já citados exceto *Comassie*.

#### 4.8.2 Western blot

A técnica de *Western blot* (TOWBIN et al. 1979) é empregada para confirmação da presença da cauda de poli-histina de forma a separar as proteínas por eletroforese SDS – PAGE 15%, posteriormente transferidas por eletroforese para a membrana de nitrocelulose e em seguida, absorto em tampão (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, pH 8.5 e metanol 20%). Em cuba específica para eletrotransferência (*Semidry system*, Bio-rad, Hercules, USA) foi colocado o sistema (gel + membrana PVDF - Difluoreto e Polivinilideno) durante 1 hora submetidos a voltagem de 12 V. As membranas de PVDF são eficientes para transferência de proteínas com uma ampla variedade de peso molecular (5kDa a 700kDa).

Após a retirada do sistema a membrana será mantida no mesmo tampão de transferência até a revelação. Para revelação será utilizado o *kit* comercial *Western breeze* (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante em Anexo.

#### 4.8.2 Purificação da proteína recombinante

A proteína foi purificada através da técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC), desenvolvida por Porath e colaboradores em 1976. Para este estudo utilizou-se a coluna de purificação contendo íons Ni<sup>2+</sup> (*Qiagen*®) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. A retenção da proteína MSP-1, foi testada em várias concentrações de imidazol, em duplicata.

O processo de sonicação resultou na separação de pellets e sobrenadantes de todos os tempos de indução (T0, T1, T2 e T3) tanto de *Bacillus subtilis* como de *E.coli*, foram centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm purificados a 4° C e conseqüentemente, o sobrenadante purificado por coluna contendo a resina Ni-NTA Agarose (*Qiagen*®) equilibrada com 5 volumes de MCAC-O (contendo glicerol, Tris pH 7.9, cloreto de sódio e inibidor de protease PMSF) e cinco volumes de água ultra pura (MiliQ) para equilibrar a coluna.

Após equilibrar a coluna foi adicionado a coluna o sobrenadante da lise bacteriana contendo a proteína (de 1mL em 1mL), com todo o volume de sobrenadante passado pela coluna, iniciou-se a verificação da retenção da proteína na coluna através das diferentes concentrações de Imidazol (20Mm; 40Mm; 60Mm; 80Mm). Os tampões de eluições foram adicionados duas vezes de 500µL (E1 e E2) com concentrações crescentes de Imidazol. As eluições foram armazenadas a -20° C, e as que apresentaram melhor concentração

quantificadas testadas por Bradford (1976) da proteína analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%, como descrito no tópico 4.8.1.

Para retirada do excesso de Imidazol e outros reagentes as proteínas purificadas foram submetidas a diálise em membranas de 0,2 mm imersos em béquer contendo PBS (tampão fosfato salino) 0,1X a 4° C até o dia seguinte.

#### 4.8.3 Liofilização da proteína recombinante

A proteína dialisada ao ser retirada da membrana permaneceu por cerca de 7 horas em frascos de vidros a temperatura de -80° C por um período de 18 horas, com o objetivo de concentrar a proteína. No dia seguinte, as amostras foram retiradas da temperatura de -80° C e, imediatamente, colocadas em liofilizador, previamente resfriado, por período de 16 horas. Após esse período as amostras foram ressuspensas em água MilliQ (ultra pura) com a finalidade de deixar a proteína concentrada 10 vezes maior que o inicial e armazenadas a -20° C.

#### 4.8.4 *Immunoblotting*

O ensaio por *Immunoblotting* foi utilizado para verificação da resposta da proteína MSP1 $\alpha$  ao soro de animais infectados. Os soros foram preparados com centrifugação do sangue de animais infectados e não infectados por 30 minutos a 37° C a 4000 x g por 20 minutos, separando assim, o sobrenadante do pellet e armazenados em -20° C para posterior análise.

Para realização do *Blotting* foram seguidas as instruções do fabricante Invitrogen® (“kit *Western Breeze*”) com exceção do anticorpo primário, que utilizou-se o soro dos animais infectados em uma diluição de 1:50 e o anticorpo secundário foi utilizado (marca Sigma A8917) em uma diluição 1:1000. Na revelação do *Blotting* utilizou-se como tampão o substrato DAB (3,3’Diaminobenzine), peróxido de hidrogênio e Solução salina (PBS) 1X. Para analisar a presença da cauda de polihistidina na proteína recombinante, foi utilizado um anticorpo primário monoclonal anti-HisG (Invitrogen), o secundário anti-camundongo e solução reveladora do “kit” citado anteriormente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Seleção dos Epítomos

As predições dos epítomos de células B realizadas neste trabalho selecionou os seguintes epítomos:

Epítomo 1

STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL

Epítomo 2

STSSQLSEASTSSQLGA

Epítomo 3

GSSAVAAGFGGDDTDFYLGFL

Epítomo 4

DIEIPAVAANTFGANYCYDVSTVNMGGLSPDI

A partir destes peptídeos, foram desenhadas as duas quimeras (q1ANAP e q2ANAP) com sequências codificantes para o gene MSP $\alpha$ .

#### Quimera 1 (q1ANAP)

DNA

ggatccgaattcCATCATCACCATCACCATGATGATGACGATAAGtctagagggcccccgcggTCG  
 ACGTCTTCCCAGCTTGGAGGCGGATCTTCAACGTCTAGTCAACTGGGCGGAGGTT  
 CAAGCACTTCATCCCAGCTTaccggtactagtgggcccAGTACGTCCTCACAGCTTAGCGAA  
 GCATCTACCAGTAGTCAGTTAGGCGCGccgcggtcgcgagacgcgtGGAAGCTCCGCTGTTG  
 CCGCTGGCTTCGGGGGCGACGACACGGATTTCTATCTCGGTTTTGTTTTGctcgagact  
 agtGATATCGAAATACCGGCTGTTGCGGCAAACACGTTTCGGAGCCAATTACTGCTA  
 CGATGTCAGCACCGTTAACATGGGAGGCCTGAGCCCGGATATCtaaccggg



### Proteína

GSEFHHHHHHDDDDKSRGPPRSTSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQLTRTSGPSTSSQL  
 S  
 EASTSSQLGAPRLETRGSSAVAAGFGDDTDFYLGFGLETS  
 DIEIPAVAANTFGANY  
 CY  
 DVSTVNMGGLSPDI  
 PG

**Tamanho esperado:** 13.7 kDa

### Quimera 2 (q2ANAP)

#### DNA

aagcttTCGACGTCGAGTCAGTTGGGTGGGGGCAGTAGTACCAGCAGTCAGCTGGGT  
 GGAGGAAGCTCTACGAGTCCCAGCTCgcugcagcugccgcgAGCACGAGTTCGCAGCT  
 GTCGGAAGCGTCCACTAGCAGTCAGCTGGGTGCAgcugcagcugccgcgGGGAGTTCTG  
 CGGTGGCGGCCGGCTTCGGGGGCGATGATACCGATTTCTACTTGGGTTTTGGGTT  
 AgcugcagcugccgcgGACATCGAAATTCCGGCTGTGGCCGCAAACACATTTGGTCAA  
 ATTACTGTTACGATGTAAGTACCGTTAATATGGGAGGCCTTAGTCCAGATATT  
 taag  
 aattcctagag

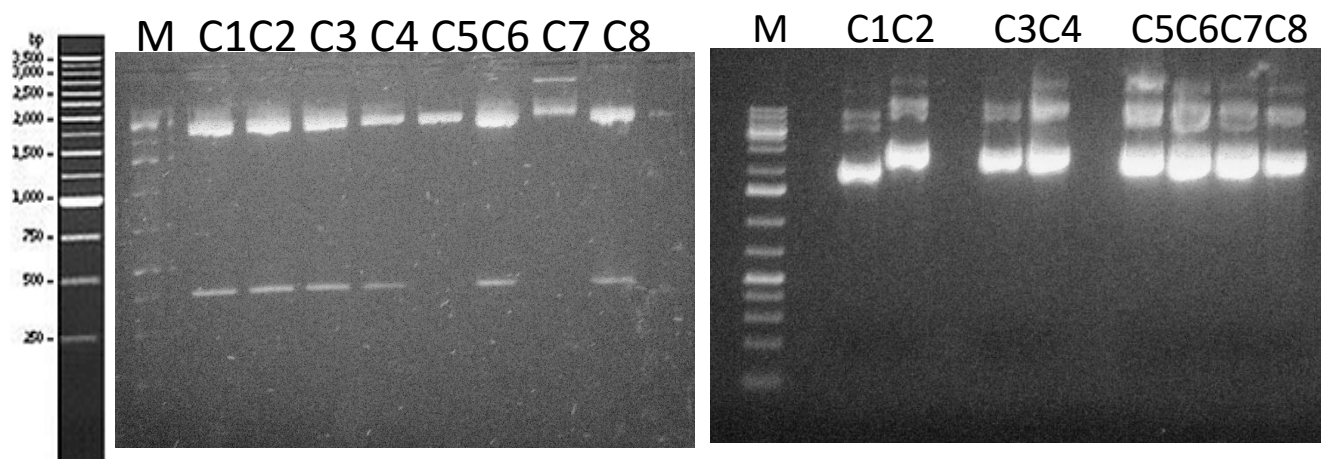
#### Proteína

KLSTSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQLAAAAASTSSQLSEASTSSQLGAAAAAGSS  
 AVAAGFGDDTDFYLGFGLEAAAAADIEIPAVAANTFGANYCYDVSTVNMGGLSPDI  
 EFLE

**Tamanho esperado:** 14.7 kDa

## 5.2 Clonagem da q1ANAP em pHT43

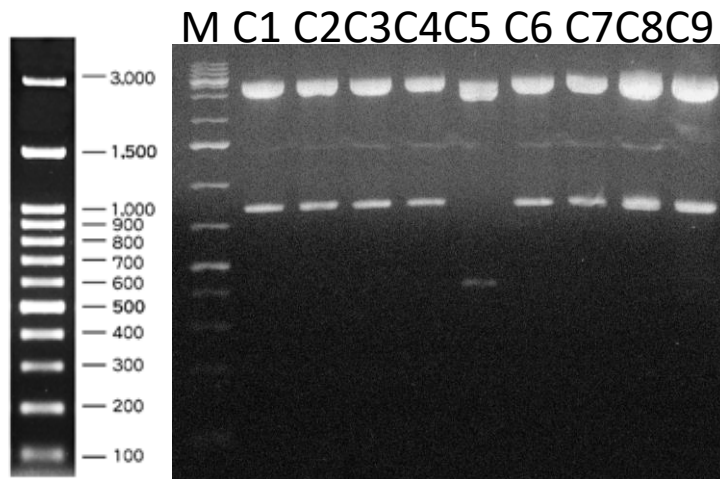
Após a ligação do gene sintético com pGEM e transformação em *E. coli* Top10, as colônias obtidas foram submetidas a uma extração dos plasmídeos, seguida de uma digestão com a enzima de restrição *Eco* RI, de forma a confirmar a ligação. Foi observado que das oitos colônias digeridas, apenas duas não continham o fragmento mostrado na Figura 6.



**Figura 6** - Análise do perfil de extração plasmidial (a esquerda) e digestão com a Enzima Eco RI (a direita), visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8%. M – marcador molecular de 250pb. Apenas digestão do fragmento Anap em 430 pb.

Com a confirmação da digestão e a obtenção do fragmento realizou-se a subclonagem em pHT43, um vetor ideal para hospedeiros como *Bacillus subtilis* e apenas uma colônia continha o fragmento **q1ANAP**. O sucesso da subclonagem foi verificado através de sequenciamento que comprovou a sequência de interesse conforme anexo.

Confirmação da digestão e a obtenção do fragmento realizou-se a subclonagem em vetor pHT43 conforme figura 7.

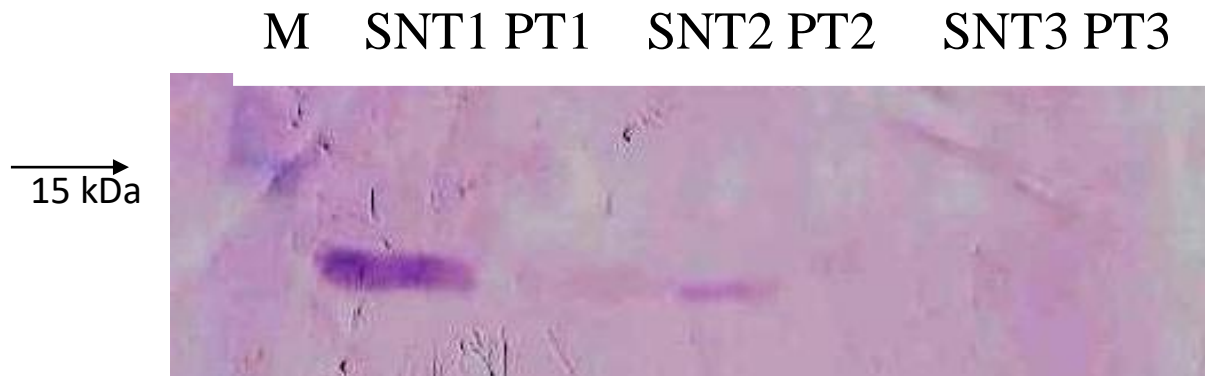


**Figura 7** - Perfil de eletroforese em gel de agarose 1% do fragmento q1ANAP clonado em vetor pHT43.

### 5.3 Indução da q1ANAP-pHT43 em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

A indução ocorreu seguindo três tempos (T1, T2, T3) para ambos os hospedeiros através de gel SDS- PAGE 15% foi possível observar que, após a lise bacteriana para expor a proteína apresentou a melhor condição de indução no T1 (três horas após a adição do indutor), e que é uma proteína solúvel com massa de 13,7 kDa, um valor estimado pelo programa ProtParam (Expasy).

Esses resultados foram confirmados por um *Western Blot* utilizando um anticorpo Anti-Histidina, no qual foi possível notar que a indução T2 (6 horas) houve expressão da proteína, porém o sobrenadante do lisado bacteriano T1 apresentou uma expressão melhor, de acordo com a Figura 8.



**Figura 8** -Western Blot da q1ANAP-pHT43 após a indução em *E. coli*. M – marcador molecular; SNT1 e PT1– sobrenadante e *pellet* da indução T1(3h) respectivamente; -SNT2 e PT2- sobrenadante e *pellet* do T2 (6h) de indução; SNT3 e PT3 – sobrenadante e *pellet* do T3 (16h) de indução. Western Blot da q1ANAP-pHT43 após a indução em *E. coli*.

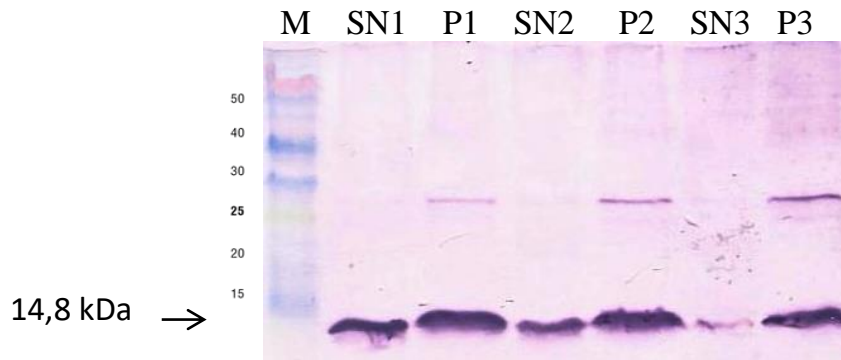
#### 5.4 Indução e purificação da q1ANAP-pHT43 em *Bacillus subtilis*

Os testes de indução em *Bacillus subtilis* não apresentaram resultado positivo nos ensaios por *Western blot* utilizando os anticorpos anti-HisG (Invitrogen) contra os *pellets* dos induzidos (3h, 6h e 16h), apesar terem sido seguidas todas as orientações do fabricante (MOBITEC). Isto inviabilizou qualquer ensaio visando a purificação da proteína expressa neste organismo. Os motivos que justificam a proteína não ter sido expressa não foram detectados, visto que o vetor pHT43 é destinado a expressão neste hospedeiro e a expressão do mesmo gene foi detectada em *E. coli*. Novos ensaios serão realizados em trabalhos posteriores buscando identificar as condições ideais para expressão.

#### 5.5 Indução e purificação da q2ANAP-pRSET em *E. coli* BL 21

A químera q2ANAP-pRSET foi induzida sob as mesmas condições que o q1ANAP-pHT43 na hospedeira *E. coli*, apresentando resultados satisfatórios, confirmando que a proteína é solúvel e que as bandas correspondem na altura de 14,8 kDa (Figura 9). Resultados de Silvestre et al. (2014) utilizando indução com IPTG verificaram que a melhor indução ocorreu no T3, após 4 horas de indução, confirmando que a proteína é realmente solúvel. Pode-se notar ainda uma redução na quantidade de proteína no sobrenadante de indução ao longo das horas de indução, e uma manutenção da quantidade de proteína no *pellet*. Isto pode indicar ou uma degradação das proteínas encontradas na porção solúvel ou uma tendência a formação de corpos de inclusão. Teste alterando o indutor utilizado para lactose, alteração da

temperatura de indução, meio de cultura e/ou cepa de *E. coli* poderão aumentar a concentração de proteína obtida no sobrenadante do lisado celular.



**Figura 9** - Perfil de indução através de *Western Blot* com pRSET A em *E. coli*. M – marcador molecular; SN1 e P1 – sobrenadante e pellet do T1 (3h) de indução; SN2 e P2- sobrenadante e pellet do T2 (6h) de indução; SN3 e P3- sobrenadante e pellet do T2 (overnigth) de indução; PS1 – pellet solubilizado do T1. Indução com indutor IPTG.

A q2ANAP-pRSET foi purificada e com as concentrações obtidas na purificação como mostra a Figura 10, possibilitou realizarmos um *Blotting* da proteína MSP1 $\alpha$  utilizando o soro de animais infectados.

### 5.6 Testes de *Western Blot* com soro de animais infectados com *A. marginale*

Foi realizado uma análise de funcionalidade da q2ANAP utilizando soros de animais infectados com anaplasmosse bovina, através do *Western Blot*. Neste, foi possível determinar que proteína é reativa a anticorpos presentes no soro destes aniamais (Figura 11), não apresentando reatividade no controle negativo (soro bovino não exposto a doença).

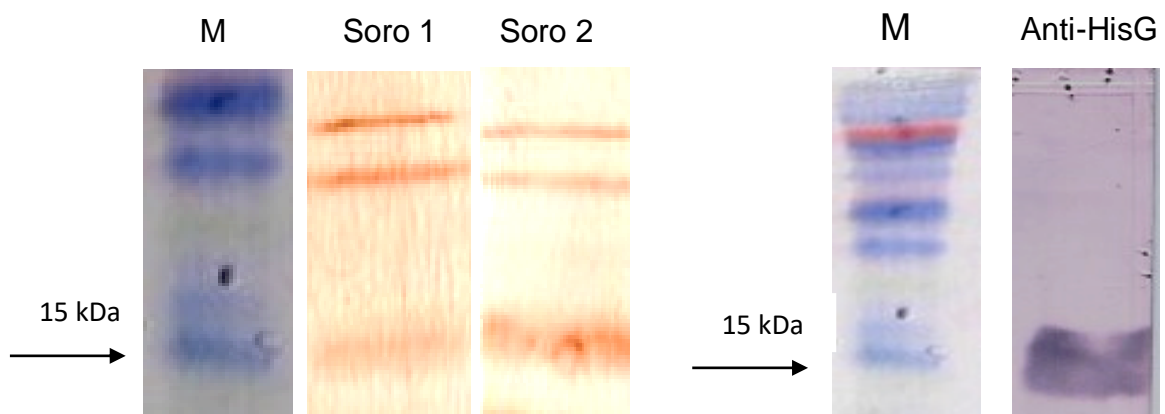


Figura 10 – “Imunoblot” utilizando soros de animais infectados com Anaplasmosse contra a proteína q2ANAP. M - marcador molecular. Proteína reagiu ao soro do animal (a esquerda). Revelação da proteína com *kit* Invitrogen (a direita).

Dessa forma, é possível observar que a proteína q2ANAP possui epítomos que estão associados a uma resposta imune humoral contra a *A. marginale*. Como a ferramenta construída neste trabalho trata-se de uma junção de epítomos, não é possível afirmar qual destes foi reconhecido pelo soro dos animais. Para que uma análise mais aprofundada seja realizada, futuros projetos buscarão sintetizar peptídeos de cada epítomo selecionado e analisar individualmente a reatividade do soro dos animais infectados com a doença. Um dos epítomos se baseou no trabalho de Santos e colaboradores (2013), determinado através de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer sequências em tandem (E/QASTSS) encontradas no antígeno MSP1a. Este estudo demonstrou ainda a capacidade de geração de resposta imune protetora adquirida em animais imunizados com peptídeos baseados nestas sequências. O potencial deste antígeno como candidato vacinal pode ainda ser observado em estudo realizados por Silvestre e colaboradores (2014), onde utilizando sequência de epítomos diferentes das usadas neste estudo, e desafiando os animais com tais epítomos resultaram em satisfatórios resultados aumentando a resposta imune do animal e diminuindo a morbidade causada pela doença. Tal resultado confirma os realizados por BROWN et al. (2002), que variantes de aminoácidos de MSP1 $\alpha$  conservados no interior da região carboxi-terminal da proteína estimulam elevados níveis de IFN- $\gamma$  e produção de células CD4+.

Apesar do “immunoblot” apresentado na figura 9 ser observado uma espessa formação de banda de detecção da proteína, não foram obtidas grandes concentrações desta após a purificação (figura 10). As eluições obtidas foram suficientes para a realização do teste para análise do reconhecimento do soro dos animais infectados com *A. marginale*, contudo, trabalhos posteriores buscarão aumentar o rendimento da purificação utilizando grandes volumes de indução. Além disso, variações nas condições de indução poderão ser realizadas buscando reduzir a concentração de proteína no *pellet* bacteriano. A extração de proteínas encontradas na porção insolúvel do extrato exige o tratamento com agentes desnaturantes e redutores como ureia e beta-mercaptoetanol, o que dificulta uma produção em larga escala, encarecendo o produto final. Variações na temperatura de indução, indutor utilizado, cepa de *E. coli*, tempo de indução e meio de cultura utilizado podem reduzir a formação dos corpos de inclusão, aumentando assim a concentração de proteínas na porção solúvel.

A produção q1ANAP em pHT43 apresentou um resultado contrário ao esperado. Inicialmente, não era esperado qualquer expressão em *E. coli* tratando-se apenas de um teste

paralelo ao experimento com *B. subtilis*. Para a surpresa da equipe, foi detectada a proteína no *pellet* de indução apenas da primeira através de um “immunoblot” com anti-HisG. A expressão em *E. coli* pode ser explicada pelo reconhecimento, conservado entre as espécies, da RNA polimerase bacteriana ao promotor presente no vetor pHT43, causando uma baixa expressão da proteína.

No entanto, a ausência de expressão detectável no *pellet* de indução de *B. subtilis* não ficou esclarecida nos experimentos realizados. O sucesso da transformação foi confirmado com a obtenção de resistência da cepa a ampicilina e cloranfenicol, ou seja, o plasmídeo estava presente no citoplasma bacteriano. O gene construído estava presente no vetor como pode ser observado através dos testes de digestão e sequenciamento. O indutor utilizado (IPTG) foi o mesmo aplicado no teste com a *E. coli*. Logo, trabalhos futuros buscarão entender e solucionar o problema ocorrido. O interesse na produção da proteína neste hospedeiro se deve a facilidade que ele pode proporcionar através da secreção de proteínas no sobrenadante de cultura, característica que facilita a purificação em larga escala desta quimera de epítopos antigênicos. No futuro, em um cenário onde seja possível realizar ensaios de estimulação imune em bovinos, serão necessárias grandes concentrações da quimera. Logo, a obtenção da proteína de forma mais prática facilitaria o desenvolvimento destes estudos. Com a falta de sucesso na expressão em *B. subtilis* e a baixa expressão em *E. coli* (com baixo rendimento na purificação), o grupo cogitou a possibilidade do desenho do gene estar sendo um fator prejudicial. Por esta razão, um segundo desenho (q2ANAP) foi realizado intercalando os epítopos com quatro resíduos de alanina, conhecidos na literatura por aumentar a flexibilidade da proteína e não estimular a resposta humoral imune, sendo alterado ainda o vetor de expressão para pRSET e o hospedeiro para *E. coli*.

Por fim, provamos que os epítopos selecionados respondem ao soro do animal infectado, contribuindo para que novos testes sejam realizados avaliando a resposta imune de animais contra esta construção. Após estas análises soroepidemiológicas, será possível realizar ensaios visando analisar o potencial desta proteína na geração de resposta imune protetora.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteína q1ANAP expressa em *Bacillus subtilis* não apresentou resultados satisfatórios, visto que no *Western Blot* foi possível ser visualizada. Em *E. coli*, apesar de confirmada a expressão nos lisados bacteriano, após purificação não foi possível obter concentrações suficientes para a realização de testes de análise da reatividade soro do animal infectado.

A proteína q2ANAP-pRSET foi clonada e expressa com sucesso em no hospedeiro *E. coli* demonstrando ser uma proteína solúvel e de fácil purificação.

A funcionalidade da proteína foi confirmada mediante resultado positivo do reconhecimento de soros de animais infectados, o que garante que aos epítomos são imunogênicos. Isto possibilita a realização de futuros testes soroepidemiológicos e análise de obtenção de imunidade protetora em animais imunizados.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. *Estatísticas de Exportações por ano*. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/41\\_exportacao\\_ano.asp](http://www.abiec.com.br/41_exportacao_ano.asp). Acesso em 23/07/2014.

AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. **Research in veterinary science**, v. 25, n. 1, p. 76-81, 1978.

ALLEMAN, A. Rick et al. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. **Infection and immunity**, v. 65, n. 1, p. 156-163, 1997.

ALLRED, David R. et al. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n.8, p. 3220-3224, 1990. doi: 10.1073/pnas.87.8.3220.

ALMAZÁN, Consuelo et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 265-272, 2012.

ARAÚJO, Flávio R. et al. Progresses in immunization against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

ARAÚJO, Flávio R. et al. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 186-190, 2008.

ARAÚJO, F. R. et al. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de conglutinação rápida. **Revta Bras. Parasitol. Vet.**, v. 6, 1997.

AUBRY, Pascale; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and emerging diseases**, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01173.



BRAYTON, Kelly A.; PALMER, Guy H.; BROWN, Wendy C. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. 2006.

BOWIE, Michael V. et al. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, v. 282, n. 1, p. 95-102, 2002. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00845-9.

BROWN, Wendy C. et al. 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.

BOWMAN, A. S.; SAUER, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S67-S81, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182004006468>.

BROWN, Wendy C. et al. 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, n. 11, p. 6853-6862, 2001. doi: 10.1128/IAI.69.11.6853-6862.2001.

CONG, Hua et al. [Oral mixed DNA vaccine protects mice from infection of *Toxoplasma gondii*]. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 23, n. 3, p. 159-162, 2005.

CABEZAS-CRUZ, Alejandro et al. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65243, 2013.

DE LA FUENTE, J. et al. 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**, v. 31, n. 2, p. 145-153, 2001.

DE LA FUENTE, José et al. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, n. 4, p. 187-196, 2004.

DE LA FUENTE, José et al. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 01, p. 75-89, 2005.

DE LA FUENTE, José et al. Functional genomics and evolution of tick *Anaplasma* interactions and vaccine development. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2, p. 175-186, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.019.

DE GROOT, Anne S. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. **Drug discovery today**, v. 11, n. 5, p. 203-209, 2006.

DOS SANTOS, Hélvio Queiroz; LINHARES, Guido Fontgalland Coelho; MADRUGA, Cláudio Luiz. Estudo da prevalência de anticorpos anti-Babesia bovis e anti-Babesia bigemina em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2006.

DUMLER, J. Stephen et al. 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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Carrapatos do Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistências a acaricidas**. EMBRAPA CERRADOS, Planaltina, DF, Janeiro, 2010, 10p.

ESTES, D. Mark; CLOSSER, Natalie M.; ALLEN, Gary K. IFN- $\gamma$  Stimulates IgG sub 2 sub Production from Bovine B Cells Costimulated with Anti- $\mu$  and Mitogen. **Cellular immunology**, v. 154, n. 2, p. 287-295, 1994. doi: 10.1006/cimm.1994.1078.

FRENCH, Dorothy M. et al. Expression of Anaplasma marginale major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

GARRY, F.B. Indigestão em Ruminantes. In: Smith, B.P. **Tratado de Medicina de Grandes Animais**. São Paulo: MIR Assessoria Editorial. 1994. p.750-783.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região Sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 187-194, 2000.

GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104p.

GRAU, Hermann Eduardo Gonzalez et al. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 189-193, 2013.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GURUNATHAN, Sanjay; KLINMAN, Dennis M.; SEDER, Robert A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 927-974, 2000. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.927.

HAJDUŠEK, Ondřej et al. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, 2013. doi: 10.3389/fcimb.2013.00026.

HUANG, Jian; HONDA, Wataru. CED: a conformational epitope database. **BMC immunology**, v. 7, n. 1, p. 7, 2006.

JUNIOR S.G, Daniel et al. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 843-849, 2010.

KANO, Flora Satiko et al. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00051-2.

KANO, Flora Satiko; VIDOTTO, Odilon; VIDOTTO, Marilda Carlos. DNA vaccines: general concerns and its applications in human and veterinary medicine. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina: Ciências Agrárias**, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n4p709>.

KLAUS, Gerhard George Bruno; JONES, E. W. The immunoglobulin response in intact and splenectomized calves infected with *Anaplasma marginale*. **The Journal of Immunology**, v. 100, n. 5, p. 991-999, 1968.

KAWASAKI, Paula Miyuki et al. Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of rMSP 4 from *Anaplasma marginale* isolated from Parana State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2007.

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

KOCAN, Katherine M. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003. doi: 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003.

KOCAN, KATHERINE M. et al. Recent studies on the characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 114-117, 2004.

KOCAN, Katherine M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2, p. 95-107, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012.

KOCAN, Katherine M.; BLOUIN, Edmour F.; BARBET, Anthony F. Anaplasmosis control: past, present, and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 501-509, 2000.

LOPEZ, Job E. et al. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. **Infection and immunity**, v. 75, n. 5, p. 2333-2342, 2007.

LI, Long et al. Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by attenuated *Salmonella* elicits protective immune responses in chickens. **Vaccine**, v. 24, n. 33, p. 5919-5927, 2006.

LIU, Zhijie et al. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. **Veterinary microbiology**, v. 107, n. 1, p. 145-148, 2005.

MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. *Exportação*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acesso em: 31/07/2014.

MARANA, Odilon Vidotto<sup>1</sup> Elizabete Regina Marangoni. Diagnóstico em anaplasrose bovina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, 2001.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MATHIAS, Maria. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos Ixodídeos**. Ed. Unesp. São Paulo, 2013.

MCGAREY, Donald J. et al. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and immunity**, v. 62, n. 10, p. 4594-4601, 1994.

MCGUIRE, Travis C. et al. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. **Infection and immunity**, v. 45, n. 3, p. 697-700, 1984.

MENDEL, Itzhak; DE ROSBO, Nicole Kerlero; BEN-NUN, Avraham. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V $\beta$  gene usage by T cells recognizing the core epitope

encephalitogenic for T cell receptor V $\beta$ b and T cell receptor V $\beta$ a H-2b mice. **European journal of immunology**, v. 26, n. 10, p. 2470-2479, 1996.

MOREL, Penelope A. et al. DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. **Vaccine**, v. 22, n.3, p. 447-456, 2004. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.07.012.

MOLAD, T. et al. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. **Veterinary microbiology**, v. 113, n. 1, p. 55-62, 2006.

MUNODZANA, Devere et al. 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.

NAGATA, Toshi et al. Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. **DNA and cell biology**, v. 23, n. 2, p. 93-106, 2004.

NOH, Susan M. et al. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. **Infection and immunity**, v. 76, n. 5, p. 2219-2226, 2008.

OBERLE, Suzan Marie et al. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and immunity**, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.

PALACIOS, Carlos; DE ECHAIDE, Susana Torioni; MATTION, Nora. Evaluation of the immune response to *Anaplasma marginale* MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein. **Research in veterinary science**, v. 97, n. 3, p. 514-520, 2014.

PALMER, Guy H.; RURANGIRWA, Fred R.; MCELWAIN, Terry 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, Guy H. et al. 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, Guy H.; MCGUIRE, Travis C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **The Journal of Immunology**, v. 133, n 2, p 1010-1015, 1984.

Porath, Jerker, et al. "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." *Nature* 258 (1976): 598-9.

RAIN CZUK, Adam et al. The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi adami* challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol. **Vaccine**, v. 21, n. 21, p. 3030-3042, 2003.

REYNA-BELLO, Armando et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 5, n. 2, p. 259-262, 1998.

RICHEY, E. J. et al. Bovine anaplasmosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, n. 11, p. 1661-1668, 1990.

ROTH, James A. Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 127-136, 2011. doi: 10.1016/j.provac.2011.10.00.

SANTOS, Paula S. et al. Epitope-Based Vaccines with the *Anaplasma marginale* MSP1a Functional Motif Induce a Balanced Humoral and Cellular Immune Response in Mice. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60311, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060311.

SAUER, J. R. et al. Tick salivary gland physiology. **Annual review of entomology**, v. 40, n. 1, p. 245-267, 1995.

SETTE, Alessandro; FIKES, John. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 4, p. 461-470, 2003. DOI: 10.1016/S0952-7915(03)00083-9.

SINGER, Randall S. et al. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 47-51, 2003. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00490-0.

SILVESTRE, Bruna T. et al. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. **Vaccine**, v. 32, n. 19, p. 2160-2166, 2014.

SOUZA, F. de A.L. et al. Babesiose e anaplasmoses em bovinos leiteiros no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 9, Sept. 2013.

SOUZA, José Carlos Pereira de et al. PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST *Anaplasma marginale* (RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE) IN CATTLE IN THE "MÉDIO PARAÍBA" MESOREGION, BRAZIL. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

TAVARES-MARQUES, Lucinda M. et al. Serological evidence of *Anaplasma spp.* in small ruminants from Venezuela using recombinant MSP5 in immunoenzymatic assay. **Revista Científica**, v. 20, n. 005, 2010.

TATE, Cynthia M. et al. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 1, p. 110-119, 2013.

TEBELE, Ntando; MCGUIRE, Travis C.; PALMER, Guy. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.



TEMBUE, António Amélia Mucalane et al. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from south Mozambique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 318-324, 2011.

THEILER, Arnold et al. **Further investigations into anaplasmosis of South African cattle**. Pretoria: Government Printer and Stationery Office, 1911.

TIRLONI, Lucas et al. Proteomic Analysis of Cattle Tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* Saliva: A Comparison between Partially and Fully Engorged Females. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94831, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0094831.

ULMER, Jeffrey B.; WAHREN, Britta; LIU, Margaret A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. **Trends in molecular medicine**, v. 12, n. 5, p. 216-222, 2006.

VIDOTTO, Marilda C. et al. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.

ZHENG, Chunfu et al. Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. **Journal of virology**, v. 79, n. 3, p. 1948-1953, 2005.7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES



## ANEXOS

**Anexo 1** – Espécies de *Anaplasma spp.*Tabela 1 - Tipos de *Anaplasma marginale*

<i>Anaplasma spp.</i>	Distribuição Geográfica	Hospedeiro	Células do hospedeiro	Doenças	Principais vetores de carrapatos (Gênero)
<i>A. marginale</i>	Trópicos e Sub trópicos	Bovinos	Eritrócitos	Anaplasmore Bovina	<i>Dermacentor, Rhipicephalus, Hyalomma, Ixodes</i>
<i>A. centrale</i>		Bovinos	Eritrócitos	Anaplasmore (branda)	
<i>A. ovis</i>	Trópicos e Subtrópicos	Ovinos e Caprinos	Eritrócitos	Anplasmose ovina	<i>Dermacentor, Rhipicephalus</i>
<i>A. bovis</i>	Norte da América, Ásia e África	Bovinos e coelhos	Células mononuclear	Anaplasmore agranulocítica	<i>Hyalomma, Amblyomma, Haemaphysalis, Rhipicephalus</i>
<i>A. phagocytophilum</i>	Mundial	Humanos, bovinos, ovelhas, cachorros, coelhos, Lhamas, gatos, javalis	Granulócitos	Anaplasmore	Ixodes
<i>A. platys</i>	Mundial	Cachorros	Plaquetas	Infecção ciclica trombopo	<i>Dermacentor, Rhipicephalus e Hyalomma.</i>

Fonte: De la Fuente et al., 2010

## Anexo 2 – Protocolos

### Transformação em *E.coli* TOP 10

- 1 - 5µL do sistema de ligação foram inoculados em 100µL de célula competente *E. coli* Top 10 e incubado no gelo por 30 minutos.
- 2 - Após esse tempo, foi aplicado um choque térmico a 42°C por 90 segundos seguindo-se uma rápida incubação no gelo por mais 2 minutos. Em tubo *Falcon* 15mL, foi adicionado 1mL de meio LB (extrato de levedura 0,5%; peptona de caseína 1%; cloreto de sódio 1%; [pH 7,2]) mais as células transformadas.
- 3 - O crescimento da cultura foi realizado sob agitação de 250rpm por 1 hora a 37°C.
- 4 - O sistema foi plaqueado em duas placas contendo LB Agar mais 100µg/mL de ampicilina: uma placa com 100µL do sistema de transformação e outra com o restante das células após breve centrifugação para concentração do sistema.
- 5 - As placas foram incubadas em estufa a 37°C *overnight*.
- 6 - Após a transformação, seis colônias isoladas foram inoculadas em 15mL de meio LB com 100µg/mL de Ampicilina. As culturas foram crescidas sob agitação de 250rpm a 37°C *overnight*.

- **QIAGEN® Plasmid Mini, Midi e Maxi Kits**

Este protocolo é concebido para a purificação acima de 20µg de Plasmídeo de DNA de alta-cópia em 1-5 ml de cultura de *E. coli* em meio LB durante a noite. Novos usuários e usuários que esperam para purificar plasmídeos de baixa-cópia e cosmídios, grandes plasmídeos (> 10 kb) e DNA preparado utilizando outros métodos devem consultar os protocolos detalhados fornecidos no QIAprep Miniprep Handbook.

#### Procedimento

1. Ressuspender as células bacterianas peletizadas em 250µl no Buffer P1 e transferir para um tubo de microcentrífuga.
2. Adicionar 250 µL ao buffer P2 e misture imediatamente e completamente invertendo o tubo 4-6 vezes.
3. Adiciona-se 350 µl ao Buffer N3 e misture imediatamente e completamente invertendo o tubo 4-6 vezes.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm (~ 17.900 xg) numa mesa-superior de microcentrífuga.

5. Aplicar-se o sobrenadante (a partir do passo 4) para a coluna de centrifugação QIAprep por decantação ou pipetagem.
6. Centrifugar por 30-60 s. Descartar o escoamento.
7. Recomendações: Lavar a coluna de spin QIAprep por adição de 0,5 ml ao Buffer PB e centrifugar por 30-60 s. Descarte o meio de fluxo.
8. Lave a coluna rotação do QIAprep, adicionando 0,75 ml ao Buffer PE e centrifugue por 30-60 s.
9. Descartar o meio de fluxo, e centrifuga-se durante por tempo adicional de 1 min para remover a lavagem residual do Buffer.
10. Para eluir o DNA, colocar a coluna do QIAprep em tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml. Adicionar 50µl ao Buffer EB ou água ao centro de cada coluna de spin QIAprep, deixar repousar durante 1 min, e centrifuga-se durante 1 min.

- **Kit QIAGEN® Gel Extraction**

Todos os passos de centrifugação são realizados a 17.900 xg (13.000 rpm) numa microcentrífuga de bancada convencional.

Procedimento

1. Extirpar o fragmento de DNA do gel de agarose com um bisturi afiado e limpo.
2. Pesa-se a fatia de gel no tubo incolor. Adicionar 3 volumes ao Buffer QG para um volume de gel (100 mg de gel ~ 100 µl). A quantidade máxima de gel por coluna rotação é de 400 mg. Para > 2% gel de agarose, adicionar 6 volumes ao Buffer QG.
3. Incubar a 50°C por cerca de 10 min (ou até que a fatia de gel foi completamente dissolvida). Inverta o tubo a cada 2-3 min para ajudar a dissolver gel. Depois de o pedaço tenha dissolvido completamente, verificar que a cor da mistura amarelo (semelhante ao Buffer QG sem agarose dissolvido). Se a cor da mistura for cor de laranja ou violeta, adicionar 10 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,0, e mistura-se. A mistura fica amarelo.
4. Adicionar 1 volume de isopropanol à amostra e misturar.
5. Coloque uma coluna de rotação QIAquick em centrífuga um tubo de coleção preenchido de 2 ml. Para a ligação do DNA, aplicar a amostra à coluna QIAquick e centrifugar durante 1 min. Descartar o escoamento e colocar a coluna QIAquick de volta para o mesmo tubo. Para volumes de amostra de >800 µl, carga/rotação aplicar vácuo novamente.

6. Se o DNA, posteriormente, servirá para o sequenciamento, transcrição *in vitro* ou microinjeção, adicione 500 µl ao Buffer QG na coluna QIAquick e centrifugar durante 1 min. Descartar fluxo e colocar a coluna QIAquick de volta para o mesmo tubo.
7. Para lavar, adicionar 750 µL ao Buffer PE para a coluna QIAquick e centrifugar por 1 min. Rejeitar fluxo e colocar a coluna QIAquick de volta para o mesmo tubo. **Nota:** Se o DNA a ser usado para aplicações sensíveis ao sal (por exemplo, o sequenciamento blunt-ended ligadura), deixar a coluna descansar por 2-5 min após a adição ao Buffer PE.
8. Colocar a coluna QIAquick em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo.
9. Para eluir o DNA adicione 50 µl ao Buffer EB (Tris Cl 10 mM, pH 8,5) ou água para o centro da membrana QIAquick e centrifugar durante 1 min. Para aumentar a combinação de DNA, adicionar 30 µl ao Buffer EB do centro da membrana QIAquick, deixar a coluna descansar durante 1 min, e em seguida centrifugar durante 1 min. Após a adição ao Buffer EB à membrana QIAquick, aumente o tempo de incubação para até 4 minutos para aumentar o rendimento de DNA purificado.
10. Se o DNA purificado será analisado num gel, adicionar um volume de corante para 5 volumes de DNA purificado. Misturar a solução pipetando cima e para baixo antes de colocar o gel.

- **Transformação *Bacillus subtilis* Expression Vectors © MoBiTec**

Protocolos detalhados para manuseio molecular de *E. coli* e *Bacillus* (crescimento, transformação, etc.) podem ser encontrados em relevantes manuais de laboratório como Sambrook e Russel (2011). O seguinte protocolo é adaptado de Klein et al., 1992. Por favor, note que tratamento imediato resulta em altas taxas de transformação.

1. Preparação das células experimentais de *Bacillus subtilis*
  - De um dia para o outro cultive células em recipiente apropriado em 5 ml de meio HS em 37° C.
  - Inocular em 50 ml de meio HS com 0,5 ml da cultura de um dia para o outro; incubar sob agitação vigorosa a 37 ° C
  - Registro o crescimento da curva de uso de mag
  - Recolha amostras de 10 ml cada, quando as células atingem a fase estacionária em intervalos de 15 minutos.
  - Adicionar 1 ml de glicerol estéril (87%), misture e deixe por 15 minutos no gelo

- Fracionar em alíquotas de 1 ml, congelar em nitrogênio líquido e armazenar a  $-80^{\circ}\text{C}$
- Verificar uma alíquota a partir de cada ponto de tempo com um plasmídeo de DNA de referência (ver abaixo) para identificar o (s) ponto de tempo (s) produzindo células competentes alto nível; descartar o não-ou baixas alíquotas apropriadas.

**Transformação de células de *Bacillus subtilis* apropriadas.**

- Descongelar uma alíquota a  $37^{\circ}\text{C}$
- Usar essas células para inocular 20 ml de meio de LS
- Agitar as células lentamente num banho de água a  $30^{\circ}\text{C}$  para se obter competência máxima (cerca de 2 h)
- Tomar alíquotas de 1 ml para um tubo de vidro ou de 2 ml tubo Eppendorf, adicionar 10  $\mu\text{l}$  de 0,1 M EGTA (CB-0732-10GAM), e incubar durante 5 min à temperatura ambiente
- Adicionar o plasmídeo ou o ADN cromossômico e incubar durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  enquanto agita-se bem (boa mistura é importante ao usar copos Eppendorf)
- Se foram utilizados tubos de vidro, transferir a suspensão de células para um tubo Eppendorf
- Centrifuge, elimine o sobrenadante com cuidado e voltar a suspender as células para a final sobrenadante remanescente na pelete
- Coloque em meio seletivo 2xYT
- Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  de um dia para o outro.

**Meios e soluções**

10x S-base (sal de Spizizen):

2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

14 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Citrato de sódio 1 g

adicionar água destilada até 100 ml e autoclave

adicionar 0,1 ml de 1M  $\text{MgSO}_4$  após autoclavagem

Meio HS:

Água destilada 66,5 ml:

10x 10 ml S-base

2,5 ml de 20% (w / v) de glucose

5 ml de 0,1% (w / v) de L-triptofano

1 ml de 2% (w / v) de caseína

5 ml de 10% (w / v) de extracto de levedura (Disco)

10 ml de 8% (w / v) arginina, 0,4% de histidina

autoclave todos os componentes separadamente

solução triptofano: filtração estéril

Meio LS:

80 ml de água destilada

10x 10 ml S-base

2,5 ml de 20% (w / v) de glucose

0,5 ml de 0,1% (w / v) de L-triptofano

0,5 ml de 2% (w / v) de caseína

5 ml de 2% (w / v) de extracto de levedura

0,25 ml de 1 M MgCl<sub>2</sub>

0,05 ml de 1 M de CaCl<sub>2</sub>

autoclave todos os componentes separadamente

solução triptofano: filtração estéril

0,1 M EGTA

dissolver 3,8 g de EGTA em 50 ml de água destilada

ajustar o pH para 7,2 utilizando NaOH 10 N

adicionar água destilada até 100 ml

autoclave

Indução com IPTG

- Crescer apropriadamente a cepa *B. subtilis* de um dia para outro em meio fresco 2xYT
- Inocular em meio fresco 2xYT para uma OD<sub>600</sub> de 0,15
- Quando a cultura atinge OD<sub>600</sub> 0,7-0,8, divida em 2 partes e induza com IPTG 1 mM (CB-0487-1GAM) para uma porção (t = 0)
- Recolher amostras a diferentes pontos de tempo para análise (t = 1, t = 2 ...)



### **Análise da Amostra**

- Preparação de extratos de células solúveis e insolúveis de *B. subtilis*.
- Células de colheita por centrifugação (10 min, 6000 xg, 4 ° C).
- Lavagem e ressuspender em buffer com 50 mM fosfato de sódio (pH 7,0) a uma OD600 de 10.
- Quebrar células por ultra-som (12 W, 6 x 15 pulsos com intervalos de 15 seg) em 1,5 ml Tubos Eppendorf contendo 1 ml de suspensão de células, suplementado com lizozima (250 ug / ml, CB-0663-5GAM), em gelo.
- Em alternativa, as células podem ser quebradas por batida: perturbar três vezes com contas de vidro (0,1 mm de diâmetro) (1 g / ml de suspensão de células) em um misturador orbital a 180 V, com a mistura mantida em gelo durante 3 minutos entre cada interrupção.
- Tomar 100 ml de preparação como primeira amostra total de proteína (T1).
- Remover os detritos celulares por centrifugação a 4300 xg, 10 min, 4 ° C.
- Tirar 100 ul do sobrenadante para a segunda amostra de proteína total (T2).
- Centrifugar a 8.200 xg (10 minutos, 4 ° C) para separar em frações de proteína insolúvel (I) e solúvel (S).
- Por exemplo, utilizar a quantidade de proteína que corresponde a 0,025 da OD600 para separação por SDS-PAGE.
- Analisar as amostras por imuno plotagem com anti-soro específico.

- **Preparo do gel de Poliacrilamida**

1. Para o preparo do gel de corrida a 15% os seguintes reagentes foram adicionados e homogeneizados em um béquer:

Água – 3,4 mL

30% Acrilamida mix – 7,5 mL

1,5 M de Tris (pH 8,8) – 3,8 mL

10% de SDS – 0,15 mL

10% de persulfato de amônio – 0,15 mL

TEMED – 0,006 mL

2. Em seguida a solução foi colocada na placa e esperou-se meia hora para polimerização.

3. Após a polimerização do gel running foram misturados e homogeneizados os seguintes reagentes em um béquer para o preparo do gel stacking:

Água – 3,4 mL

30% Acrilamida mix – 0,83 mL  
 1.0 M de Tris (pH 6,8) – 0,63 mL  
 10% de SDS – 0,05 mL  
 10% de persulfato de amônio – 0,05 mL  
 TEMED – 0,005 mL

4. Em seguida a solução foi colocada na placa acima do gel running e esperou-se a polimerização.

Preparo da amostra do sobrenadante:

1. Retirou-se 300 uL do sobrenadante de cada T (tempo) para um microtubo e adicionou-se 100 uL de TCA.
2. Incubou-se em gelo por 10 min para precipitação e em seguida foi centrifugado por 10 min a 4°C a 12.000 x g.
3. O sobrenadante foi descartado e o pellet deveria ser lavado com acetona, porém como a quantidade de pellet formado foi muito pequena, a lavagem não foi feita e o pellet foi ressuspenso em 20 uL de tampão de amostra.
4. Foi preparado 200 uL do tampão de amostra (20 uL de DTT e 180 uL de loading buffer – tampão de corrida).

- **Células competentes *Bacillus subtilis***

Tabela 1 – Densidade Óptica da curva de crescimento de *Bacillus subtilis*.

Hora	DO
12:30	0,099
13:00	0,386
13:50	1,278
14:25	2,093
14:45	2,468
15:00	2,829
15:15	3,101
15:30	3,236

15:45

3,231

A fase estacionária do isolado começou 15:30, ou seja, depois de 03:30 horas de crescimento. A partir dessa fase foram retiradas três alíquotas a cada 15 minutos (T1, T2 E T3) para inóculo em meio LB ágar de acordo com o Gráfico 1 abaixo.

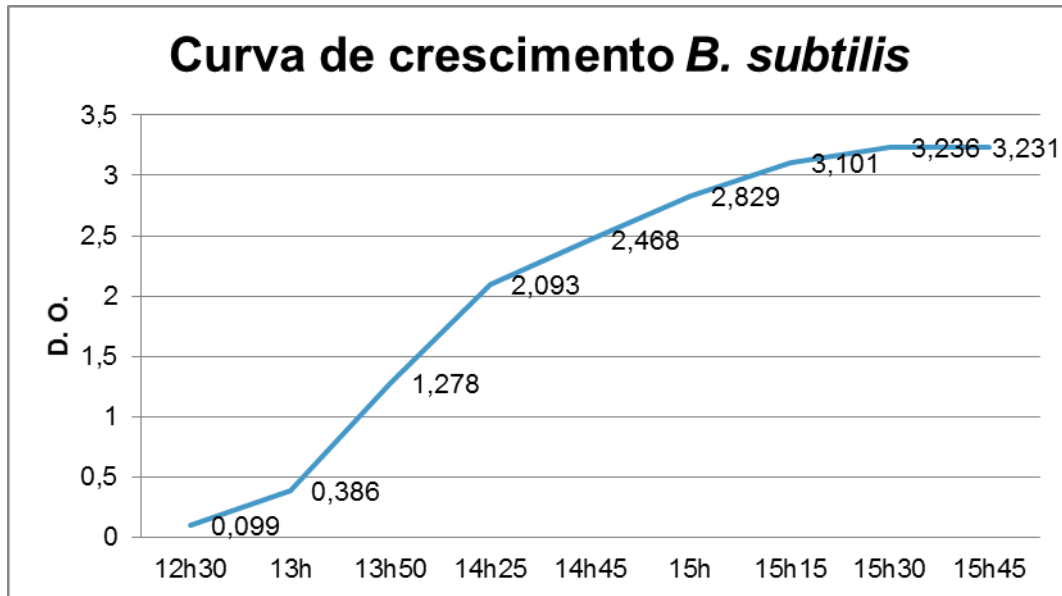


Figura 11. Curva de crescimento de *B. subtilis*

### Anexo 3 - SEQUENCIAMENTO

G G C C A T A A G C T T G G A T C C G A A T T C C A T C A T C A C C  
 A T C A C C A T G A T G A T G A C G A T A A G T C T A G A G G G C  
 C C C C G C G G T C G A C G T C T T C C C A G C T T G G A G G C G  
 G A T C T T C A A C G T C T A G T C A A C T G G G C G G A G G T T  
 C A A G C A C T T C A T C C C A G C T T A C G C G T A C T A G T G G  
 G C C C A G T A C G T C C T C A C A G C T T A G C G A A G C A T C  
 T A C C A G T A G T C A G T T A G G C G C G C C G C G G C T C G A  
 G A C G C G T G G A A G C T C C G C T G T T G C C G C T G G C T T  
 C G G G G G C G A C G A C A C G G A T T T C T A T C T C G G T T T  
 T G G T T T G C T C G A G A C T A G T G A T A T C G A A A T A C C  
 G G C T G T T G C G G C A A A C A C G T T C G G A G C C A A T T A  
 C T G C T A C G A T G T C A G C A C C G T T T A C A T G G G G A G  
 G C C T G A G C C C G G A T A T C T A A G A A T T C A T G G C C A  
 A T C A C T A G T G A A T T C C C G G G C C G C C T G G C A G G T  
 C A A C C A T A T G G G A A G A G C T C C C C A A C G C G T T G G  
 G A A G C C A T A A C

Figura 12 - Sequenciamento *Anaplasma marginale*.