



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Efeito da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas como
carreadores na produção de anticorpos específicos anti-anaplasmosose em
camundongos

Aluna: Leticia Santos Pimentel

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Coorientadora: Dr^a.Paula Cristina Batista de Faria Gontijo

Uberlândia

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Efeito da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas como
carreadores na produção de anticorpos específicos anti-anaplasmosose em
camundongos

Aluna: Leticia Santos Pimentel

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Coorientadora: Dr^a. Paula Cristina Batista de Faria Gontijo

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica.

Uberlândia

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P644e Pimentel, Leticia Santos, 1993
2018 Efeito da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas como carreadores na produção de anticorpos específicos anti-anaplasose em camundongos [recurso eletrônico] / Leticia Santos Pimentel . - 2018.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Coorientadora: Paula Cristina Batista de Faria Gontijo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1324>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. 2. Anaplasma marginale. 3. Bovino - Doenças. 4. Anaplasose. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962, (Orient.). II. Gontijo, Paula Cristina Batista de Faria, 1981, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE REUNIÃO

Ata da Apresentação Pública de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Apresentação Pública: Dissertação de Mestrado

Local: Uberlândia/MG

Data: 26/07/2018

Discente: Letícia Santos Pimentel

Matrícula: 11622GBI009

Hora de início: 14:00h

Hora de encerramento: 14:40h

Título do Trabalho: Efeito da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas como carreadores na produção de anticorpos específicos anti-anaplasose em camundongos.

Área de concentração: Genética

Linha de pesquisa: Nanobiotecnologia.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Utilização de nanopartículas como carreadores de peptídeos sintéticos em formulação vacinal contra Anaplasose bovina.

Aos 26 dias do mês de julho de dois mil e dezoito, às 14:00 horas no Auditório 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, realizou-se a Apresentação Pública da Dissertação de Mestrado do (a) Discente. A Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica foi assim composta: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador), Prof. Dr. João Paulo Coelho e Prof^a. Dr^a. Carolina Salomão Lopes, realizou o processo de avaliação **não presencial** e considerou o (a) candidato (a) APROVADO (A). Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Prof^a. Dr^a. Renata Santos Rodrigues

Coordenadora do Programa de Pós-graduação

em Genética e Bioquímica

Portaria 1489/17



Documento assinado eletronicamente por **Renata Santos Rodrigues, Coordenador(a)**, em 27/07/2018, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0546815** e o código CRC **5352A1AD**.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Efeito da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas como
carreadores na produção de anticorpos específicos anti-anaplasmosose em
camundongos

Aluna: Leticia Santos Pimentel

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Examinadores: Dr. João Paulo Coelho (UCM)

Dr^a. Carolina Salomão Lopes (UFU)

Data da Defesa: 26/07/2018

Luiz Ricardo Goulart Filho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida e que sempre estiveram ao meu lado, minha família!

E à todas as pessoas que me incentivaram, confiaram e acreditaram em mim nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Fátima Helena Santos Pimentel, e ao meu pai, Mário Pimentel, por serem meus exemplos de honestidade, humildade e perseverança, pelo incentivo de cada dia e pelo amor incondicional. À minha irmã, Inara Muriel Basso, agradeço por me apoiar sempre. Aos três, muito obrigada por compreenderem as minhas ausências. Ainda é muito difícil acordar todos os dias e não ter vocês comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, a quem tenho grande admiração. Sempre serei muito grata pela confiança e pela oportunidade que me deu.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Batista de Faria Gontijo, pela confiança que depositou em mim, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar com a nanotecnologia e por todo o conhecimento transmitido nesses anos.

À Prof^a Dr^a Paula de Souza Santos, pelo conhecimento transmitido e pela dedicação em ensinar as técnicas. Seu conhecimento e experiência foram fundamentais!

À Carolina Alvarenga Turini, por estar sempre comigo nos melhores e piores momentos e sempre me ajudar com os experimentos. Obrigada por me apoiar e nunca me deixar desistir quando tudo parecia dar errado (não foram poucas as vezes). Aguentou muito choro e estresse meu, mas, enfim, conseguimos! Se esse trabalho se conclui hoje, é porque tive seu companheirismo e sua amizade. Do laboratório para a vida toda!

Ao meu amigo Lucas Vasconcelos Soares Costa, pelas discussões em imunologia. À minha amiga Lana Macedo Matos Barbosa, pelos ensinamentos na parte veterinária. À ambos, obrigada por todo apoio, conselhos e amizade.

Ao Dr. João Ricardo Martins, por fornecer gentilmente as amostras biológicas de *Anaplasma marginale*.

Ao Prof Dr Luiz Orlando Ladeira, por contribuir com os nanotubos de carbono. À Profª Drª Clascidia Aparecida Furtado, à Mª Mariana Botelho Barbosa e à Drª Estefânia Martins pela ajuda com a caracterização da interação e pelos ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia, pelas discussões científicas e pela amizade.

À equipe do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - UFU, pelo cuidado, respeito e ética no trabalho com os animais de pesquisa. E em especial, agradeço a Loyane Bertagnolli Coutinho, por se dispor a realizar as coletas de sangue dos animais, um trabalho tão delicado e cuidadoso.

Aos camundongos, que deram suas vidas para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, por fornecer a estrutura necessária para que eu conseguisse o título de Mestre em Genética e Bioquímica com sucesso e por possibilitar o contato com professores/cientistas excelentes. E a esses mestres, agradeço por serem exemplos de profissionais e de pessoas.

À banca examinadora, João Paulo Coelho e Carolina Salomão Lopes, obrigada por terem aceitado o convite. Tenho certeza que suas contribuições terão grande valor para este trabalho e espero que esse trabalho contribua de alguma forma para o conhecimento de vocês.

Obrigada ao CNPq pelo apoio financeiro.

*Equipado com seus cinco sentidos,
o homem explora o universo ao seu redor
e dá à experiência o nome de ciência.*

Edwin P. Hubble, 1948

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1 Anaplasmosse bovina	1
1.1.1 Aspectos Gerais	1
1.1.2 Transmissão e ciclo de desenvolvimento	2
1.1.3 Sintomatologia e diagnóstico	4
1.1.4 Resposta imune e proteínas principais de superfície	5
1.1.5 Controle e prevenção	8
1.2 Nanotecnologia	9
1.2.1 Nanotubos de carbono	10
1.2.3 Internalização celular	12
1.2.4 Utilização de nanotubos de carbono como carreador vacinal	14
1.3 Formulação vacinal nanoestruturada contra <i>A. marginale</i>	15
2 Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 Material e Métodos	19
3.1 Bactéria e peptídeo sintético	19
3.2 Síntese e funcionalização dos MWCNT	19
3.3 Adsorção do peptídeo ao MWCNT	20
3.4 Caracterização da interação MWCNT-Am1	20
3.4.1 Medidas de Potencial Zeta (ξ)	20
3.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	20
3.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	20
3.5 Animais	21
3.6 Imunização e desafio	21
3.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	22
3.9 Esfregaço sanguíneo	22

3.10 Análise Estatística	23
4 Resultados e Discussão	24
4.1 Interação MWCNT-Am1	25
4.1.1 Análise de estabilidade.....	25
4.1.2 Análise vibracional por absorção no infravermelho	26
4.1.3 Análise morfológica	28
4.2 Estabelecimento da infecção por <i>A. marginale</i>	29
4.3 Avaliação da resposta imune humoral anti-MSP1a específica.....	32
5 Conclusão	37
6 Considerações finais	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Anaplasma marginale</i> presente em esfregaço de sangue bovino. . .	1
Figura 2. Ciclo de desenvolvimento de <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos e carrapatos.	3
Figura 3. Resposta imune celular e humoral de bovinos contra <i>Anaplasma marginale</i>	6
Figura 4. Nanotubos de carbono.	11
Figura 5. Vias de internalização celular de nanotubos de carbono (CNTs). .	13
Figura 6. Infecção por <i>Anaplasma marginale</i> em eritrócitos de camundongos.	16
Figura 7. Curvas de distribuição do Potencial Zeta (ξ) da interação MWCNT-Am1 medido em triplicata.	25
Figura 8. Espectro de infravermelho na região espectral entre 4000 e 650 cm^{-1}	27
Figura 9. Imagens de MWCNT obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	29
Figura 10. Eritrócitos murinos infectados com <i>Anaplasma marginale</i>	30
Figura 11. Mudança de peso de camundongos BALB/c imunizados contra <i>Anaplasma marginale</i> após desafio.	30
Figura 12. Eritrócitos murinos infectados imunizados contra <i>Anaplasma marginale</i>	31
Figura 13. Indução da produção de anticorpos IgG total anti-MSP1a.	33
Figura 14. Indução da produção de isotipos de IgG antes e após o desafio.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
ξ	Potencial Zeta
µg	Micrograma
Am1	Peptídeo sintético de <i>A. marginale</i> 1
Am2	Peptídeo sintético de <i>A. marginale</i> 2
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células Apresentadoras de Antígenos)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Soroalbumina bovina)
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
cm	Centímetro
CNEM	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CNT	<i>Carbon nanotube</i> (Nanotubo de carbono)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COOH	Ácido carboxílico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
FrA	Adjuvante de Freund
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G 1
IgG2a	Imunoglobulina G 2a
IL-12	Interleucina 12
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LQN	Laboratório de Química de Nanoestruturas de Carbono
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MSP	<i>Major Surface Protein</i> (Proteína Principal de Superfície)

MWCNT	<i>Multi-Walled Carbon Nanotube</i> (Nanotubo de carbono de parede múltipla)
Nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OIE	World Organisation For Animal Health
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PPE	<i>Percentage of Parasitized Erythrocytes</i> (Porcentagem de Eritrócitos Parasitados)
qPCR	<i>Real Time Quantitative Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)
pH	potencial de Hidrogênio
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction</i> (Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase)
SWCNT	<i>Single-Walled Carbon Nanotube</i> (Nanotubo de carbono de parede simples)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

Resumo

A anaplasmoze bovina é causada pela bactéria gram-negativa intraeritrocitária *Anaplasma marginale*. A doença está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, Europa, Austrália, África e Ásia e está relacionada a significativas perdas econômicas na pecuária bovina como baixo ganho de peso, diminuição na produção de leite, abortos, custos com o tratamento dos animais e perdas por mortalidade. Os nanotubos de carbono (CNTs) são alótropos de carbono compostos por folhas de grafeno organizadas de forma tubular. Devido a sua incrível resistência mecânica e a sua capacidade de atravessar membranas biológicas e entregar biomoléculas no citoplasma, os CNTs vêm se mostrando uma ferramenta interessante para o desenvolvimento de vacinas. O objetivo desse trabalho é caracterizar a interação e avaliar o potencial do peptídeo sintético Am1 acoplado a Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWCNT) de induzir a produção de anticorpos antígeno-específicos contra *A. marginale* em comparação à vacinação com o peptídeo administrado sem as nanopartículas como carreadores. Dessa forma, a interação foi caracterizada por Potencial Zeta, Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Camundongos BALB/c foram imunizados por meio de três injeções via subcutânea com intervalos de quinze dias e então desafiados com 3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale*. Os animais foram avaliados quanto a mudança de peso, sobrevivência e a resposta imune humoral por meio de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). A interação apresentou-se estável e com baixa tendência a aglomeração. Não houve nenhuma diferença significativa no ganho de peso entre os grupos e nenhuma mortalidade. A imunização com o peptídeo Am1 acoplado ao MWCNT induziu a produção de anticorpos semelhante ao peptídeo Am1 com Adjuvante de Freund. Em conclusão, os animais imunizados com o peptídeo Am1 acoplado ao MWCNT não apresentaram uma resposta imune superior àquela apresentada pelos animais imunizados com o peptídeo isoladamente.

Palavras-chave: Nanotubo de carbono, anaplasmoze bovina, imunização, MSP1.

Abstract

Bovine anaplasmosis is caused by the intraerythrocytic gram-negative bacterium *Anaplasma marginale*. The disease is distributed worldwide in the tropical and subtropical regions of the Americas, Europe, Australia, Africa and Asia and is related to significant economic losses in livestock such as low weight gain, decrease in milk production, abortions, costs of animal treatment and mortality losses. Carbon nanotubes (CNTs) are carbon allotropes composed of graphene sheets organized in tubular form. Due to its incredible mechanical resistance and its ability to cross biological membranes and deliver biomolecules in the cytoplasm, CNTs have proven to be an interesting tool for the development of vaccines. The aim of this work is to characterize the interaction and to evaluate the potential of the synthetic peptide Am1 coupled to Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) to induce the production of antigen-specific antibodies against *A. marginale* in comparison to the immunization with the peptide administered without the nanoparticles as carriers. Thus, Zeta Potential, absorption spectroscopy in the Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Electron Transmission Electron Microscopy (TEM) characterized the interaction. BALB/c mice were immunized via three subcutaneous injections at fifteen-day intervals and then challenged with 3×10^5 erythrocytes infected with *A. marginale*. The animals were evaluated for weight change, survival and humoral immune response by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The interaction was stable and with less tendency to agglomeration. There was no significant difference in weight loss between the groups and no mortality. Immunization with the Am1 peptide coupled to MWCNT induced antibody production similar to the Am1 peptide with Freund's Adjuvant. In conclusion, animals immunized with the Am1 peptide coupled to MWCNT did not present an immune response superior to that presented by the animals immunized with the peptide alone

Key words: Carbon nanotube, bovine anaplasmosis, immunization, MSP1.

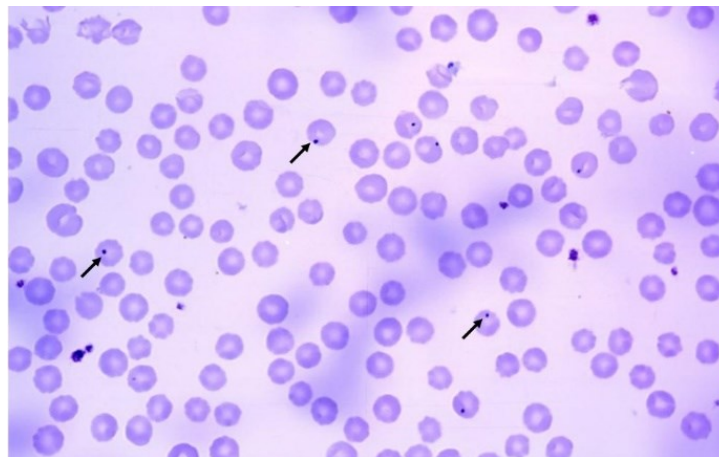
1. Introdução

1.1 Anaplasmosose bovina

1.1.1 Aspectos Gerais

Anaplasma marginale é uma bactéria gram-negativa intraeritrocitária obrigatória de ruminantes e é o agente causador da anaplasmosose bovina (BATTILANI et al., 2017). Pertence à ordem Rickettsiales, à família *Anaplasmataceae* e ao gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001; BATTILANI et al., 2017). Inicialmente foi descoberta em 1910 por Sir Arnold Theiler que observou pequenas inclusões marginais em eritrócitos de bovinos doentes (PALMER, 2009; BATTILANI et al., 2017). Pode ser identificada em esfregaços sanguíneos como uma inclusão arredondada e densa, de aproximadamente 0,3-1,0 µm de diâmetro na margem interior de eritrócitos (OIE, 2012) como mostrado na Figura 1.

Figura 1. *Anaplasma marginale* presente em esfregaço de sangue bovino. Wright-Giemsa, 100X em imersão em óleo. Setas indicam a bactéria *A. marginale* localizada na periferia de eritrócitos de sangue bovino.



Fonte: Merck Veterinary Manual.

A. marginale está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais das Américas, Europa, Austrália, África e Ásia (KOCAN et al., 2015). O Brasil pode ser considerado uma área endêmica para a ocorrência de anaplasmosose bovina, apresentando prevalência em torno de 16,3% na zona semiárida do estado de

Sergipe, quase 100% no estado do Rio de Janeiro e por volta de 98% no estado de São Paulo (SILVA; ANDRÉ; MACHADO, 2016).

A infecção pela bactéria está relacionada a significativas perdas econômicas nas indústrias de carne e laticínio devido ao baixo ganho de peso, redução na produção de leite, abortos, custos com o tratamento dos animais e perdas por mortalidade (KOCAN et al., 2015).

1.1.2 Transmissão e ciclo de desenvolvimento

A transmissão de *A. marginale* ocorre principalmente de forma mecânica, pela picada de insetos hematófagos ou fômites contaminados, e de forma biológica, envolvendo pelo menos 20 espécies de carrapatos (KOCAN et al., 2010, BATTILANI et al., 2017). Na América do Sul, o principal vetor da doença é o carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (DOYLE et al., 2016). Além disso, *A. marginale* também pode ser transmitida de forma vertical, da vaca para o bezerro através da placenta, durante a gestação. Neste caso, os bezerros nascem saudáveis mas permanecem infectados (KOCAN et al., 2015; BATTILANI et al., 2017).

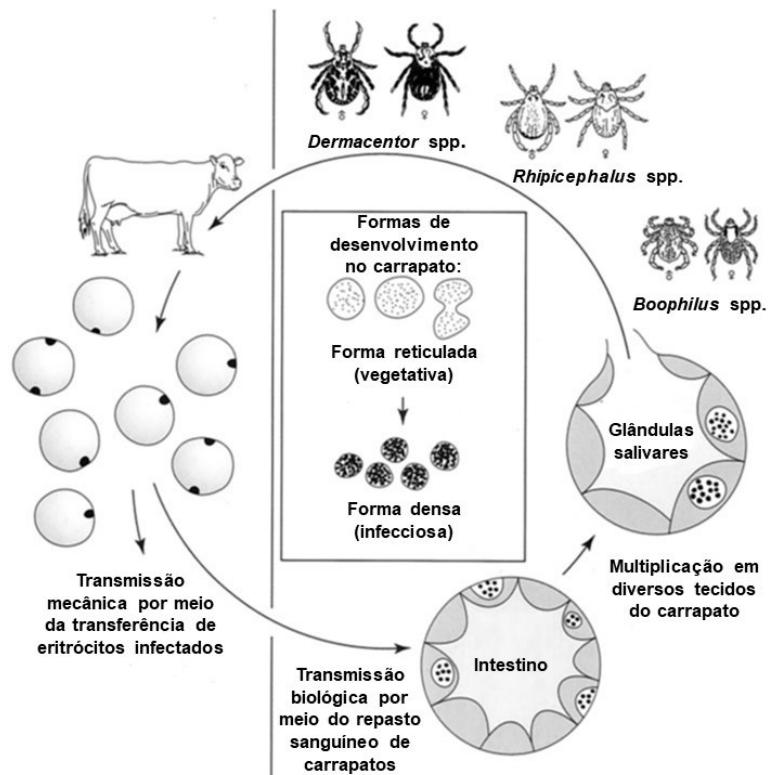
O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale*, esquematizado na Figura 2, se inicia quando o carrapato ingere eritrócitos infectados durante o repasto sanguíneo de hospedeiros infectados. A riquetsia então entra no epitélio do intestino médio e ali passa pelo primeiro ciclo de replicação. Em seguida, migra para o epitélio das glândulas salivares do carrapato, onde sofre o segundo ciclo de replicação. Nas glândulas salivares, a bactéria tem acesso a saliva, onde é facilmente disseminada para o próximo hospedeiro durante o repasto sanguíneo do carrapato (BATTILANI et al., 2017).

Nos carrapatos, *A. marginale* se desenvolve dentro de colônias (ou vacúolos) ligadas à membrana das células. A primeira forma de desenvolvimento da riquetsia é a forma reticulada, ou também chamada de vegetativa, que se reproduz por fissão binária. Essa forma reticulada então se transforma em uma forma densa, que é a forma infecciosa capaz de sobreviver fora das células hospedeiras por um período de tempo limitado (KOCAN et al., 2010).

Dentro de eritrócitos bovinos, a bactéria se desenvolve dentro de corpos de inclusões, também chamados de corpos iniciais, ligados à membrana. O número de eritrócitos parasitados cresce de forma exponencial. Os corpos de inclusões podem conter de 4 a 8 riquetsias e serem encontrados em até 70% ou mais de eritrócitos durante a fase aguda da infecção. Numa tentativa de diminuir a infecção, eritrócitos infectados são fagocitados por células reticuloendoteliais bovinas (KOCAN et al., 2010).

A infecção apresenta um período pré-patente de 7 a 60 dias, dependendo da dose de riquetsia. O animal que sobrevive a infecção aguda torna-se persistentemente infectado, sendo agora um reservatório de *A. marginale* (KOCAN et al, 2003; BATTILANI et al., 2017).

Figura 2. Ciclo de desenvolvimento de *Anaplasma marginale* em bovinos e carrapatos. Eritrócitos bovinos infectados são ingeridos por carrapatos durante o repasto sanguíneo. O primeiro sítio de infecção são as células no intestino do carrapato. Em seguida diversos tecidos se infectam, incluindo as glândulas salivares, onde a bactéria pode ser transmitida ao bovino. *A. marginale* passa por duas formas de desenvolvimento dentro do carrapato. A forma reticulada (vegetativa) é vista inicialmente e se reproduz por fissão binária. A forma reticulada então se transforma na forma densa, que é a forma infecciosa.



Fonte: Adaptado de KOCAN et al., 2003.

1.1.3 Sintomatologia e diagnóstico

Em animais jovens (até oito meses de idade) a doença se apresenta geralmente de forma subclínica devido à resistência inata. Já os animais adultos apresentam maior incidência e sinais clínicos mais graves. Na fase aguda, observa-se prostração progressiva, febre, perda de peso, icterícia, hepatoesplenomegalia, ocorrência de abortos e morte. Os animais também podem desenvolver anemia hemolítica, que ocorre devido a ação de macrófagos na tentativa de remover os eritrócitos infectados do sangue. A hemólise ocorre tanto de forma extravascular como intravascular, sendo mais intensa em animais esplenectomizados. Os animais que sobrevivem a essa fase da doença tornam-se cronicamente infectados e desenvolvem uma bacteremia cíclica (DOYLE et al., 2016). No estágio avançado da doença, o bovino geralmente desenvolve atonia gastrointestinal, estase do rúmen e constipação devido à desidratação e à perda de peso. Alguns animais ainda sofrem com déficits neurológicos. A taxa de mortalidade para adultos é cerca de 50-60% (KOCAN et al., 2010).

O diagnóstico para a anaplasmoze bovina pode ser feito com base na localização geográfica, estação do ano e presença de sinais clínicos observados nos animais. A confirmação do diagnóstico deve ser feita a partir de testes laboratoriais, como a avaliação em microscopia de luz de esfregaços sanguíneos, testes sorológicos ou moleculares (KOCAN et al., 2010).

Durante a fase aguda da doença, *A. marginale* pode ser facilmente identificada por meio de esfregaço sanguíneo podendo ser observada infectando até 50% dos eritrócitos. No entanto, na fase crônica, a baixa parasitemia torna difícil a identificação da bactéria por esse método, sendo necessárias técnicas moleculares (KOCAN et al., 2010; DOYLE et al., 2016).

O teste de aglutinação em cartão baseia-se na reação de anticorpos da amostra de soro do animal e antígenos (suspensão de partículas de *A. marginale*). Quando positivo, há a formação de uma aglomeração (aglutinação) característica do antígeno. Esse teste é sensível, rápido e pode ser realizado em campo. Porém, reações não-específicas podem ocorrer. Além disso, a interpretação dos resultados é bastante subjetiva (OIE, 2012).

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) é um teste imunozimático altamente sensível que permite a detecção de anticorpos específicos. Proteínas da superfície de *A. marginale*, as chamadas Proteínas Principais de Superfície (MSP), podem ser utilizadas como antígeno em testes de ELISA apresentando altos níveis de sensibilidade e especificidade, como a MSP1a, MSP2 (ARAÚJO et al., 2005), MSP5 (MELO et al., 2007).

O teste de ELISA competitivo tem sido muito utilizado para o diagnóstico em vários ruminantes (KOCAN et al., 2010). Esse teste, desenvolvido por Knowles em 1996, baseia-se no uso de um anticorpo monoclonal, chamado de ANAF16C1. Esse anticorpo reconhece a proteína MSP5 em *A. marginale* (KNOWLES et al., 1996). No entanto, devido à alta conservação do gene de MSP5, é possível que este teste também possa reconhecer anticorpos contra outros organismos do gênero *Anaplasma* em bovinos infectados (DREHER et al., 2005; KOCAN et al., 2015).

Outro teste de ELISA, desenvolvido três anos depois por Morzaria, foi baseado em MSP5 recombinante para detecção indireta de anticorpos contra *A. marginale* (MORZARIA et al., 1999). Esse teste está comercialmente disponível, porém ainda não foi realizada nenhuma avaliação quanto à uma possível reatividade cruzada com outras espécies de *Anaplasma* (KOCAN et al., 2010).

Métodos de diagnóstico baseados em ácidos nucleicos são altamente específicos, pois permitem a identificação da espécie do organismo. Devem ser usados como um meio de diagnóstico definitivo quando testes sorológicos exigem a confirmação da espécie. No entanto, não são ensaios práticos para se utilizar quando há um grande número de animais (KOCAN et al., 2015).

1.1.4 Resposta imune e proteínas principais de superfície

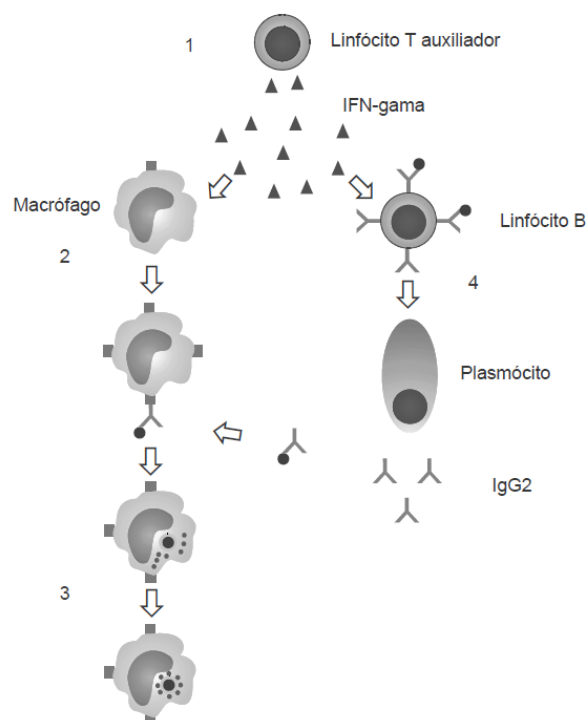
O mecanismo de defesa de bovinos contra *A. marginale*, esquematizado na Figura 3, induz a resposta imune do tipo humoral e celular.

Na presença da riquétsia, antígenos da bactéria ativam células apresentadoras de antígenos (APC) e estas produzem interleucina 12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ). Tais citocinas ativam linfócitos T auxiliares (CD4+) (BROWN; BARBET, 2016), que irão produzir ainda mais IFN- γ . IFN- γ então induz

linfócitos B a produzir IgG2. Essa imunoglobulina é capaz de neutralizar corpúsculos iniciais de *A. marginale* e promover fagocitose por macrófagos. É possível também que esses anticorpos promovam o bloqueio da entrada da riquetsia nos eritrócitos por meio da opsonização da bactéria ainda no meio extracelular (BROWN, 2012). Além disso, IgG2 está relacionada ao controle da riquetsemia aguda e da anemia (ARAÚJO et al., 2003).

IFN- γ ainda é capaz de ativar e estimular macrófagos a produzir óxido nítrico (NO) (BROWN, 2012), que tem ação tóxica sobre a bactéria, auxiliando na eliminação desta no meio intracelular. Ainda, IFN- γ pode estimular a expressão de receptores de Fc de anticorpos, o que facilita a fagocitose e a fusão fagossomo-lisossomo (ARAÚJO et al., 2003).

Figura 3. Resposta imune celular e humoral de bovinos contra *Anaplasma marginale*. Linfócitos T auxiliares, estimulados por antígenos de *A. marginale*, produzem interferon- γ (IFN- γ), o qual atua sobre macrófagos e linfócitos B. (2) Sobre macrófagos, IFN- γ induz a expressão de receptores Fc, facilitando a fagocitose. (3) IFN- γ também é capaz de estimular a fusão fagossomo-lisossomo. (4) IFN- γ ainda estimula a produção de IgG2 por linfócitos B. Esse anticorpo é importante na opsonização da bactéria na fagocitose.



Fonte: ARAÚJO et al., 2003.

Anticorpos neutralizam os corpúsculos iniciais de *A. marginale* a partir da sua interação com as Proteínas Principais de Superfície (MSPs) (ARAÚJO et al., 2003; BROWN; BARBET, 2016). Por desempenharem papéis fundamentais na sobrevivência da riquetsia, como aderência e invasão dos eritrócitos e transporte de nutrientes, essas proteínas se encontram expostas na superfície da bactéria, o que faz com que elas sejam facilmente reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro (ARAÚJO et al., 2003).

A membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* apresentam seis MSPs já identificadas: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (BATTILANI et al., 2017).

MSP1 é um complexo formado por duas proteínas, MSP1a de 105 kDa e MSP1b de 100 kDa, ligadas covalentemente por pontes dissulfeto (ARAÚJO et al., 2003). Sabe-se que essas proteínas atuam como adesinas, portanto apresentam papel fundamental no processo de invasão de *A. marginale* à membrana dos eritrócitos do bovino. Foi visto ainda que a MSP1a é uma adesina para células do carrapato, estando envolvida na sobrevivência da bactéria nesse vetor (de la FUENTE et al., 2010; BATTILANI et al., 2017). Soros de bovinos imunizados previamente com MSP1 nativa apresentaram títulos de anticorpos semelhantes contra MSP1a e MSP1b, predominando a classe IgG (BROWN et al. 2001).

MSP2 é umas das proteínas imunodominantes de superfície de *A. marginale*. É encontrada como monômeros ou multímeros ligados por pontes dissulfeto. A partir de análises de transcritos de MPS2, foi observado uma região hipervariável flanqueada por regiões conservadas. O mesmo foi observado para outra espécie de *Anaplasma*, *A. phagocytophila*. O que indica que essa proteína tenha grande importância na sobrevivência dessas bactérias (ARAÚJO et al., 2003). Bovinos imunizados com MSP2 nativa foram protegidos contra desafio apresentando atraso até ausência completa da parasitemia (PALMER et al., 1988).

MSP3 é outra proteína imunodominante da superfície de *A. marginale* (ARAÚJO et al., 2003). A imunização de bovinos com MSP3 nativa gerou um retardo no surgimento da riquetsemia após desafio, porém não houve diferença no pico de parasitemia ou no grau de anemia (PALMER; McELWAIN, 1995).

MSP4 é uma proteína altamente conservada encontrada na membrana interna e externa da bactéria (ARAÚJO et al., 2003). Bovinos imunizados com

MSP4 nativa foram protegidos contra desafio de *A. marginale* (PALMER; McELWAIN, 1995).

MSP5 é também uma proteína altamente conservada. É encontrada como monômeros e dímeros na membrana de *A. marginale* (ARAÚJO et al., 2003). A imunização de bovinos com MSP5 nativa não foi capaz de proteger o animal contra o desafio (PALMER; McELWAIN, 1995).

1.1.5 Controle e prevenção

As medidas de controle para a anaplasmose bovina variam de acordo com o local de ocorrência da parasitose, sendo uma área endêmica ou não (KOCAN et al., 2015), e incluem o controle do artrópode transmissor, a administração de antibióticos e a vacinação (KOCAN et al., 2010).

O controle do carrapato é feito a partir de aplicações repetidas de carrapaticidas (AUBRY; GEALE, 2011). No entanto, o controle dos artrópodes não impede totalmente a transmissão de *A. marginale*, visto que sua transmissão ainda pode ocorrer de forma mecânica (KOCAN et al., 2010).

A quimioprofilaxia baseia-se na utilização de drogas específicas em doses subterapêuticas e pode ser iniciada em animais a partir de 30 dias de vida. Para a anaplasmose bovina, consiste em 2-4 aplicações de subdoses do antibiótico tetraciclina com intervalos de 21 dias via intramuscular. Essa estratégia permite que o animal adquira a infecção sem apresentar sinais clínicos ou que apresente apenas sinais brandos (GONÇALVES et al., 2000). Entretanto, a quimioterapia é cara, o que torna difícil sua aplicação em larga escala. Além disso, o uso intensivo de antibióticos pode aumentar a incidência de cepas resistentes (KOCAN et al., 2010).

Ainda, a vacinação tem sido uma forma efetiva e de baixo custo para o controle da anaplasmose bovina, porém o controle é feito apenas de forma parcial. As vacinas utilizadas atualmente se dividem em dois grandes grupos: as que utilizam organismos mortos e vivos. Ambos os tipos consistem no uso de eritrócitos bovinos infectados como uma fonte para obter antígeno de *A. marginale*. A imunidade induzida por essas vacinas é capaz de proteger o animal de desenvolver a doença clínica, mas não é capaz de impedir que o mesmo se infecte

persistentemente com *A. marginale*. O que torna o animal um reservatório para a transmissão mecânica e biológica de *A. marginale*, contribuindo para sua disseminação (KOCAN et al., 2010).

Existem três estratégias para a utilização de vacinas vivas. A primeira consiste na infecção proposital do bovino com eritrócitos infectados com *A. marginale* seguido de tratamento com baixas doses de tetraciclina durante a fase inicial da infecção. Esse tipo de estratégia exige supervisão de um veterinário, o que torna o procedimento caro. Além disso, em grandes rebanhos, há grande dificuldade no acompanhamento do animal. A segunda estratégia baseia-se na utilização de cepas atenuadas de *A. marginale* a partir de passagens da bactéria em ovelhas ou veados ou após irradiação gama. Entretanto, esse tipo de abordagem pode causar reações pós-vacinação, como redução da produção de leite, febre, icterícia, morte, podendo até causar o desenvolvimento da doença clínica. A terceira estratégia constitui na inoculação dos animais com *A. centrale*. Foi observado que essa espécie de *Anaplasma* é menos patogênica para o bovino e capaz de induzir imunidade protetora contra *A. marginale*. No entanto, foram observados animais esplenectomizados e adultos imunizados com esse tipo de vacina desenvolvendo anaplasnose grave. Além disso, vacas leiteiras de alto desempenho se mostraram severamente afetadas após a infecção por *A. centrale* (KOCAN et al., 2003).

A primeira vacina morta para o controle da anaplasnose baseava-se no uso de *A. marginale*, obtida a partir de eritrócitos hemolisados, como um antígeno. Porém, por ser uma formulação demasiadamente contaminada com o estroma de eritrócitos, resultou no desenvolvimento de isoanticorpos nos bovinos vacinados. Posteriormente, esse problema foi resolvido a partir da purificação de *A. marginale* de eritrócitos. No entanto, essa estratégia é de alto custo (KOCAN et al., 2010).

1.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área da ciência que se caracteriza pela utilização de átomos e moléculas com o intuito de criar produtos com estruturas funcionais em escala nano que possam ser úteis em diversos campos da ciência. O termo "nano" é de origem grega que significa "anão" (ZDROJEWICZ et al., 2015). Na

escala conhecida como nano, 1 nm equivale a 10^{-9} m e a nanotecnologia utiliza geralmente produtos com comprimentos que não excedam 100 nm pelo menos em uma direção (FERREIRA; RANGEL, 2009).

A primeira pessoa a considerar a nanotecnologia como uma iniciativa de pesquisa promissora foi o físico americano Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de física, em 1959 (ABIODUN-SOLANKE et al., 2014; ZDROJEWICZ et al., 2015), mas foi só em 1974 que o termo foi empregado pelo japonês Norio Taniguchi (ABIODUN-SOLANKE et al., 2014).

A nanomedicina é a ciência que consiste em usar nanopartículas na prevenção, diagnóstico e tratamento de diversas doenças (ABIODUN-SOLANKE et al., 2014). É com certeza uma das principais áreas de interesse dentro da nanotecnologia, visto que muitos produtos criados a partir da nanotecnologia já foram amplamente aceitos como métodos analíticos e materiais biocompatíveis, ou seja, não provocam reações inflamatórias em organismos vivos (ZDROJEWICZ et al., 2015).

1.2.1 Nanotubos de carbono

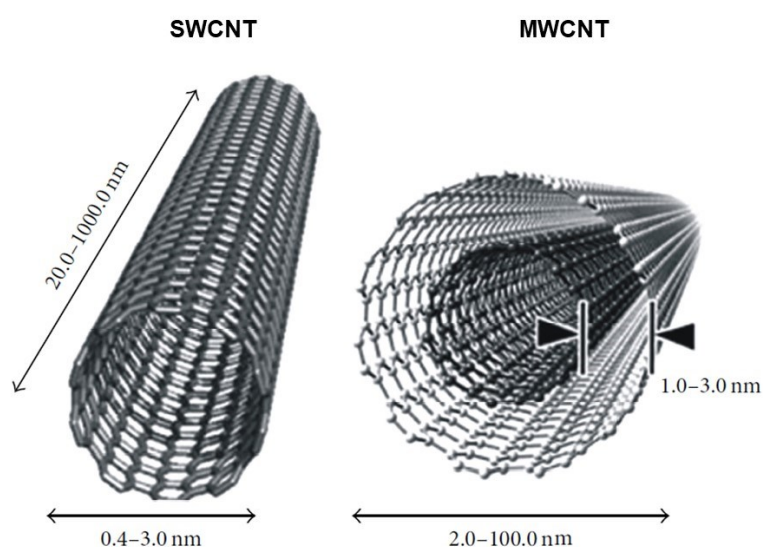
Nanofilamentos de carbono oco têm sido observados desde a década de 1950 (HIRLEKAR et al., 2009; ZHANG; ZHANG; WEI, 2017), porém a descoberta dos nanotubos de carbono (CNTs) é atribuída ao físico japonês Sumio Iijima da *Nippon Electric Company*. Em 1991 foram descobertos os de parede múltipla (IIJIMA, 1991) e em 1993 os de parede simples (IIJIMA; ICHIHASHI, 1993).

Os CNTs são alótropos de carbono de forma tubular. As ligações presentes são do tipo sp^2 e cada átomo de carbono se liga a outros três, formando arranjos hexagonais (HIRLEKAR et al., 2009). As ligações fortes C-C híbridas sp^2 presentes em sua composição, lhe dão uma incrível resistência mecânica, tornando-o um dos materiais mais fortes já encontrados no mundo (ZHANG; ZHANG; WEI, 2017).

Os CNTs podem ser classificados de acordo com o número de camadas de folhas de grafeno em os nanotubos de carbono de parede única (*Single-Walled Carbon Nanotubes* - SWCNT) que apresentam um diâmetro de 0,4-3 nm (RASTOGI et al., 2014; Li et al., 2017) e em nanotubos de carbono de parede múltipla (*Multi-Walled Carbon Nanotubes* - MWCNT) com a camada exterior apresentando um

diâmetro de 2-100 nm e a interior um diâmetro de 1-3 nm (RASTOGI et al., 2014). Ambos as estruturas estão representadas na Figura 4.

Figura 4. Nanotubos de carbono. (a) Nanotubo de carbono de parede única, (b) nanotubo de carbono de parede múltipla.



Fonte: RASTOGI et al., 2014.

Os SWCNTs apresentam uma única camada de grafeno, menor acúmulo no organismo vivo, exigem um catalisador para sua síntese, requerem um controle adequado sobre o crescimento e a condição atmosférica – o que faz com que sua síntese em massa seja difícil –, têm um menor nível de pureza, podem apresentar defeitos durante a funcionalização e podem ser facilmente torcidos. Em contrapartida, os MWCNTs apresentam múltiplas camadas de grafeno, maior acúmulo no organismo vivo, podem ser produzidos sem catalisador, sua síntese em massa é fácil, têm um nível de pureza maior, apresentam menor chance de defeito e não podem ser facilmente torcidos (HIRLEKAR et al., 2009).

Três características importantes – a ampla área de superfície, a alta estabilidade química e a capacidade de penetrar diretamente nas células – fazem com que o CNT seja um método excelente para a entrega de drogas nas células, podendo ser conjugado com uma grande variedade de moléculas de interesse, como proteínas, anticorpos, DNA, enzimas, entre outras (HE et al., 2013).

1.2.3 Internalização celular

CNTs puros são insolúveis em meio aquoso e não possuem afinidade pelas células. No entanto essas características podem ser modificadas por um processo chamado de funcionalização (RASTOGI et al.; 2014). A funcionalização consiste na modificação superficial do CNT com moléculas hidrofílicas após sua síntese (COSTA et al., 2016). As estratégias para a funcionalização da superfície de CNT incluem a funcionalização covalente e a não covalente. O processo de funcionalização torna essas nanopartículas capazes de atravessar a membrana das células e, além disso, facilita a conjugação de moléculas de interesse na sua superfície ou nas extremidades (RASTOGI et al., 2014).

Alguns outros fatores provavelmente ainda irão influenciar o processo de internalização de CNT pelas células. Três parâmetros são cruciais: o grau de dispersão, a formação de complexos supramoleculares (acoplamento com proteínas e ácidos nucleicos ou adsorção de proteínas da matriz extracelular) e comprimento do CNT. Outros parâmetros parecem influenciar na internalização de forma mais branda, como o diâmetro, a quiralidade e o número de camadas (RAFFA et al., 2010).

A endocitose e a difusão passiva já foram descritos na literatura como sendo mecanismos de internalização celular para SWCNT (RAFFA et al., 2010; LI et al., 2017) assim como para MWCNT (RASTOGI et al 2014), como esquematizado na Figura 5.

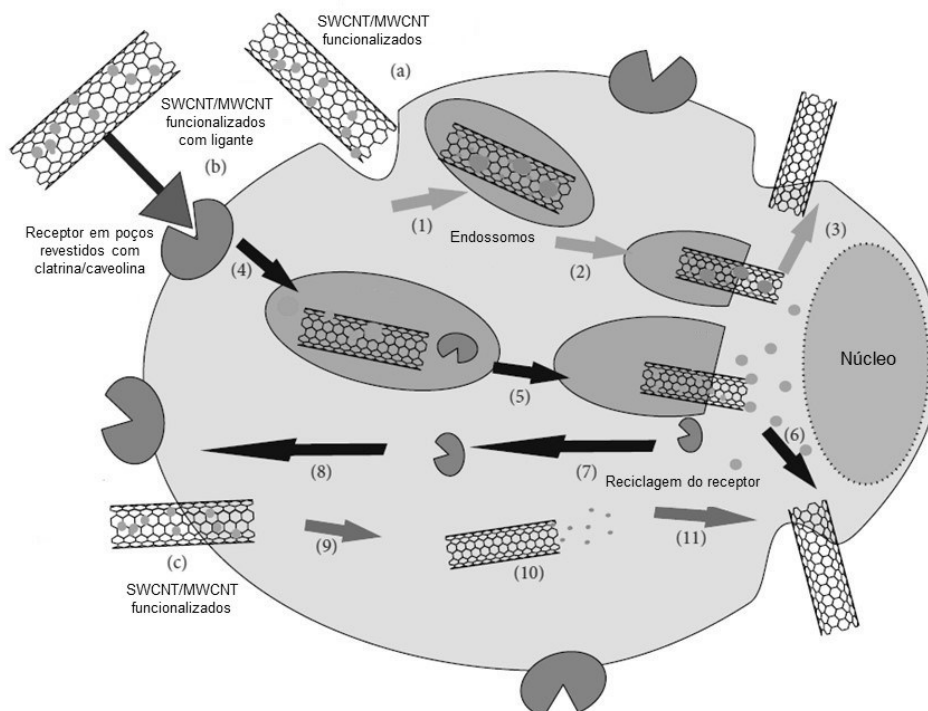
A endocitose é um mecanismo de internalização celular dependente de energia que consiste na absorção de material extracelular por meio de vesículas (ou endossomos) formadas a partir da invaginação da membrana plasmática. A formação dessas vesículas para a internalização de CNTs parece ser dependente de clatrina (RASTOGI et al 2014; COSTA et al., 2016) e caveolina (RASTOGI et al 2014).

A endocitose pode ocorrer de forma independente de receptores (Figura 5 (a)), uma pequena porção da membrana plasmática sofre invaginação até envolver completamente o CNT conjugado à molécula de interesse para dentro da célula. Os endossomos então se fundem com os lisossomos, o que leva à libertação da molécula antes conjugada ao CNT pelas lisozimas. (RASTOGI et al 2014).

A endocitose de CNTs pode ainda ser mediada por receptor (Figura 5(b)). O CNT conjugado à molécula de interesse se liga ao receptor transmembranar e desencadeia seu próprio englobamento por vesículas revestidas de clatrina. Após sua entrada na célula, o receptor se dissocia do complexo devido à queda do pH. Em seguida, os receptores são libertados e os endossomos se fundem com os lisossomos. A ação das lisozimas irá então libertar a molécula antes conjugada ao CNT. Os receptores livres serão reciclados e retornarão para a membrana plasmática para mediar a internalização de outros CNTs (RASTOGI et al 2014).

Além disso, CNTs podem ser internalizados de forma independente de endocitose (Figura 5 (c)). Dessa forma, há uma translocação direta de CNTs através da membrana plasmática para o citoplasma sem consumo de energia. Esse mecanismo pode ser chamado "*nanoneedle*" (Em português, mecanismo de nanoagulha) (RASTOGI et al 2014; COSTA et al., 2016).

Figura 5. Vias de internalização celular de nanotubos de carbono (CNTs). (a) endocitose não mediada por receptor: (1) membrana que rodeia os CNT funcionalizados acoplados a substâncias, (2) internalização e (3) liberação da substância; (b) endocitose mediada por receptor: (4) a membrana engloba o complexo receptor-CNT formando endossomos seguido de internalização, (5) liberação da substância e (6, 7, 8) regeneração do receptor; (c) via independente de endocitose: (9) penetração direta do CNT funcionalizado acoplado a substância e (10) liberação da substância.



Fonte: Adaptado de RASTOGI et al., 2014.

1.2.4 Utilização de nanotubos de carbono como carreador vacinal

O uso de um sistema de entrega em composições vacinais pode influenciar significativamente na eficácia da vacina, alcançando a especificidade do alvo, controlando o tempo e a quantidade liberada da formulação, reduzindo a resposta imune não específica e aumentando a imunogenicidade específica desejada (SCHEINBERG, et al., 2013).

Os CNTs possuem diversas características que os tornam excelentes materiais para composições vacinais. A forma de agulha dos CNTs proporciona propriedades físico-químicas únicas, além de permitir que eles penetrem de forma eficiente nas células e se acumulem em compartimentos intracelulares, atuando como um “depósito intracelular” e proporcionando uma reposta imune mais duradoura. Ainda, a ampla área superficial de CNTs permite a conjugação de inúmeras moléculas de interesse. Dessa forma, uma ampla quantidade de moléculas insolúveis, de baixa biodistribuição e incapazes de atravessar membranas biológicas podem ainda assim serem utilizadas na terapêutica (COSTA et al., 2016). Além disso, essas nanopartículas são capazes de proteger as moléculas a elas acopladas contra a degradação enzimática (WU et al., 2008) e não são imunogênicos por si só, ou seja, nenhuma resposta imune específica a elas foi observada (GOTTARDI; DOURADINHA, 2013).

Quando CNTs conjugados a moléculas de interesse são internalizados por células do tipo APCs do sistema imunológico, tais como macrófagos e células dendríticas, inicia-se um processo crucial para desencadear a resposta imune, chamado de apresentação de antígenos. Essas células então processam as moléculas incorporadas aos CNTs e as apresentam às células T através dos complexos de superfície MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I ou classe II (GOTTARDI; DOURADINHA, 2013). A rápida e eficiente internalização facilitada pelos CNTs, portanto, pode induzir ambos tipos de respostas tanto mediadas por anticorpos quanto por células T CD4+ ou TCD8+ de maneira antígeno-específica (FARIA et al., 2014).

Por esses motivos os CNTs vêm se mostrando uma ferramenta interessante para o desenvolvimento de vacinas e têm sido utilizados com sucesso em diversos estudos (FARIA et al., 2014, HASSAN et al., 2016a; CALEGARI et al., 2017).

1.3 Formulação vacinal nanoestruturada contra *A. marginale*

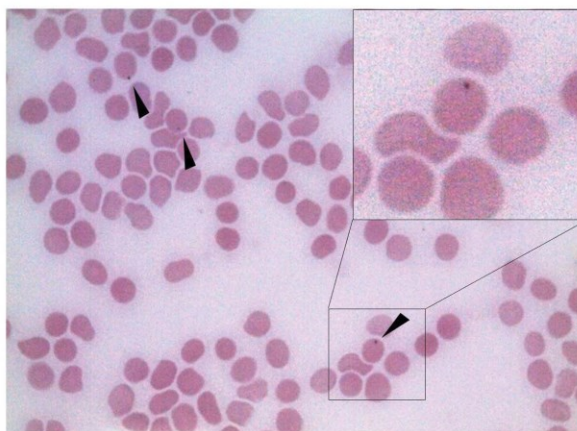
Em um estudo prévio publicado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (SANTOS, et al., 2012) peptídeos miméticos à proteína MSP1a de *A. marginale* foram selecionados por meio da tecnologia de *Phage Display* e da utilização de um anticorpo monoclonal 15D2 anti-MSP1a reativo à esta proteína.

Análises de alinhamento evidenciaram a sequência consenso SxSSQSEASTSSQLGA. Esta sequência corresponde a repetições em tandem localizadas na região N-terminal de MSP1a e podem ser consideradas parte da região antigênica. 43,6% das 39 sequências peptídicas selecionadas apresentaram o motivo crítico STSSxL. Baseando-se nestes resultados, dois peptídeos foram quimicamente sintetizados: um deles baseado no motivo crítico STSSQL (Am1 - Peptídeo sintético de *A. marginale* 1) e o outro baseado na sequência consenso alinhada à sequência MSP1a original SEASTSSQLGA (Am2 - Peptídeo sintético de *A. marginale* 2).

Por meio de testes de ELISA utilizando o soro de 24 animais infectados e 52 animais não infectados ambos os peptídeos mostraram reatividade e foram capazes de distinguir o soro desses animais apresentando sensibilidade de 96% (Am1) e 100% (Am2).

Pela primeira vez, a partir da análise de eritrócitos infectados por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real), foi demonstrada a capacidade de *A. marginale* infectar camundongos, como mostrado na Figura 6. Em seguida, foi avaliada a capacidade desses mesmos peptídeos de protegerem animais modelos contra a infecção pelo patógeno. Para isso, duas formulações vacinais contendo os peptídeos sintéticos Am1 e Am2 foram utilizadas na imunização de camundongos Balb/C (injeções intraperitoneais) que foram, então, desafiados com *A. marginale* (SANTOS, et al., 2013).

Figura 6. Infecção por *Anaplasma marginale* em eritrócitos de camundongos. Eritrócitos de camundongos 30 dias após serem submetidos à injeção de *A. marginale* (3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale*).



Fonte: SANTOS, et al., 2012.

Camundongos imunizados com os peptídeos e desafiados com *A. marginale* apresentaram peso corporal estável, um número reduzido de eritrócitos infectados e nenhuma mortalidade. Em contrapartida, os animais do grupo controle apresentaram perda de peso, um número maior de eritrócitos infectados e mortalidade entre 15 a 29%. Foi visto ainda que a imunização induziu respostas mediadas por IgG2a e IgG1, seguidas pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, foi demonstrada a eficiência da proteção proveniente da imunização com os peptídeos sintéticos contra a infecção por *A. marginale* mediada por repostas humorais e celulares em modelo murino.

Acreditamos que a resposta imune humoral e celular observada possa ser potencializada com a utilização de um sistema nanoestruturado de entrega de antígenos, conferindo uma maior bioestabilidade intracelular aos peptídeos e garantindo uma resposta imune mais efetiva.

Nosso grupo de colaboradores possui uma recente patente em que MWCNT foram utilizados como carreadores vacinais em modelos animais e foram altamente eficazes na entrega do antígeno proteico, neste caso um antígeno tumoral. O nanocomplexo vacinal foi rapidamente internalizado pelas células do sistema imune dos animais e foi bastante eficaz na indução da resposta imune celular (tanto células T CD4⁺ quanto CD8⁺) e humoral, protegendo os animais contra a

ocorrência e o desenvolvimento de um tipo de tumor altamente agressivo, o melanoma (FARIA, et al., 2014).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do peptídeo sintético Am1 acoplado a nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com grupamentos ácidos (-COOH) de induzir a produção de anticorpos antígeno-específicos contra *A. marginale* em comparação à vacinação com o peptídeo administrado sem as nanopartículas como carreadores.

2.2 Objetivos específicos

- Acoplar o peptídeo sintético Am1 à superfície de nanotubos de carbono;
- Caracterizar a interação MWCNT-Am1;
- Avaliar a resposta imune humoral dos animais vacinados com as formulações contendo as Nanopartículas como carreadores;
- Avaliar a capacidade protetora do complexo Nanopartícula-Peptídeo em animais desafiados com *A. marginale*.

3 Material e Métodos

3.1 Bactéria e peptídeo sintético

A cepa de *A. marginale* foi obtida a partir de amostras de sangue coletadas para diagnóstico de rotina de bovinos infectados naturalmente, alojados na Unidade de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brasil, e o diagnóstico foi confirmado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e análise por microscopia de esfregaço sanguíneo (parasitemia > 30% dos glóbulos vermelhos). As amostras foram armazenadas a - 80°C e, no momento do desafio, foram descongeladas em temperatura ambiente e inoculadas nos animais.

A sequência peptídica foi construída com base no motivo STSSQL como descrito anteriormente por Santos, P. S. et al; 2012. O peptídeo foi sintetizado quimicamente (Gen-Script USA Inc.) com 26 resíduos e acoplado a BSA (Soroalbumina bovina) para aumentar a imunogenicidade. Am1 contém três repetições da sequência motivo (STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL), separadas por um 4-aa linker (GGGS).

3.2 Síntese e funcionalização dos MWCNT

Os MWCNTs foram sintetizados no Laboratório de Nanomateriais do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira, por meio do método de deposição química da fase de vapor.

A dispersão e funcionalização foram realizadas no Laboratório de Química de Nanoestruturas de Carbono (LQN) do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN) sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Clascídia Aparecida Furtado. A funcionalização foi feita por meio de ataque químico em solução ácida, utilizando uma mistura concentrada de ácido sulfúrico e ácido nítrico. Assim, foram obtidos MWCNTs funcionalizados com grupamentos oxigenados ácidos (COOH) de até 600 nm de comprimento, 10-40 nm de diâmetro médio e pureza de 95%.

3.3 Adsorção do peptídeo ao MWCNT

O acoplamento não covalente dos peptídeos aos MWCNTs foi realizado de acordo com protocolo previamente descrito por FARIA et al., 2014 com algumas alterações. 10 µg do peptídeo sintético Am1 e 20 µg de MWCNT foram solubilizados e submetidos a ultrassonicação em banho de gelo por 60 minutos. A interação MWCNT-Am1 foi caracterizada por determinação do potencial Zeta, espectroscopia no infravermelho e microscopia de transmissão.

3.4 Caracterização da interação MWCNT-Am1

3.4.1 Medidas de Potencial Zeta (ξ)

A estabilidade da interação MWCNT-Am1 foi avaliada a partir da medição do Potencial Zeta no equipamento ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., UK) do CDTN/CNEM. As medidas foram realizadas em triplicata, a 25 °C, utilizando-se cubetas apropriadas.

3.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A presença dos grupos funcionais foi verificada a partir de medidas de espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. As medidas foram realizadas no espectrômetro de FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific™) acoplado ao microscópio Centaurus IR (Thermo Scientific™), do Laboratório LQN do CDTN/CNEM. Os espectros foram obtidos em modo transmitância com 64 varreduras na faixa entre 4000 e 650 cm⁻¹.

3.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A imagens de microscopia de transmissão foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 – SpiritBiotwin FEI – 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram analisadas em grades de cobre

recobertas com filme de carbono (*holey-carbon grids*) depois de secas em estufa a vácuo.

3.5 Animais

Os experimentos foram conduzidos em camundongos BALB/c fêmeas com 5-6 semanas de idade de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo nº 031/17.

Os animais foram mantidos em condições padrões (22 ± 1 °C, $60\pm 5\%$ de umidade e ciclo claro/escuro de 12 horas) com comida e água a vontade no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - UFU.

3.6 Imunização e desafio

Os animais foram divididos em seis grupos de 10 camundongos cada. As imunizações foram realizadas a partir de três injeções subcutâneas em intervalos de 15 dias. No grupo 1, os animais foram inoculados com água para injeção (Grupo Controle); no grupo 2 com 20 µg de MWCNT (Grupo MWCNT); no grupo 3 com 10 µg do peptídeo sintético Am1 (Grupo Am1); no grupo 4 com 10 µg do peptídeo sintético Am1 acoplado a 20 µg de MWCNT (Grupo MWCNT-Am1); no grupo 5 com 10 µg do peptídeo sintético Am1 mais adjuvante de Freund (Grupo Am1-FrA) e no grupo 6 com 10 µg do peptídeo sintético Am1 acoplado a 20 µg de MWCNT mais adjuvante de Freund (Grupo MWCNT-Am1-FrA). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 15, 30, 45 e 75 após cada imunização para a análise da resposta imune humoral, por meio da produção de anticorpos antígeno-específicos, por ELISA.

Duas semanas após a última imunização, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados e tiveram os baços retirados e armazenados a -80 °C. Os animais restantes foram desafiados com 3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale* via subcutânea para a avaliação do potencial de proteção das formulações propostas. Os animais foram observados diariamente quanto à

mortalidade e alteração do peso corporal. Os animais sobreviventes foram eutanasiados 30 dias após o desafio e analisados quanto à proteção promovida pelos antígenos vacinais.

3.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Para a análise da produção de IgG Anti-*A. marginale* foi realizado o teste de ELISA no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU. Placas de microtitulação Maxisorp™ de noventa e seis poços (NUNC, NY) foram revestidas com 1 µg/poço do peptídeo Am1. Após incubação overnight a 4 °C, a reação foi bloqueada com BSA a 5% em PBS (Tampão fosfato-salino). As amostras de soro foram diluídas em duplicatas a 1:50 em tampão de bloqueio e incubadas a 37 °C durante 1 hora para quantificações IgG total e durante 2 horas para quantificações de IgG1 e IgG2a. Utilizou-se BSA como controle negativo. Após lavagem, foram adicionados IgG anti-mouse marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído a 1:5000 ou IgG1 anti-mouse ou IgG2a anti-mouse biotinados (Caltag Lab. Inc., CA) diluídos a 1:8000 e 1:2000 respectivamente, e incubados durante 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados e, para IgG1 e IgG2a, foram incubados com estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluída 1:1000 por 1h a temperatura ambiente. Os ensaios foram revelados com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) SigmaFast™ (Sigma-Aldrich) e lidos a 492 nm.

3.9 Esfregaço sanguíneo

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e os esfregaços de sangue foram feitos imediatamente após a eutanásia dos animais. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas em metanol, coradas com Giemsa e analisadas quanto à presença de *A. marginale* nos eritrócitos em Microscopia de Luz à ampliação de 100x em imersão em óleo. Foram examinados 10 campos isolados em cada lâmina, a fim de estimar a porcentagem de eritrócitos parasitados (PPE), como descrito por COETZEE et al., 2005.

3.10 Análise Estatística

O teste *one-way* ANOVA foi utilizado para comparar as curvas da mudança de peso. A comparação dos níveis IgG foi feita por meio do teste *two-way* ANOVA. O programa gráfico utilizado foi *GraphPad Prism 7.0* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de $p < 0,05$).

4 Resultados e Discussão

As estratégias de prevenção da anaplasmose atualmente ainda são limitadas e dependem do controle do artrópode transmissor, administração de antibióticos e o uso de uma vacina viva. O controle do artrópode transmissor não é suficiente uma vez que pode levar a resistência acaricida entre as populações de carrapatos. A administração de antibiótico é difícil e cara em grandes rebanhos (SUAREZ; NOH, 2011), além de aumentar a incidência de cepas resistentes. A vacina viva apenas impede o surgimento dos sintomas clínicos, mas não é capaz de impedir que o animal de infecte persistentemente, tornando-o um reservatório para *A. marginale* (KOCAN, et al., 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger o gado e impedir a transmissão é altamente necessário.

MSP1 é um heterodímero formado por duas proteínas, MSP1a e MSP1b. MSP1a é codificada pelo gene *mSP1a* e tem papel fundamental na adesão e invasão de *A. marginale* à membrana dos eritrócitos do bovino e células do carrapato, além de estar envolvida na imunidade à infecção em bovinos. MSP1b é codificada por pelo menos dois genes, *mSP1β1* e *mSP1β2*, e também está envolvida na adesão e invasão de *A. marginale* à membrana dos eritrócitos do bovino (KOCAN, et al., 2004). Foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa através da tecnologia *Phage Display* que o epítipo imunodominante STSSxL, é um motivo crítico para o reconhecimento de anticorpos em bovinos. Além disso, é capaz de reagir com quase 100% dos soros testados de bovinos infectados (SANTOS, et al., 2012). Dessa forma, acreditamos que possa ter importante função na interação parasito-hospedeiro, podendo ser alvo de interesse no desenvolvimento de imunidade contra a bactéria.

Os MWCNTs foram utilizados em diversos estudos como sistema de entrega de antígenos de forma a aumentar a resposta imune contra agentes infecciosos ou câncer (FARIA et al., 2014, CALEGARI et al., 2016; HASSAN et al., 2016b). Os MWCNTs são de certa forma mais fáceis de produzir em larga escala quando comparados aos SWCNTs. Além disso, apresentam maior estabilidade, sendo potencialmente ótimos candidatos para o uso em aplicações biológicas (DESHPANDE; MAZUMDAR, 2012). Devido à sua forma tubular, os MWCNTs são

capazes de serem internalizados nas células de forma independente ou dependente de energia (HASSAN et al., 2016b).

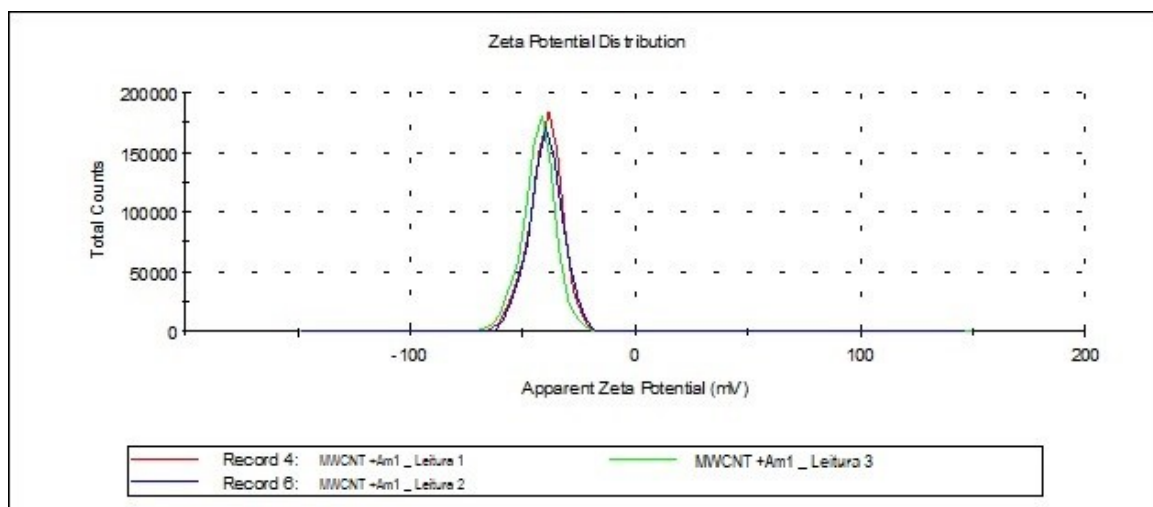
4.1 Interação MWCNT-Am1

4.1.1 Análise de estabilidade

O Potencial Zeta (ξ) pode ser utilizado como uma medida da carga superficial de compostos e partículas. Essa medida é influenciada pelas interações entre o composto e o meio dispersante, dessa forma qualquer fator que possa alterar a dispersabilidade da amostra irá alterar o Potencial Zeta, como o pH, a concentração e o grau de dispersabilidade. Assim, o Potencial Zeta é um bom indicador da estabilidade de suspensões. Quanto maior for seu valor em módulo, maior é a estabilidade das partículas, pois as cargas irão se repelir mutuamente, o que impedirá a aglomeração.

A Figura 7 mostra as curvas de distribuição do Potencial Zeta obtidas em triplicata para a interação MWCNT-Am1. Observamos uma média de - 40,9 mV, o que indica alta estabilidade em meio aquoso. Com um valor de Potencial Zeta em módulo acima de 25 mV, a interação apresenta pouca tendência à aglomeração (MIRHOSSERI et al.,2008).

Figura 7. Curvas de distribuição do Potencial Zeta (ξ) da interação MWCNT-Am1 medido em triplicata. O ξ médio foi - 40,9 mV.



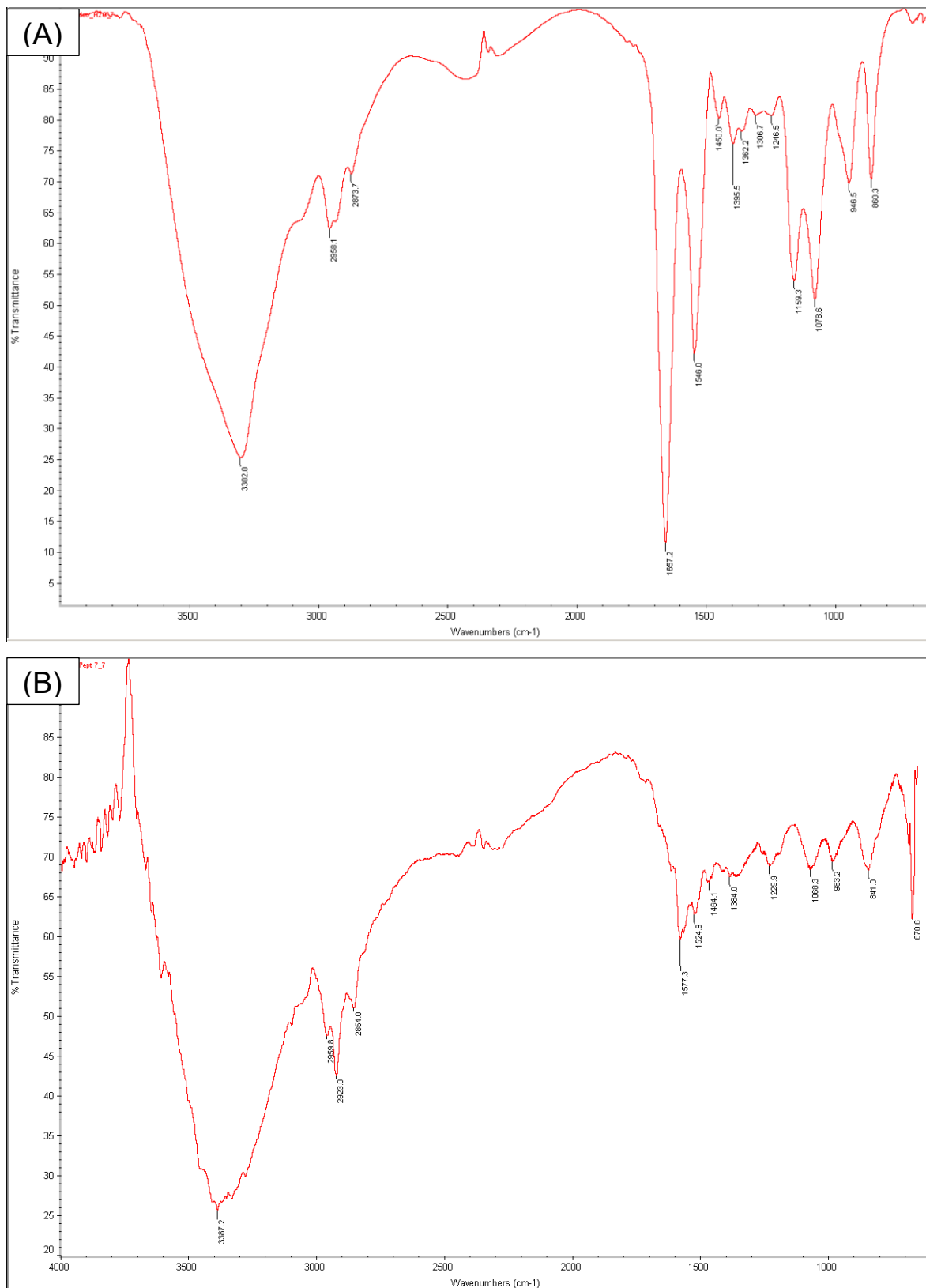
4.1.2 Análise vibracional por absorção no infravermelho

A análise vibracional por absorção no infravermelho foi realizada para a identificação de grupos funcionais nas amostras.

Na Figura 8A temos o espectro do peptídeo sintético Am1. É possível observar uma banda forte e larga na região 3302 cm^{-1} está associada a vibração de deformação axial da ligação O-H e a banda na região 2958 cm^{-1} a deformação axial da ligação C-H alifático (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006), ambas bandas são características do espectro do BSA (MUKHERJEE, et al., 2008). A banda na região 1657 cm^{-1} está associada a vibração de estiramento predominantemente da ligação C=O de amida primária que surge quando se formam as ligações peptídicas. Há uma pequena contribuição das vibrações de estiramento da ligação C-N e deformação angular N-H. A banda na região 1546 cm^{-1} está associada a vibração de deformação angular da ligação C-N da amida secundária, com uma pequena contribuição das vibrações de estiramento da ligação C-N e deformação C=O. A banda na região 1450 cm^{-1} está associada a deformação angular da ligação CH_2 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006), podendo ser atribuída ao aminoácido glutamina e/ou serina do peptídeo Am1. A banda na região 1306 cm^{-1} está associada a vibração da ligação C-H do aminoácido glutamina do peptídeo Am1 (BARTH, 2000). A banda na região 1078 cm^{-1} está associada a vibração da ligação C-O do aminoácido treonina presente no peptídeo Am1 (BARTH, 2007).

Na Figura 8B temos o espectro da interação MWCNT-Am1. Quando deuteradas, as bandas da amida primária e secundária se deslocam para números de onda mais baixos (BARTH, 2007). Esse efeito é observado pelo deslocamento das bandas para as regiões 1577 e 1524 cm^{-1} respectivamente. Esse deslocamento em conjunto com a diminuição na intensidade sugerem uma forte interação não-covalente entre o peptídeo sintético Am1 e os MWCNTs, indicando uma possível formação de ligações de hidrogênio entre o peptídeo e os grupos oxigenados presentes nos MWCNT. A banda na região 1384 cm^{-1} está associada a deformação angular da ligação O-H e a banda na região 1068 cm^{-1} a deformação axial da ligação C-O, ambas associadas a grupos ácidos carboxílicos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006) presentes das paredes dos MWCNTs.

Figura 8. Espectro de infravermelho na região espectral entre 4000 e 650 cm⁻¹. (A) Espectro do peptídeo sintético Am1; (B) Espectro da interação MWCNT-Am1.



A Tabela 1 apresenta os comprimentos de onda e atribuições para as principais bandas observadas para o peptídeo sintético Am1 (BSA) e MWCNT-Am1.

Tabela 1. Atribuições das bandas de absorção dos espectros de FT-IR.

Banda observada (cm⁻¹)	Atribuição
3302	Deformação axial da ligação O-H do BSA
2958	Deformação axial da ligação C-H alifático do BSA
1657	Amida I, estiramento da ligação C=O
1577	Amida I deuterada
1546	Amida II, deformação angular da ligação C-N
1524	Amida II deuterada
1450	Deformação angular da ligação CH ₂ em glutamina e/ou serina
1384	Deformação angular da ligação O-H de grupos carboxílicos
1306	Modo vibracional da ligação C-H em glutamina
1078	Estiramento da ligação C-O em treonina
1068	Deformação axial da ligação C-O de grupos carboxílicos

4.1.3 Análise morfológica

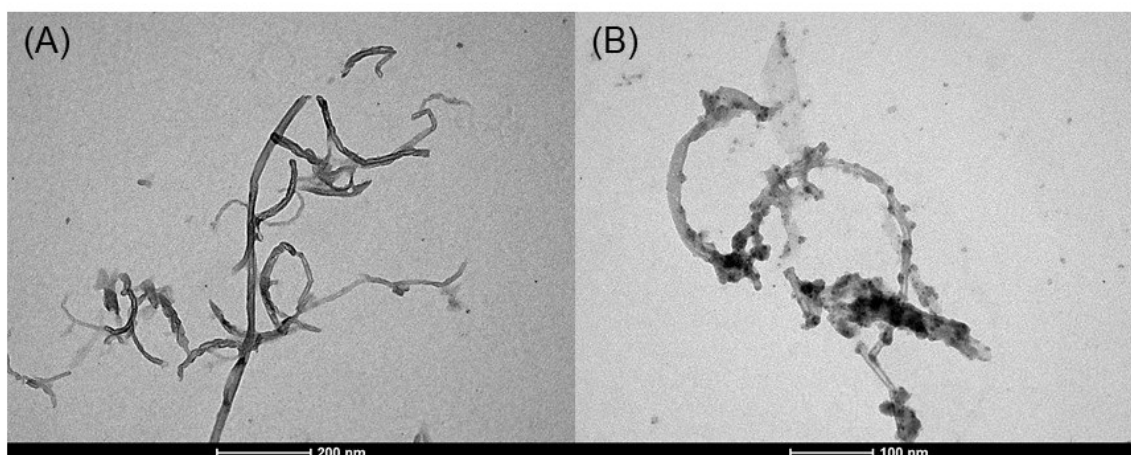
A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é muito efetiva na análise da morfologia de CNTs devido a sua capacidade de alta resolução. Dessa forma é possível analisar a pureza, a qualidade e a presença de aglomerados de uma amostra de CNT.

Na figura 9A, podemos observar MWCNTs puros dispersos em água. Na Figura 9B, podemos identificar pequenos aglomerados em torno dos MWCNTs, ilustrando a adsorção do peptídeo Am1 na superfície dos MWCNTs. Essas imagens mostram que não há seletividade quanto ao sítio ligante, o peptídeo adsorve ao longo das paredes assim como nas extremidades dos tubos quando interage com o MWCNT. Ainda, podemos notar que, na presença do peptídeo, os MWCNTs apresentam-se ainda mais dispersos, sendo possível observar nanotubos individuais isolados.

Observamos ainda que os MWCNTs presentes na interação apresentam um comprimento máximo de até 600 nm e 45% deles apresentam comprimento inferior a 200 nm. Resultados similares, foram reportados anteriormente (FARIA et al, 2014). Embora o mecanismo de internalização dos CNTs nas células não esteja totalmente estabelecido, é geralmente reconhecido que a capacidade de CNTs de

ultrapassar membranas biológicas depende em grande parte de sua superfície química e comprimento (RAFFA et al., 2010). CNTs de comprimento menor parecem ter uma maior integração para o interior de macrófagos e fagócitos quando comparados aos de maior comprimento (FIRME; BANDARU, 2010). Além disso, FARIA et al, 2014 mostrou, através de imagens de MET, a preferência de células dendríticas para internalização de MWCNTs encurtados. Cerca de 80% dos MWCNTs encontradas no interior das células apresentaram comprimento de no máximo 300 nm.

Figura 9. Imagens de MWCNT obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) Somente MWCNT após processo de purificação e oxidação; (B) Imagem evidenciando interação entre os MWCNTs e o peptídeo Am1.

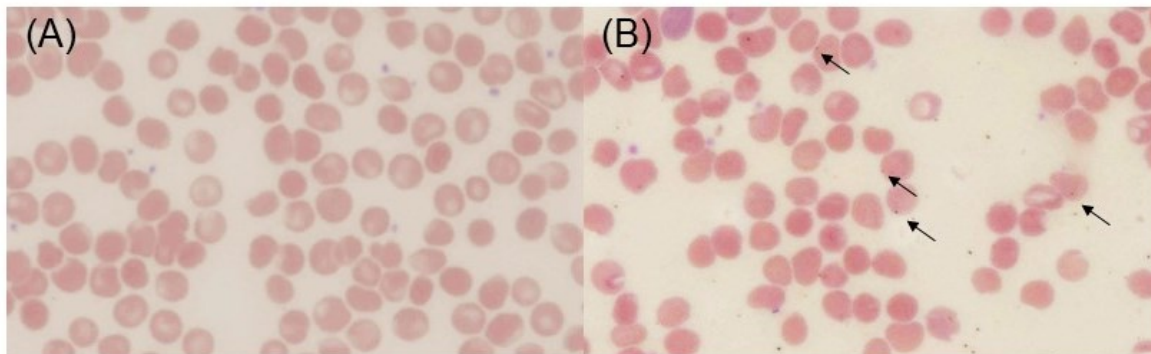


4.2 Estabelecimento da infecção por *A. marginale*

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em duplicata em momentos diferentes e obtiveram resultados semelhantes.

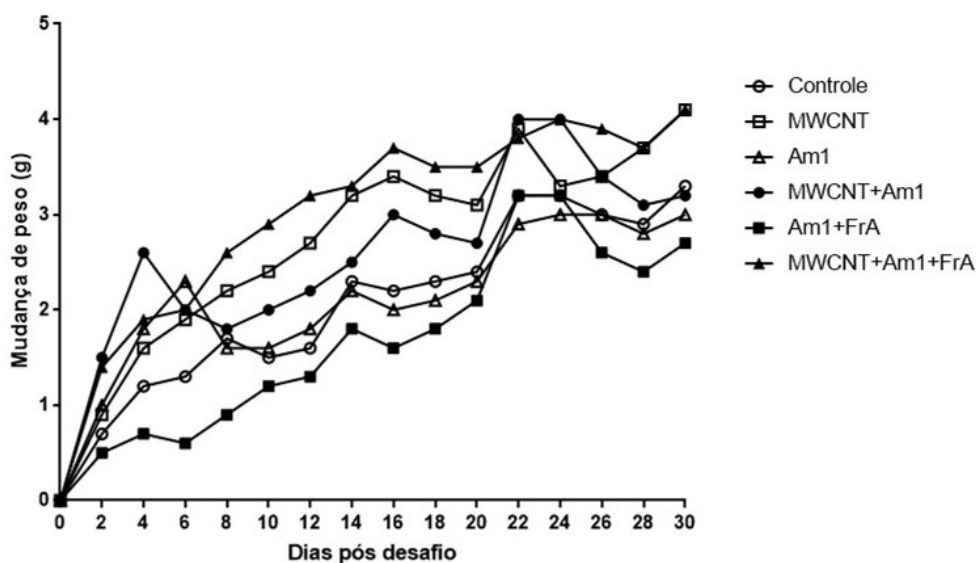
O desafio foi feito com 3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale* e, a fim de avaliar a capacidade de *A. marginale* infectar eritrócitos murinos e confirmar a infecção, foram realizados esfregaços sanguíneos com amostras de sangue de animais livres de infecção (Figura 10A) e de animais desafiados com *A. marginale* (Figura 10B). Nossos resultados evidenciaram a presença da bactéria na margem interior dos eritrócitos dos camundongos 30 dias após o desafio, confirmando assim a infecção. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo anterior feito pelo nosso grupo de pesquisa (SANTOS, et al., 2013).

Figura 10. Eritrócitos murinos infectados com *Anaplasma marginale*. Esfregaços sanguíneos de camundongos corados com Giemsa e visualizados em microscopia de luz 100X em imersão em óleo. (A) Eritrócitos de camundongos livres de infecção; (B) Eritrócitos de camundongos 30 dias após serem submetidos à injeção de *A. marginale* (3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale*). Setas indicam a bactéria *A. marginale* localizada na periferia de eritrócitos.



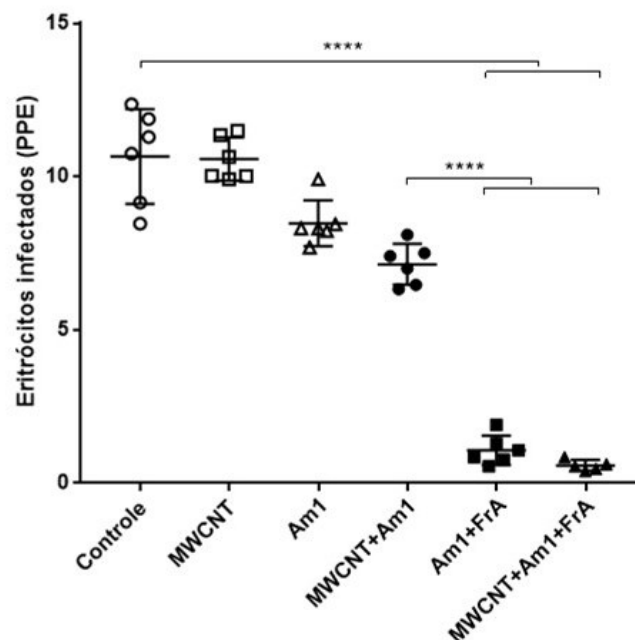
Após o desafio, os animais foram monitorados durante 30 dias quanto a mudança de peso e a sobrevivência. A Figura 11, mostra o curso do ganho de pesos dos animais. Não houve diferença estatisticamente significativa na mudança de peso, todos os grupos ganharam peso ao longo dos experimentos. Todos os animais sobreviveram à infecção.

Figura 11. Mudança de peso de camundongos BALB/c imunizados contra *Anaplasma marginale* após desafio. Não houve diferença estatisticamente significativa no ganho de peso dos animais.



Os animais não imunizados apresentaram uma alta parasitemia, com uma porcentagem de eritrócitos infectados em torno de 9 a 12,3% (Figura 12). As imunizações com Am1+FrA e com MWCNT+Am1+FrA foram capazes de reduzir a parasitemia a níveis quase indetectáveis, com uma porcentagem de eritrócitos infectados em torno de 0,4 a 2%. A diferença entre esses grupos e os não imunizados foi altamente significativa ($p < 0,0001$). A diminuição de eritrócitos infectados de animais imunizados com o peptídeo sintético Am1 também foi observado por SANTOS, et al., 2013. A formulação contendo MWCNT+Am1 na ausência do adjuvante foi também capaz de reduzir a parasitemia, apresentando uma porcentagem de eritrócitos infectados em torno de 6,3 a 7,5%. Contudo, esta queda não se mostrou estatisticamente relevante. Esses resultados mostram a importância de se utilizar o adjuvante mesmo na presença do MWCNT para que a resposta imune seja potencializada (SILVESTRE, et al., 2014, VERSIANI, et al., 2017).

Figura 12. Eritrócitos murinos infectados imunizados contra *Anaplasma marginale*. Eritrócitos infectados de todos os grupos 30 dias após desafio com *A. marginale* representados em porcentagem de eritrócitos parasitados (PPE). ****Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).



4.3 Avaliação da resposta imune humoral anti-MSP1a específica

A produção de IgG total de cada grupo está representada na Figura 13. As amostras de soro dos animais não mostraram reatividade ao BSA usado como controle no ensaio de ELISA. Como esperado, os grupos imunizados com Am1+FrA e MWCNT+Am1+FrA apresentaram alta reatividade contra o peptídeo sintético Am1 durante as imunizações (dia 30 e 45) e depois do desafio (dia 75) em comparação com o grupo controle não imunizado ($p < 0,0001$), demonstrando que o peptídeo manteve sua imunogenicidade mesmo após a sua adsorção na superfície dos MWCNTs. Animais imunizados somente com MWCNT não apresentaram nenhuma produção de IgG anti-Am1, indicando que os níveis de IgG observados nos grupos imunizados com MWCNT+Am1 e MWCNT+Am1+FrA são específicos para o peptídeo Am1. Estes resultados corroboram com os de trabalhos anteriores que demonstraram preservação da conformação original do antígeno após associação com MWCNTs, além de nenhuma reatividade cruzada contra os MWCNTs (SILVESTRE, et al., 2014, VERSIANI, et al., 2017). Embora os grupos imunizados com Am1+FrA e MWCNT+Am1+FrA tenham apresentado altos níveis de anticorpos IgG, não foi observada nenhuma diferença estatística entre esses grupos. Resultado semelhante foi observado por SILVESTRE, et al., 2014 quando imunizou animais com uma proteína recombinante de MSP1a com e sem MWCNT.

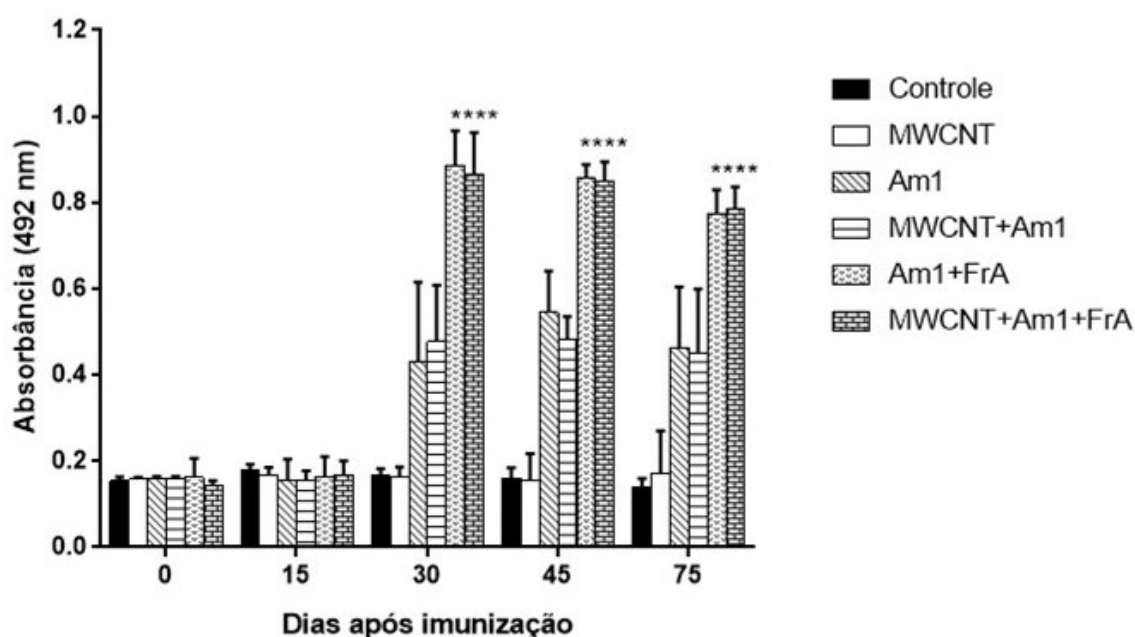
No dia 15 após primeira dose das formulações vacinais, nenhum dos grupos apresentaram reatividade ao peptídeo Am1. Esses resultados se mostram diferentes dos de SANTOS, et al, 2013, que logo após a 1ª imunização, observou considerável produção de IgG. No entanto, são semelhantes a outros estudos nos quais animais foram imunizados contra anaplasnose com peptídeos recombinantes de MSP, onde foi observado nenhuma ou pouquíssima reatividade (KAWASAKI, et al., 2007; SILVESTRE, et al., 2014; SILVESTRE, et al., 2018).

No dia 75, 30 dias após o desafio, os animais revelaram uma ligeira queda no nível de anticorpos. Isso pode estar associado a fase final na infecção. A bactéria *A. marginale* é capaz de infectar eritrócitos murinos, porém não de forma eficiente como faz em bovinos. Logo não é eficaz no estabelecimento de uma infecção a longo prazo. Como podemos observar na figura 12, o número de eritrócitos infectados em animais imunizados é quase nulo 30 dias após desafio. Nesse

período, o sistema imune já não produz anticorpos IgG como na fase inicial, demonstrando um declínio no nível dessa imunoglobulina (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

De forma geral, o perfil de anticorpos IgG total após as imunizações mostrou uma imunogenicidade consideravelmente mais elevada para o peptídeo sintético Am1 isoladamente ou acoplado ao MWCNT em associação ao Adjuvante de Freund em comparação ao grupo controle. Isso corrobora com o fato de que a imunidade protetora em bovinos imunizados com MSP1 nativa esteja fortemente associada a respostas humorais, a qual inibe a ligação de *A. marginale* aos eritrócitos, neutralizando a invasão da bactéria às células do hospedeiro (ARAÚJO et al., 2003). Além disso, os MWCNTs não mostraram reatividade, confirmando o fato de não serem imunogênicos e atuarem apenas como veículos de entrega para o antígeno no interior da célula (SILVESTRE, et al., 2014, VERSIANI, et al., 2017).

Figura 13. Indução da produção de anticorpos IgG total anti-MSP1a. Perfil de anticorpos IgG total de camundongos BALB/c imunizados via subcutânea três vezes com água de injeção (Controle), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), peptídeo Am1 (Am1), MWCNT + Am1, Am1 + adjuvante de Freund (FrA) ou MWCNT + Am1 + FrA, determinado por ELISA. Os animais foram desafiados com 3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale* 45 dias após primeira imunização. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 15, 30, 45 e 75 dias após a primeira imunização. ****Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).



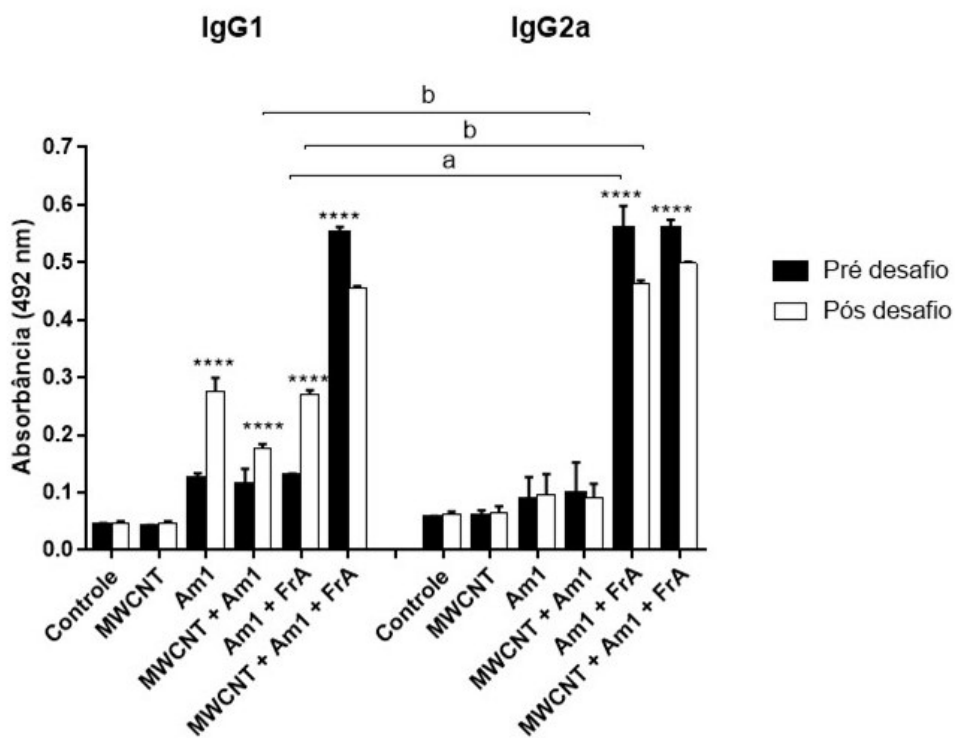
O perfil de reatividade contra o peptídeo sintético Am1 de isotipos de IgG, IgG1 e IgG2a, foram comparados antes e após o desafio em todo os grupos experimentais como mostra a figura 14.

Como esperado, antes do desafio, o grupo imunizado com Am1+FrA apresentou nível maior de IgG2a do que de IgG1 ($p < 0,0001$), assim como após o desafio. O grupo imunizado com MWCNT+Am1+FrA apresentou altos níveis de ambos IgG1 e IgG2a antes e após o desafio, não apresentando diferença significativa entre os níveis de produção desses isotipos. De forma semelhante, MWCNT+Am1 também não apresentou diferença significativa entre os isotipos. O fato de que grupos imunizados com Am1 isoladamente ou acoplado aos MWCNT em associação ao Adjuvante de Freund induziram IgG2a indica que o peptídeo sintético é o responsável por provocar a produção deste isotipo, corroborando com o trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa que também encontrou alto nível de IgG2a em animais imunizados com esse peptídeo na ausência de um carreador (SANTOS, et al., 2013). O alto nível de anticorpos IgG1 em animais imunizados com o peptídeo acoplado ao MWCNT associado ou não ao Adjuvante de Freund está certamente associado à presença dos MWCNTs e sua via de entrada nas células. Os MWCNTs são capazes de serem internalizados por APCs e, assim, o antígeno acoplado a eles serão apresentados ao sistema imunológico adaptativo principalmente através da associação a moléculas de MHC de classe II. Além disso, essas nanopartículas apresentam a capacidade de penetração passiva através das membranas celulares, realizando assim a entrega do antígeno no interior de células não APCs. Nesses casos, o antígeno será associado a moléculas de MHC de classe I, levando à uma resposta imune Th1/Th2 mais citotóxica com a participação de células CD8+ (VERSIANI, et al., 2017).

Comparando pré e pós desafio, em relação a IgG1, os grupos imunizados com Am1, MWCNT+Am1, Am1+FrA apresentaram um aumento no nível desse isotipo após o desafio ($p < 0,0001$), como esperado para o controle da infecção. O grupo imunizado com MWCNT+Am1+FrA também mostrou diferença significativa, porém, de forma oposta, sendo menor o nível de IgG1 após o desafio. Em relação a IgG2a, os grupos imunizados com Am1+FrA e MWCNT+Am1+FrA também apresentaram uma diminuição no nível desse isotipo após o desafio. Esta queda seguiu o mesmo perfil de produção de anticorpos IgG total, e está possivelmente

relacionada a ineficiência da bactéria em manter infecção em eritrócitos murinos a longo prazo.

Figura 14. Indução da produção de isotipos de IgG antes e após o desafio. Perfil de IgG1 e IgG2a de camundongos BALB/c antes e 30 dias após desafio com 3×10^5 eritrócitos infectados com *A. marginale*, determinado por ELISA. ****Diferença estatisticamente significativa entre pré e pós desafio ($p < 0,0001$), ^aDiferença estatisticamente significativa entre IgG1 e IgG2a no pré desafio; ^bDiferença estatisticamente significativa entre IgG1 e IgG2a no pós desafio.



De forma geral, os camundongos imunizados com o peptídeo sintético Am1 isoladamente ou acoplado ao MWCNT em associação ao Adjuvante de Freund exibiram alta produção de anticorpos IgG2a após imunização, o que é corroborado por um estudo realizado em bovinos que mostra que a proteção total contra a infecção por *A. marginale* é alcançada com o desenvolvimento de uma resposta específica de IgG2 antes do desafio (BROWN, et al., 1998). Um perfil de resposta estabelecido pelo isotipo IgG2a é considerado como uma evidência de resposta imune do tipo Th1 (OÑATE, et al., 2003). Células do tipo Th1 têm papel fundamental na ativação de macrófagos, induzindo a fusão fagossomo-lisossomo. Outra função desse tipo de célula é auxiliar na estimulação de linfócitos B a produzirem anticorpos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Anticorpos contra MSP1 atuam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a rápida eliminação de *A. marginale*. Além disso, são capazes de bloquear a invasão dos eritrócitos pela bactéria (KAWASAKI, et al., 2007; BROWN, 2012). Células T CD4+ têm papel fundamental na proteção contra MSP1a, sendo importante na ativação de macrófagos, que assim produzirão óxido nítrico (NO) (SANTOS, et al., 2013). Isso é coerente com a teoria de que uma resposta imune caracterizada pela produção de IFN- γ e IgG2 é importante para a efetividade da imunidade protetora contra *A. marginale* (ARAÚJO et al., 2003).

Neste trabalho avaliamos a resposta humoral de camundongos contra *A. marginale* e, em breve (já em andamento), avaliaremos também a resposta celular estabelecendo o perfil das citocinas produzidas nos esplenócitos desses animais com o objetivo de compreendermos de fato o papel dos MWCNTs como carreadores. Os CNTs podem ser internalizados pelas células de forma ativa ou passiva (LI et al., 2017) e, com isso, é possível que o sistema imune seja estimulado de forma diferente de como acontece com o uso de um adjuvante isoladamente. Os níveis de algumas citocinas moduladoras da resposta de células B podem revelar pontos importantes deste trabalho, como a queda da parasitemia observada dos grupos imunizados com o peptídeo Am1 acoplado ao MWCNT e, além disso, possivelmente a via de preferência na internalização dos MWCNTs.

5 Conclusão

A interação MWCNT-Am1 apresentou-se estável e com pouca tendência a aglomeração. Sugere-se que essa interação ocorra de forma não-covalente por ligações de hidrogênio entre o peptídeo sintético Am1 e os grupos oxigenados presentes nos MWCNT. Ainda, o peptídeo sintético Am1 não mostrou seletividade em relação ao sítio ligante ao MWCNT, sendo capaz de se ligar ao longo das paredes e nas extremidades dos MWCNTs.

Após a caracterização da interação, os animais foram eficientemente imunizados e desafiados. Os experimentos foram conduzidos em dois momentos diferentes, mostrando resultados semelhantes.

Não houve nenhuma diferença significativa no ganho de peso entre os grupos e nenhuma mortalidade.

O peptídeo Am1 manteve sua imunogenicidade mesmo após a sua adsorção na superfície dos MWCNTs, mostrando alta reatividade durante as imunizações. Além disso, os MWCNTs não mostraram reatividade, confirmando o fato de não serem imunogênicos e atuarem apenas como veículos de entrega para o antígeno no interior da célula.

A imunização dos animais com o peptídeo sintético Am1 acoplado aos MWCNTs juntamente com a presença do adjuvante favoreceu uma resposta imune mais ampla do tipo Th1/Th2, com alta produção concomitante de IgG1 e IgG2a, além de aumento de IgG total. Ambas formulações, com e sem o carreador, foram capazes de reduzir a porcentagem de eritrócitos infectados de forma semelhante.

As estratégias de prevenção da anaplasiose atualmente ainda são bastante limitadas, havendo alta necessidade de desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger o gado e impedir a transmissão. Nesse trabalho, demonstramos que vacinas baseadas em epítomos selecionados corretamente e na utilização de MWCNTs como carreadores são capazes de induzir imunidade protetora contra a anaplasiose bovina, representando uma nova ferramenta na prevenção desta patologia tão importante dentro do cenário veterinário. Além disso, diante destes resultados promissores, concluímos que esta estratégia de vacinação utilizando os nanotubos de carbono pode ser usada no tratamento de outras doenças, humanas

ou animais, que necessitam de indução de uma resposta imune mediada por anticorpos específicos.

6 Considerações finais

Devido a dificuldades em extrair RNA puro e integro das amostras de baços dos animais, o protocolo de extração ainda está em processo de otimização. Em breve, com amostras de RNA de qualidade será possível realizar RT-qPCR dessas amostras e analisar a expressão de citocinas inflamatórias envolvidas na resposta precoce, como IL-10, IL-12, IL-18 e TNF- α e envolvidas na fase pós-desafio como IFN- γ e TGF- β . Verificando assim os efeitos do peptídeo sintético Am1 com Adjuvante de Freund ou acoplado ao MWCNT associado ao Adjuvante de Freund na indução de resposta específica no sistema imune dos animais imunizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIODUN-SOLANKE, I. M. F.; AJAYI, D. M.; ARIGBEDE, A. O. Nanotechnology and its Application in Dentistry. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, Ibadan, v. 4, n. 3, 2014.

<https://doi.org/10.4103/2141-9248.141951>

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.**, Campo Grande, v. 23, n. 4, p.139-148, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000400001>

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

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700016>

AUBRY, P., GEALE, D. W. A Review of Bovine Anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, Ottawa, v. 58, p. 1–30, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>

BARTH, A. The infrared absorption of amino acid side chains. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, Frankfurt, v. 74, p. 141–173, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00021-3)

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** **1767**, Stockholm, p. 1073–1101, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>

BATTILANI, M.; DE ARCANGELI, S.; BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, Bo, v. 49, p. 195–211, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021>

BROWN, W. C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T. C.; TUO, W.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. CD41 T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 Responses in Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge. **Infection And Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5406–5413, 1998.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4⁺ T Lymphocytes from Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1), a Heteromeric Complex of MSP1a and MSP1b, Preferentially Recognize the MSP1a Carboxyl Terminus That Is Conserved among Strains. **Infection And Immunity**, Pullman, v. 69, n. 11, p. 6853–6862, 2001.

<https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6853-6862.2001>

BROWN, W. C. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, Pullman, v. 35, n. 3, p. 241–252, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.002>

BROWN, W. C.; BARBET, A. F. Persistent Infections and Immunity in Ruminants to Arthropod-Borne Bacteria in the Family *Anaplasmataceae*. **Annu. Rev. Anim. Biosci**, Pullman, v. 4, p.177–97, 2016.

<https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114206>

CALEGARI, L. P.; DIAS, R. S.; OLIVEIRA, M. D.; PESSOA, C. R.; OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; SILVA, C. C.; FONSECA, F. G.; VERSIANI, A. F.; PAULA, S. O. Multi-walled carbon nanotubes increase antibody-producing B cells in mice immunized with a tetravalent vaccine candidate for dengue virus. **Nanobiotechnol**, Viçosa, v. 14, n. 61, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12951-016-0196-7>

COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M.; RURANGIRWA, F. R.; DONKERSGOED, J. V. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, Ames, v. 127, p. 61–73, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.017>

COSTA, P. M.; BOURGOGNON, M.; WANG, J. T. W.; AL-JAMAL, K. T. Functionalized carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. **Journal of Controlled Release**, London, v. 241, p. 200–219, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.033>

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; ZIVKOVIC, Z.; NARANJO, V.; ALMAZÁN, C.; ESTEVES, E.; JONGEJAN, F.; DAFFRE, S.; MANGOLD, A. J. Functional genomics and evolution of tick–*Anaplasma* interactions and vaccine development. **Veterinary Parasitology**, Stillwater, v. 167, p. 175–186, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.019>

DESHPANDE, M. S. AND MAZUMDAR, S. Sequence Specific Association of Tryptic Peptides with Multiwalled Carbon Nanotubes: Effect of Localization of Hydrophobic Residues. **Biomacromolecules**, Colaba, v. 13, p. 1410–1419, 2012.

<https://doi.org/10.1021/bm300137d>

DOYLE, R. L.; FRANÇA, R. T.; OLIVEIRA, C. B.; REZER, J. F. P.; KLAFKE, G. M.; MARTINS, J. R.; SANTOS, A. P.; DO NASCIMENTO, N. C.; MESICK, J. B.; LOPES, S. T. A.; LEAL, D. B. R.; DA SILVA, A. S.; ANDRADE, C. M. Cattle experimentally infected by *Anaplasma marginale*: Influence of splenectomy on disease pathogenesis, oxidative profile, and antioxidant status. **Microbial Pathogenesis**, Santa Maria, v. 95, p. 193e199, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.011>

DREHER, U. M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; REGULA, G.; CAGIENARD, A. Y.; STÄRK, K. D. C.; DOHERR, M. G.; FILLI, F.; HÄSSIG, M.;

BRAUN, U.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. **Veterinary Microbiology**, Zurich, v.107, p. 71–79, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.001>

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

<https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

FARIA, P. C. B.; SANTOS, L. I.; COELHO, J. P.; RIBEIRO, J. B.; PIMENTA, M. A.; LADEIRA, L. O.; GOMES, D. A.; FURTADO, C. A.; GAZZINELLI, R. T. Oxidized Multiwalled Carbon Nanotubes as Antigen Delivery System to Promote Superior CD8+ T Cell Response and Protection against Cancer. **NANOLetters**, Belo Horizonte, v. 14, n. 9, p. 5458-5470, 2014.

<https://doi.org/10.1021/nl502911a>

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: Aspectos Gerais E Potencial De Aplicação Em Catálise. **Quim. Nova**, Ondina, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700033>

FIRME, C. P.; BANDARU, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, La Jolla, v. 6, p. 245–256, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.003>

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.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100030>

GOTTARDI, R.; DOURADINHA, B. Carbon nanotubes as a novel tool for vaccination against infectious diseases and câncer. **Journal of Nanobiotechnology**, Palermo, v. 11, n.30, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-30>

HASSAN, H. A. F. M.; SMYTH, L.; WANG, J. T.-W.; COSTA, RATNASOTHY, K.; DIEBOLD, S. S.; LOMBARDI, G.; AL-JAMAL, K. T. Dual stimulation of antigen presenting cells using carbon nanotube-based vaccine delivery system for cancer immunotherapy. **Biomaterials**, London, v. 104, p. 310e322, 2016a.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.005>

HASSAN, H. A. F. M.; SMYTH, L.; RUBIO, N.; RATNASOTHY, K.; WANG, J. T.-W.; BANSAL, S. S.; SUMMERS, H. D.; DIEBOLD, S. S.; LOMBARDI, G.; AL-JAMAL, K. T. Carbon nanotubes' surface chemistry determines their potency as vaccine

nanocarriers in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, London, v. 225, p. 205–216, 2016b.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.030>

HE, H.; PHAM-HUY, L. A.; DRAMOU, P.; XIAO, D.; ZUO, P.; PHAM-HUY, C. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. **BioMed Research International**, Nanjing, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/578290>

HIRLEKAR, R.; YAMAGAR, M.; GARSE, H.; VIJ, M.; KADAM, V. Carbon Nanotubes And Its Applications: A Review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Nova Mombaim, v. 2, n. 4, 2009.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, Ibaraki, v. 354, 1991.

<https://doi.org/10.1038/354056a0>

IJIMA, S; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, Ibaraki, v. 363, 1993.

<https://doi.org/10.1038/363603a0>

KAWASAKI, P. K.; KANO, F. A.; TAMEKUNI, K.; GARCIA, J. L.; MARANA, E. R. M.; VIDOTTO, O; VIDOTTO, M. C. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). **Research in Veterinary Science**, Londrina, v. 83, p. 347–354, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.02.002>

KNOWLES, D.; ECHAIDE, S. T.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; STILLER, D.; MCELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225–2230, 1996.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, Stillwater, v. 16, n. 4, p. 698–712, 2003.

<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>

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

<https://doi.org/10.1017/S0031182003004700>

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, Stillwater, v. 167, p. 95–107, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, Stillwater, v. 34, n. 2, p. 577-586, 2015.

<https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2381>

LI, X.; DE BARROS, A. L. B.; SOARES, D. C. F.; MOSS, D. N.; ALISARAIE, L. Functionalized single-walled carbon nanotubes: cellular uptake, biodistribution and applications in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, St. John's, v. 524, p. 41–54, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.017>

MELO, E. S. P.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. N.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ELISEI, C.; MADRUGA, C. R. ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, Campo Grande, v. 27, n. 7, p. 301-306, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007000700008>

Merck Veterinary Manual. **Anaplasmosis**. Disponível em: < <http://www.merckvetmanual.com/circulatory-system/blood-parasites/anaplasmosis> >. Acesso em: 15/02/2018.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Physicochem. Eng. Aspects**, Serdang, v. 315, p. 47–56, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.007>

MORZARIA, E.P., KATENDE, J., MUSOKE, A., NENE, V., SKILTON, T., BISHOP, R. Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control on important tick-borne pathogens of cattle in Africa. **Parasitologia**, v.41, p. 73–80, 1999.

MUKHERJEE, B.; SANTRA, K.; PATTNAIK, G.; GHOSH, S. Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. **International Journal of Nanomedicine**, West Bengal, v. 3, n. 4, p. 487–496, 2008.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S3938>

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ªEd. Porto Alegre. Artmed, 2010.

OÑATE, A. A.; CÉSPEDES, S.; CABRERA, A.; RIVERS, R.; GONZÁLEZ, A.; MUÑOZ, C.; FOLCH, H.; ANDREWS, E. A DNA Vaccine Encoding Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. **Infection And Immunity**, Valdivia v. 71, n 9, p. p. 4857–4861, 2003.

<https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4857-4861.2003>

PALMER, G. H. Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: A centennial perspective. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 1, p. 75-79, 2009.

<https://doi.org/10.4102/ojvr.v76i1.68>

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

[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03123-E](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03123-E)

PALMER, G. H.; OBERLE, S. S.; BARBET, A. F.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Immunization of Cattle with a 36-Kilodalton Surface Protein Induces Protection against Homologous and Heterologous *Anaplasma marginale* Challenge. **Infection And Immunity**, Pullman, v. 56, n. 6, p. 1526-1531, 1988.

RAFFA, V.; CIOFANI, G.; VITTORIO, O.; RIGGIO, C.; CUSCHIERI, A. Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. **Nanomedicine**, Pisa, v. 5, n; 1, p. 89–97, 2010.

<https://doi.org/10.2217/nm.09.95>

RASTOGI, V.; YADAV, P.; BHATTACHARYA, S. S.; MISHRA, A. A.; VERMA, N.; VERMA, A.; PANDIT, J. K. Carbon Nanotubes: An Emerging Drug Carrier for Targeting Cancer Cells. **Journal of Drug Delivery**, Varanasi, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/670815>

SANTOS, P. S.; NASCIMENTO, R.; RODRIGUES, L. P.; SANTOS, F. A. A.; FARIA, P. C. B.; MARTINS, J. R. S.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; GOULART, L. R. Functional Epitope Core Motif of the *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Incorporation onto Bioelectrodes for Antibody Detection. **PLoS One**, Uberlândia, v. 7, n. 3, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033045>

SANTOS, P. S.; SENA, A. A. S.; NASCIMENTO, R.; ARAÚJO, T. G.; MENDES, M. M.; MARTINS, J. R. S.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R.; GOULART, L. R. Epitope-Based Vaccines with the *Anaplasma marginale* MSP1a Functional Motif Induce a Balanced Humoral and Cellular Immune Response in Mice. **PLoS One**, Uberlândia, v. 8, n. 4, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060311>

SCHEINBERG, D. A.; MCDEVITT, M. R.; DAO, T.; MULVEY, J. J.; FEINBERG, E.; ALIDORI, S. Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. **Adv Drug Deliv Rev.**, New York, v. 65, v. 15, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.013>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª Ed. New York, 2006.

SILVESTRE, B. T.; RABELO, E. M. L.; VERSIANI, A. F.; FONSECA, F. G.; SILVEIRA, J. A. G.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; RIBEIRO, M. F. B. 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**, Belo horizonte, v. 32, p. 2160–2166, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.062>

SILVESTRE, B. B.; SILVEIRA, J. A. G.; FACURY-FILHO, E. J.; CARVALHO, A. U.; VERSIANI, A. F.; ESTEVAM, L. G. T. M.; ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; RIBEIRO, M. F. B. Immune response and biochemistry of calves immunized with rMSP1a (*Anaplasma marginale*) using carbon nanotubes as carrier molecules. **Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 191-202, 2018.
<https://doi.org/10.1590/s1984-296120180029>

SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Jaboticabal, v. 7, p. 20-25, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.018>

SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, Pullman, v. 180, p. 109–125, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>

VERSIANI, A. F.; ASTIGARRAGA, R. G.; ROCHA, E. S. O.; BARBOZA, A. P. M.; KROON, E. G.; RACHID, M. A.; SOUZA, D. G.; LADEIRA, L. O.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; JORIO, A.; FONSECA, F. G. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant *Dengue virus 3* envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. **Nanobiotechnol**, Belo Horizonte, v. 1, n. 26, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s12951-017-0259-4>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE. Manual Of Diagnostic Tests And Vaccines For Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Seventh Edition, v. 1, 2012.

WU, Y.; PHILLIPS, J. A.; LIU, H.; YANG, R.; TAN, W. Carbon Nanotubes Protect DNA Strands during Cellular Delivery. **ACS Nano**, Gainesville, v. 2, n. 10, p. 2023–2028, 2008.
<https://doi.org/10.1021/nn800325a>

ZDROJEWICZ, Z.; WARACKI, M.; BUGAJ, B.; PYPNO, D.; CABAŁA, K. Medical applications of nanotechnology. **Postepy Hig Med Dosw**, Wroclaw, v. 69, p. 1196-1204, 2015.
<https://doi.org/10.5604/17322693.1177169>

ZHANG, R.; ZHANG, Y.; WEI, F. Horizontally aligned carbon nanotube arrays: growth mechanism, controlled synthesis, characterization, properties and applications. **Chem. Soc. Rev.**, Beijing, v. 46, p. 3661-3715, 2017.
<https://doi.org/10.1039/C7CS00104E>