

Ubicación de la proteína VirD4 de *Anaplasma marginale* en eritrocitos infectados mediante suero específico por inmunofluorescencia

Location of VirD4 protein of *Anaplasma marginale* in infected erythrocytes by specific serum by immunofluorescence

América Ivette Barrera-
 Molina^{1*} ,
 Sergio D Rodríguez-
 Camarillo² 

¹Universidad Autónoma del estado de Morelos, Facultad de Nutrición, Calle Ixtacihuatl 100, Vista Hermosa, CP. 62350 Cuernavaca, Morelos, México.

²Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534, Col. Progreso, CP. 62550. Jiutepec, Morelos, México.

*Autor de correspondencia: ivette.bm@gmail.com

Artículo científico

Recibido: 28 de mayo de 2019

Aceptado: 03 de agosto 2020

Como citar: Barrera-Molina AI, Rodríguez-Camarillo SD (2020) Ubicación de la proteína VirD4 de *Anaplasma marginale* en eritrocitos infectados mediante suero específico por inmunofluorescencia. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7(2): e2304. DOI: 10.19136/era.a7n2.2304

RESUMEN. Mediante el análisis del genoma de *Anaplasma marginale* se han identificado proteínas del sistema de secreción tipo IV, asociadas a la transferencia de sustratos entre bacterias y otros organismos. La proteína VirD4 de este sistema, en otros modelos bacterianos, se asocia con la translocación de proteínas y complejos proteicos involucrados en procesos biológicos que implican la interacción con células hospederas, lo que indica que en *A. marginale* podría estar asociada a la invasión y supervivencia dentro del eritrocito. Por estas razones los objetivos del presente estudio fueron analizar mediante herramientas bioinformáticas el grado de conservación de la proteína VirD4 entre diferentes cepas mexicanas, e identificar su presencia en la membrana externa en formas infectantes de *A. marginale* en eritrocitos de bovinos. El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de VirD4 mostró 100% de identidad entre los aislados. El péptido sintético ramificado diseñado con base en los análisis reaccionó con sueros de bovinos inmunes e infectados mediante ELISA. Anticuerpos específicos contra MAPVirD4 reaccionaron por inmunofluorescencia indirecta con cuerpos iniciales de *A. marginale* intraeritrocíticos. Con estos hallazgos inferimos que VirD4 es una proteína conservada que aparentemente se expresa durante la invasión a eritrocitos o es parte importante de la supervivencia de la rickettsia durante la infección, lo que nos indica que el péptido podría ser identificado por la respuesta inmune del bovino durante el proceso de infección, considerándolo como posible candidato vacunal.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*, inmunogénico, sistema de secreción, péptidos sintéticos

ABSTRACT. By analyzing the genome of *Anaplasma marginale*, proteins of the type IV secretion system, involved in the transfer of substrates between bacteria and other organisms, have been identified. In other bacterial models the VirD4 protein of this system is associated with the translocation of proteins and complexes involved in the interaction with their host cells, indicating that in *A. marginale* this protein might be associated with the invasion and survival within the erythrocyte. For these reasons the objectives of the present study were: the analysis by bioinformatic tools of the degree of conservation of the VirD4 protein between different Mexican strains, and the detection of this protein in infective forms of *A. marginale* in bovine erythrocytes. The analysis of the nucleotide and amino acid sequences of VirD4 showed 100% identity between the products. The branched synthetic peptide designed based on the analysis reacted with sera from immune and infected cattle using ELISA assays. Specific antibodies against MAP-VirD4 reacted by indirect immunofluorescence with initial bodies of intraerythrocytic *A. marginale*. With these findings we infer that VirD4 is a conserved protein that is apparently expressed during the invasion of erythrocytes or is an important element during infection, which indicates that the peptide could be considered as a possible vaccine candidate against bovine anaplasmosis.

Key words: *Anaplasma marginale*, immunogenic, secretion system, synthetic peptides

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina, es una enfermedad hemobacteriana infecciosa que afecta a los bovinos y algunos rumiantes silvestres, causada por rickettsias del género *Anaplasma* spp. La bacteria es transmitida biológicamente por garrapatas del género *Rhipicephalus* spp. y *Dermacentor* spp. (Potgieter y van Rensburg 1987). La anaplasmosis se caracteriza por causar anemia severa, pérdida de peso, disminución en la producción de leche, ictericia y fiebre; además de abortos en el último tercio de gestación y la muerte en ausencia de tratamiento oportuno. En algunos casos los animales que presentaron una infección aguda pueden recuperarse y fungen como reservorios de la enfermedad lo que permite la transmisión a animales susceptibles (Aubry y Geale 2011). En México se considera a la anaplasmosis como responsable de hasta el 26% de la mortalidad de animales manejados en programas de mejoramiento genético (Rodríguez et al. 2009), y una pérdida económica anual estimada en más de 300 millones de pesos (Rodríguez-Vivas et al. 2017).

En diferentes países se han realizado investigaciones referentes al control de la anaplasmosis por vacunación, sin embargo, a la fecha no existe ninguna vacuna debido a la amplia diversidad antigénica y genética de *A. marginale* (Ocampo Espinoza et al. 2006). En los últimos años se han utilizado estrategias para el diseño y generación de vacunas con base en las proteínas que se encuentran en la superficie de la bacteria, identificándose proteínas homologas al Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV) descrito por primera vez en *Agrobacterium tumefaciens*; constituido por 11 proteínas codificadas por el operón virB que incluye a VirB1 - VirB11 y VirD4 los cuales se clasifican en categorías de acuerdo con sus funciones como: activación, accesorios, proteínas asociadas al phylum y de secreción (Zhao et al. 2016).

La proteína VirD4, facilita el contacto del sustrato con el canal de translocación, por lo que está clasificada dentro de los miembros de proteínas de acoplamiento o receptoras de sustrato (González-Pedrajo y Dreyfus 2003). La proteína cuenta con

los motivos funcionales Walker A y B, conservados a través de 13 genomas; estos motivos son importantes para la unión con nucleótidos y la hidrólisis del ATP, por lo que las mutaciones en estos motivos provocan pérdida en la función de translocación (Willadsen et al. 1989). También se ha reportado actividad ATPasa en *A. tumefaciens*, la cual es estimulada por DNA de cadena simple y doble (Atmakuri et al. 2003). También se identificó un homólogo a VirD4 presente en *Helicobacter pylori* necesario para la secreción de CagA por el sistema tipo IV (Stein et al. 2000), por lo que las funciones de estas proteínas no se limitan a las reacciones de transferencia de ADN, sino que tendrían un papel más general en el tráfico del sustrato a través de las maquinarias tipo IV. Con base en esta información, el objetivo del presente trabajo fue analizar la presencia y grado de conservación del gen virD4 en cepas mexicanas de *A. marginale*, mediante análisis *in silico* y su identificación en membranas de eritrocitos infectados con *A. marginale*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de muestras y extracción de ADN genómico de *A. marginale*

Se utilizaron las siguientes cepas mexicanas previamente caracterizados mediante los marcadores moleculares msp1 α y msp4: Playa Vicente, Veracruz (Mex-30-130-01); Puente de Ixtla, Mor., (Mex-17-017-01); Soto la Marina, Tamps, (Mex-28-037-01); Tlapacoyan-2, Ver. (Mex-30-184-03); Aguascalientes, Ags, (Mex-01-001-01) y Guayaboso, Tamps, (Mex-28-037-02) (Nomenclatura del INEGI de Banco de Germoplasma de la unidad de Anaplasmosis). El DNA genómico se extrajo a partir de sangre infectada de bovino (3.9×10^{10} eritrocitos infectados) mediante el Kit Ultraclean™ Blood Spin™ ADN Isolation (MO BIO) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación por PCR del gen virD4

Se diseñaron dos juegos de iniciadores basados en las secuencias reportadas en GenBank (AMF_RS09935 antes NC_004842 REGION: 1154957.1157377 mediante el programa Integrated

ADN Technologies, Inc. (IDT). Los iniciadores fueron: sentido 5'ATGCACAGTAGCTCTAATCACATAC3' y, antisentido 5'TTACGGGTTGTTCATCATCACG3', usados bajo las siguientes condiciones 1 μ L de iniciadores, 13 μ L de Taq Green (Promega), 11 μ L de agua libre de nucleasas y 1 pg de DN, utilizando el siguiente programa 95 °C 1 min; 57 °C, 75 °C 45 s. 30 ciclos; 72 °C 10 min. Los amplificones se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, los cuales se purificaron mediante el kit Wizard[®] Sv Gel and PCR Clean Up System, (Promega) y clonados mediante el kit cloneJET PCR Cloning Kit, (Thermo Fisher Scientific). El producto de la clonación también se utilizó para la transformación de células competentes *E. coli* Top10[®] 8878 Thermo-Scientific.

Secuenciación de los fragmentos amplificados

Las células transformadas *E. coli* Top10[®] positivas por PCR a *virD4*, se incubaron en 2 mL de medio LB con ampicilina (50 mg mL⁻¹) durante toda la noche a 37° C en agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 13 000 x g durante 2 min a temperatura ambiente para realizar la extracción de DNA plasmídico mediante el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep, Thermo scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se secuenciaron en ambos sentidos, utilizando oligonucleótidos del promotor T7 (sentido y antisentido) en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología IBT, UNAM, campus Morelos. Debido al tamaño de la secuencia, ésta se dividió en tres fragmentos para lograr la secuenciación completa del gen *virD4*.

Análisis *in silico* de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de *VirD4*

El porcentaje de conservación entre las secuencias obtenidas de los aislados se determinó mediante el programa ClustalW (Thompson *et al.* 1994), se utilizó el gen putativo *virD4* de *A. marginale* cepa *St. Maries* reportado en el NCBI-GENE como referencia. La secuencia deducida de aminoácidos se obtuvo a través de Swissprot Expassy (Gasteiger *et al.* 2005), utilizando la secuencia de nucleótidos de la

cepa Tlapacoyan-2 Mex-30-184-03. Posteriormente se predijeron los dominios extracelulares expuestos con el programa TMHMM (Moller *et al.* 2001) la presencia de péptido señal y la presencia de epítopos lineales tipo B mediante los programas BCEPred, ABCPred (Saha y Raghava 2004, 2006) y NETNGlyc (Gupta *et al.* 2004).

Síntesis de Péptidos a partir de la proteína *VirD4*

El péptido diseñado a partir de las ponderaciones más alta en el grado de inmunogenicidad y antigenicidad que arrojaron las herramientas computacionales ABCpred y ABCpred se sintetizó comercialmente en forma de tetrámero ramificado, mediante el sistema de Péptidos Antigénicos Múltiples (MAP'S). La síntesis se realizó por American Peptide Company, Inc. Identificado como péptido MAPVirD4.

Producción de anticuerpos específicos contra MAPVirD4

Se utilizaron para cada tratamiento 3 conejos de la raza Nueva Zelanda de dos meses de edad albergados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, en Cuernavaca, Morelos. Se mantuvieron en jaulas con agua y alimento *ad libitum*. La inmunización consistió en la mezcla de 50 μ g de tetrámero MAPVirD4 en 1 mL de PBS 1x y emulsificado con 1ml de adyuvante Montanide ISA 71VG (Seppic[®]) por vía subcutánea. La dosis se administró en sitios cercanos a los nódulos linfáticos inguinales y axilares, utilizando una jeringa de 3 ml con aguja de calibre 22. Como control negativo se utilizó el suero de cada animal previo a la inmunización. Los animales fueron inmunizados los días 0 (T0), 8 (T1), 15 (T2), 22 (T3), 29 (T4) y 36 días (T5). Para seguimiento, se colectó suero posterior a cada inmunización a partir de T1. Los sueros se evaluaron mediante técnica inmunoensayos de ELISA, para determinar el momento idóneo en la producción de anticuerpos.

Reconocimiento del péptido MAPVirD4 mediante la técnica inmunoenzimática de ELISA

Para determinar la cinética de la respuesta inmune, placas de 96 pozos (Corning[®]), se re-

cubrieron con 10 μ g de MAPVirD4 a una dilución 1:200 y se dejó incubar 18 h a 4 °C. Posteriormente, se lavó tres veces con SSAF Tween 20 al 0.05%, y se colocaron los sueros T0, T3, T4 y T5 a dilución 1:100, durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron lavados, y se agregó anti-IgG conejo-fosfatasa alcalina (Phosphatase-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Bovine, Jackson Immuno Research, Laboratories, INC.) diluido 1:5000 y se dejó incubar por 1 h a 37 °C, se retiró el conjugado y se lavó la placa. Por último, como sustrato, se agregó p-nitrofenilfosfato al 0.075% en solución Tris 100mM pH 9.5, la reacción se dejó incubar por 30 min a 37 °C. para luego leer a una absorbancia de 405 nm en un lector de ELISA (Microplate reader Model 680 BIO-RAD).

Reconocimiento de la proteína VirD4 en eritrocitos infectados de bovino por inmunofluorescencia

En un frotis de sangre infectada con *A. marginale* Tlapacoyan-2 Mex-30-184-03 se colocaron 10 μ L de los sueros de conejo anti-MAPVirD4 del T0 y T5 a una dilución de 1:50 en PBS (pH 7.2). La laminilla se incubó en cámara húmeda y oscura en posición horizontal a 37 °C por 30 min, se lavó tres veces por 5 min con PBS y un minuto con agua destilada. Una vez seca, se colocaron 10 μ L de anticuerpo conjugado FITC Anti-Conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en cada una de las muestras. El exceso de conjugado se eliminó lavando la laminilla tres veces con PBS 1X pH 7.4 y secó a temperatura ambiente. Para su observación al microscopio de fluorescencia, se colocaron unas gotas de glicerina 1:10 en PBS pH 7.2. La laminilla se observó al microscopio con objetivo de inmersión (100x). Paralelamente, una laminilla de sangre no infectada (control) se trató como se describió anteriormente para verificar que la fluorescencia fuera específica.

RESULTADOS

A la amplificación del gen virB4 por PCR se observaron amplicones con una longitud calculada de

2421pb (Figura 1), lo que coinciden con los reportados en NCBI para el gen virD4 de la cepa *St. Maries* de *A. marginale*. Las secuencias de nucleótidos obtenidas para el gen virD4 de *A. marginale* de los aislados mexicanos mostraron una identidad y similitud del 100% mediante el programa ClustalW.

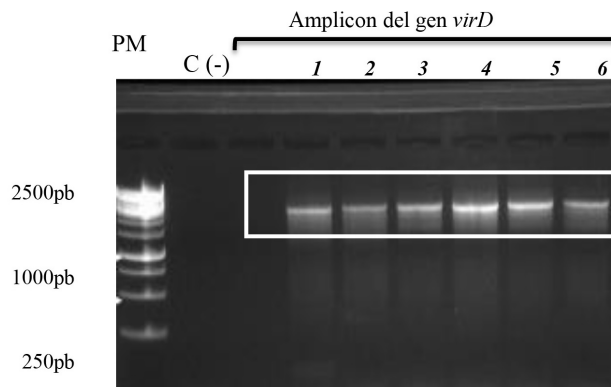


Figura 1: Amplificación del gen virD4 en seis aislados mexicanos con los iniciadores diseñados: PM) Marcador de Pesos molecular, C-) Control negativo, 1) Playa Vicente; 2) Puente de Ixtla, Mor.; 3) Soto la Marina Tamps; 4) Tamaulipas Guayaboso, 5) Aguascalientes 6) Tlapacoyan-2, Ver. Se observó un amplificado en todos los aislados de aproximadamente 2421 pb, el cual coincide con lo reportado para la secuencia de *St Maries* GenBank: AMF_RS09935 antes NC_004842 REGION: 1154957..1157377.

En cuanto a las características estructurales de la secuencia proteica, se predijo una composición de 806 aminoácidos, con un peso molecular de 91 kDa y un pl de 4.36 (Figura 2, EXPASY); mostro seis posibles regiones transmembranales entre el aminoácido 1 al 300 (Figura 3, TMHMM). Por otro lado, se observó la ausencia de péptido señal (Figura 4, SignalP). Pero mediante el programa PSIPRED se identificó un número mayor de alfa hélices que están representadas por cilindros de color rosa en la estructura de la proteína (Figura 5).

Con respecto a las regiones inmunogénicas y antigénicas, los programas ABCPred y BCEPred identificaron seis secuencias correspondientes a epítotos lineales tipo B (Tabla 1), tres de las secuencias predichas por los programas se encontraron en las regiones trasnmembranales observadas en el programa TMHMM (posición 68-83 aa., 73-83 aa., 272-286 aa.), por lo que se descartaron como candidatos. Los restantes tres péptidos se encontraron en el do-


```

10      20      30      40      50      60
MHSSNHIRN ILVFFFGMFF LLEFCFYISG ALFVLSMWGL EYLDNFALNP SISDFPMRLW

      70      80      90      100     110     120
PTIFNYIHGW WADPKLYGVS  NSLKLWLSFA APLCIVGTVF WNLRHILLEW RPFRRKKEALH

      130     140     150     160     170     180
GDSRWASERD IRKIGLRSRK  GLLLKGKQDQRG YLVADGYQHA LLFAPTGSQK  GVG FVIPNLL

      190     200     210     220     230     240
FWEDSLVVHD IKLENYDITS  GWRKKIGQEV  YVWNPAQPDG VSHCYNPLDW  ISKKPGQMVD

      250     260     270     280     290     300
DVQKIANLIM PEQDFWYNEA RSLFVGVVLY  LLA VPEKVKS  FGEVVRTMRS  DDVVYNLAVV

      310     320     330     340     350     360
LDTIGKKIHP VAYMNIAAFL  QKADKERSGV  VSTMNSSLEL  WANPLIDTAT  ASSDFNIQEF

      370     380     390     400     410     420
KKKKITVYVG LTPDNLTRLR  PLMQVFYQQA  TEFLCRALPS  DDEPYGVLFM  MDEFPTLGKM

      430     440     450     460     470     480
EQFQTGIAYF RGYRVRLFLI  IQDTEQLKGI  YEEAGMNSFL  SNSTYRITFA  ANNIETANLI

      490     500     510     520     530     540
SQLIGNKTVS  QESLNRPKFL  DLNPASRSLH  ISDTQRALLL  PQEVIMLPKD  EQILLIESTY

      550     560     570     580     590     600
PIKSKKIKYY EDKFFTKKLL  KSTFVPTQEP  YDPDAARGGV  DTVAEDVPTS  EEQEQAIAIA

      610     620     630     640     650     660
HEESAQAQAQQ PQEQHGDEAG  YDEFGDYPQD  YDYSSSEDEY  MEGLDDIEGE  DVPLNGEGLD

      670     680     690     700     710     720
DIGDEDSYPE DHVSDEGHPE  EDELSAYKEE  PTDSELQDAE  DGYGGGDEEP  YYEENDGGEF

      730     740     750     760     770     780
YEADEIRGSE  GGVTDVYPEE  DEPLAYEEEP  TDGELQDAED  EYSGGDEEPY  YEESGGDEPY

      790     800
GEDETYDDED  TQPPRRDGKQ  RDDNP
    
```

Figura 2. Secuencia aminoacídica de la proteína VirD4. Proteína compuesta por 806 aminoácidos.

minio extracelular de proteína VirD4, característica importante en la búsqueda de un candidato vacunal. Se analizaron las características de los aminoácidos presentes en cada una de las secuencias restantes obtenidas con los programas y se seleccionó el péptido PTDGELQDAEDEY (749-763 aa.) por presentar hidrofiliencia, solubilidad aminoacídica y facilidad

de síntesis; así como un tamaño y ubicación adecuada para considerarse como candidato a vacuna.

Los anticuerpos generados contra MAPVirD4 se evaluaron por la técnica de ELISA usando el mismo MAPVirD4 como antígeno. La respuesta se observó con el suero T3, y fue aumentando hasta el día 36 (T5) post-inoculación (Figura 6). Estos resulta-

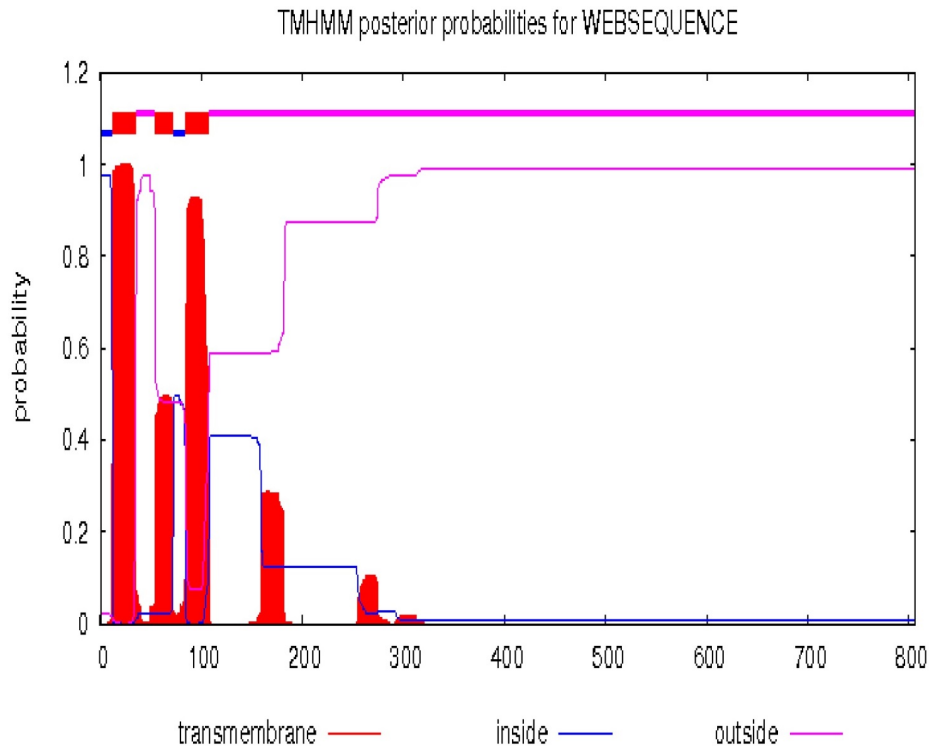


Figura 3. Predicción de regiones transmembranales. Se observan tres posibles regiones transmembranales del aminoácido 1 al 275. Cada color representa lo siguiente: rojo regiones transmembranales; azul regiones intracitoplásmicas; rosa regiones extramembranales. El eje de las x corresponde a la posición de los aminoácidos y el de las y a la puntuación que otorga el programa.

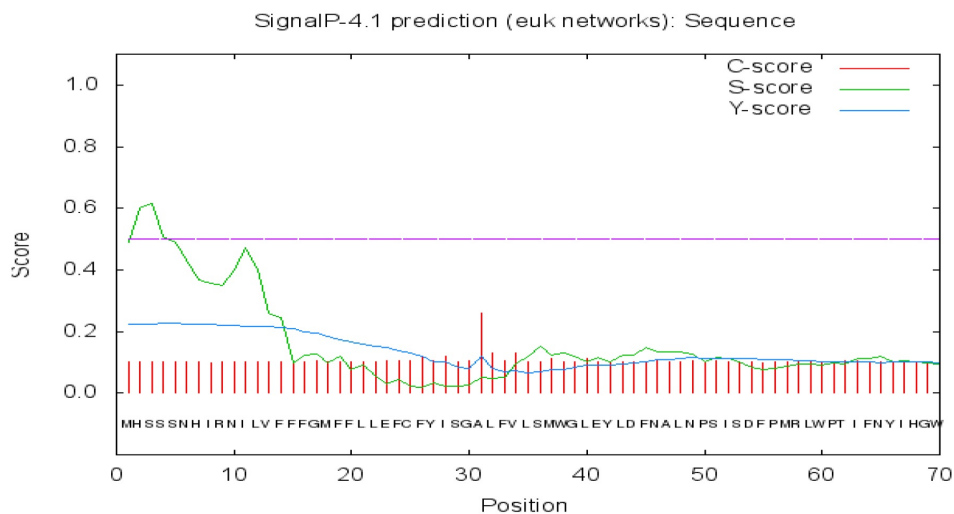


Figura 4. Predicción del péptido señal. No hay identificación de péptido señal por el programa SignalP. El eje de las x corresponde a la cadena de aminoácidos y el de las y a la puntuación que otorga el programa. Score C: Nos indica el primer aminoácido presente en la proteína madura. Score S: Distingue la posición del péptido señal, diferenciándolo de la proteína madura. Score Y: Es una combinación de la C-score y la pendiente de la S-score, lo que resulta en una mejor predicción del sitio de corte que el C-score por sí solo.

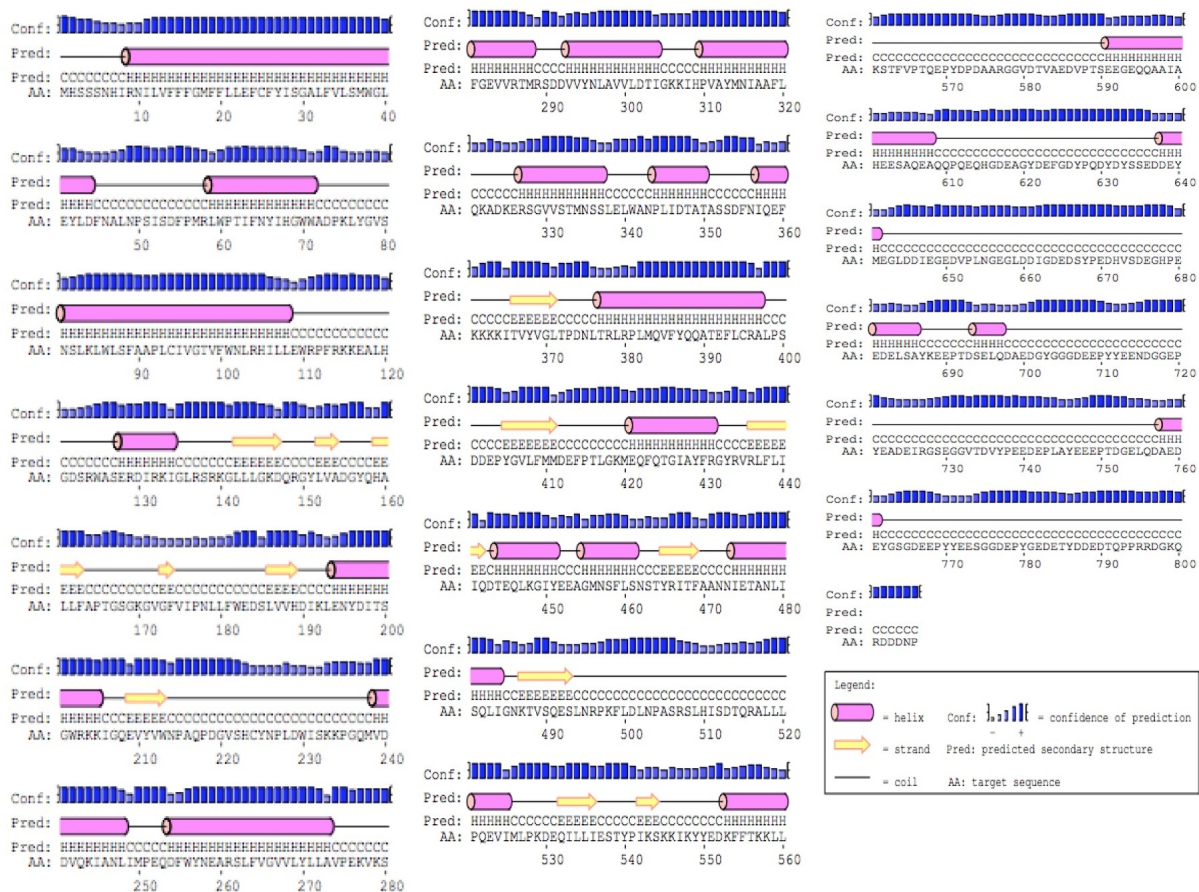


Figura 5. Predicción de estructura secundaria. Las regiones α -hélices se muestran en tonos rosados, mientras que las estructuras β -plegada se muestran representadas con una flecha amarilla. Las líneas negras representan bobinas o vueltas y la figura en azul, representa la confiabilidad de la predicción.

Tabla 1. Comparación de epítomos para VirD4 con los programas ABCpred y BCE-Pred. Se observan los epítomos predichos por ambos programas computacionales. Los epítomos subrayados coinciden en ambos programas y en negritas se observa el epítomo seleccionado para la síntesis.

Péptido	Posición	Tamaño (aa)
LAVPEKVSFGEVVRT	272-286	16
PKDEQILLIESTYPIKS	527-543	17
EPTDGEIQDAEDEYG	749-763	15
HGWWADPKLYGVSNSL	68-83	16
PKLYGVSNSL	73-83	10
DEIRGSEGGVTDVYPEEDEPLAYEEPTD	724-762	29

dos demuestran la capacidad del péptido MAPVirD4 de ser reconocido por el sistema inmune del conejo en los diferentes tiempos y el aumento de estos anticuerpos a la par del reto antigénico. Así mismo se observó que el formato de Péptidos antigénicos Múltiples (MAP) es útil para evaluar la producción de

anticuerpos, así como el uso de los programas bioinformáticos para predecir capacidades antigénicas e inmunogénicas.

Los anticuerpos generados contra MAPVirD4, reaccionaron con formas intraeritrocíticas de la cepa Tlapacoyan-2 de *A. marginale*, como se observa en

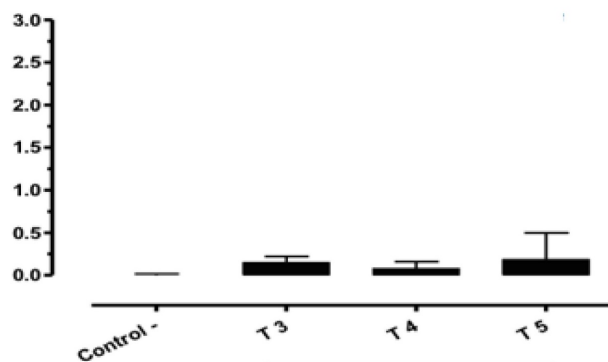


Figura 6: Evaluación de la generación de anticuerpos contra MAPVirD4 en conejos mediante la técnica de ELISA. Los sueros de conejo se diluyeron 1/100. Se observa el aumento de anticuerpos en el T5. Control (-) Suero de conejo Pre-inmune, T3) Suero de conejo Tiempo 3 de inmunización, T4) Suero de conejo Tiempo 4 de inmunización, T5) Suero de conejo Tiempo 5 de inmunización.qwertyuiop.

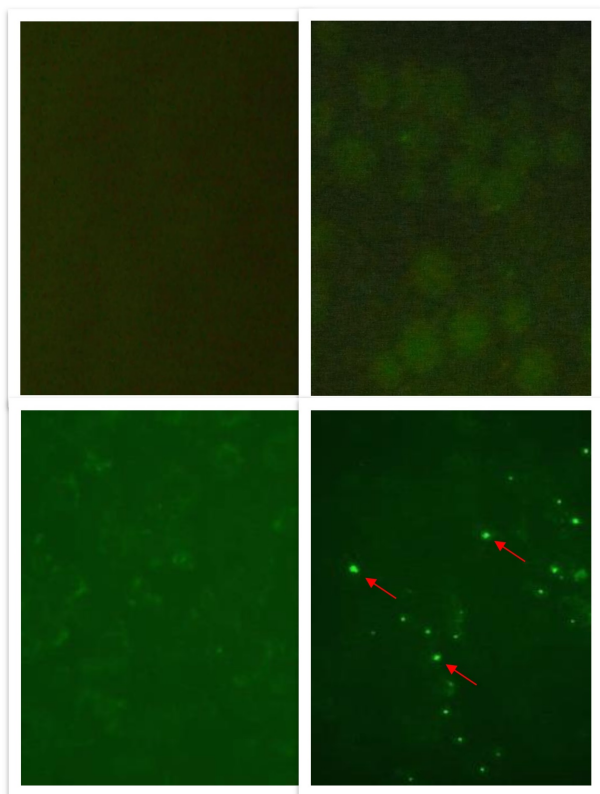


Figura 7: Microscopía de fluorescencia. Reconocimiento de *A. marginale* mediante suero de conejo inmunizado con MAPVirD4. A) Suero de conejo pre-inmune contra eritrocitos sanos; B) Suero de conejo pre-inmune contra eritrocitos infectados; C). Suero de conejo T5 contra eritrocitos sanos y D) Suero de conejo T5 contra eritrocitos infectados (Las fechas indican formas infectantes de *A. marginale* en eritrocitos de bovinos, identificadas).

el panel D de la Figura 7 y no se observó reacción contra eritrocitos no infectados, esto indica que no existe respuesta cruzada con alguna otra proteína presente en la estructura del eritrocito (Figura 7C). Así mismo, no se observó respuesta con el suero preinmune contra eritrocitos infectados, esto significa que los anticuerpos se produjeron posterior al contacto con el péptido (Figura 7B). Estos resultados permiten asumir que VirD4 al ser reconocida por anticuerpos específicos por inmunofluorescencia tendría que ser estudiada más a detalle para determinar su potencial inmunogénico en el bovino.

DISCUSIÓN

Los patógenos bacterianos intracelulares cuentan con mecanismos para su replicación dentro de las células eucariontes, de los cuales muchos de ellos son desconocidos (Sinai *et al.* 1997). Algunos de estos mecanismos están relacionados con la transferencia de moléculas entre el microorganismo y el hospedero, como en los sistemas de secreción, que juegan un papel importante en la invasión y patogenicidad de organismos (Gillespie *et al.* 2009, Juhas *et al.* 2012, Redzej *et al.* 2017). El conocimiento detallado sobre estos sistemas de secreción podría ser usado para plantear nuevas estrategias terapéuticas en contra de estos microorganismos.

Los alineamientos de las secuencias del gen *virD4* de seis aislados mediante herramientas bioinformáticas tuvieron un 100% de identidad entre ellas y con las secuencias de reportados en NCBI, este grado de conservación permite especular que este gen podría estar asociado a una actividad importante en *Anaplasma*, considerando que estas seis cepas presentan variabilidad respecto de otros marcadores moleculares (Jiménez-Ocampo *et al.* 2012). Previamente se ha demostrado que mutaciones en los genes del sistema de secreción tipo IV en *Haemophilus influenzae* (Gram negativo) disminuyen la capacidad de conjugación entre cepas, en comparación con las cepas no modificadas (Juhas *et al.* 2012). De manera particular al mutar el antígeno CagA, dominio presente en la proteína VirD4 de *H. pylori*, esta pierde su función durante la interacción

con su huésped (Stein *et al.* 2000). Por otro lado, se demostró recientemente un papel estabilizador de VirD4 hacia el complejo VirB1-11, lo cual sugiere una función importante de VirD4 sobre la virulencia en las bacterias que la expresan (Redzej *et al.* 2017).

Para seleccionar una proteína que pueda ser blanco del sistema inmune, ya sea para pruebas diagnósticas o para el control de la anaplasmosis es primordial conocer su estructura y su capacidad inmunogénica (Araújo *et al.* 2008). Los resultados de los análisis *in silico* de VirD4 mostraron regiones transmembranales que podrían funcionar como anclaje de la proteína a la membrana, como en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* (Redzej *et al.* 2017). Asimismo, se observó la ausencia de péptido señal, resultado que afirma lo ya publicado con respecto a la clasificación de esta proteína en el sistema de secreción tipo IV, las cuales no dependen de secuencias señal para la translocación de sustratos desde el citoplasma hasta el medio extracelular (Wilson *et al.* 2011). Además, se observó un número mayor de alfa hélices, característico de proteínas que cuentan con motivos estructurales de unión a DNA (Acosta *et al.* 1996), dominios que se mencionan en los estudios previos de esta proteína en otros organismos y tres secuencias representativas de epítomos tipo B conservados y expuestos hacia las regiones extracelu-

lares (Llosa *et al.* 2002).

La inoculación de conejos con estos tetrámeros antigénicos múltiples (MAPVirD4) inducen la producción de anticuerpos específicos. Estos sueros reaccionan con eritrocitos infectados con *A. marginale* en un ensayo de inmunofluorescencia. Lo que corrobora no solo que MAPVirD4 es expresada por la rickettsia durante su estancia en eritrocitos, sino que se muestra de manera indirecta su localización.

CONCLUSIONES

El análisis bioinformático demostró que las secuencias obtenidas presentan un 100% de conservación e identidad entre los seis aislados mexicanos secuenciados; así como entre las secuencias reportadas en NCBI. Se identificó la presencia de epítomos B conservados entre las seis cepas mexicanas de *A. marginale* y las reportadas en NCBI. Los anticuerpos específicos reaccionaron por ELISA con el MAPVirD4 y con cuerpos iniciales de *A. marginale* en formas intraeritrocíticas de *A. marginale* por fluorescencia directa. De acuerdo con sus características, las proteínas son ideales para ser candidatos a vacunas contra la Anaplasmosis bovina.

LITERATURA CITADA

- Acosta KY, Zavala JE (1996) Proteínas de unión a DNA. Revista Biomédica 7: 163-172.
- Araújo FR, Costa CM, Ramos CA, Farias TA, Souza II, Melo ES, Elisei C, Rosinha GM, Soares CO, Frago SP, Fonseca AH (2008) IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 103: 186-190.
- Atmakuri K, Ding Z, Christie PJ (2003) VirE2 a Type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular Microbiology 49: 1699-1713.
- Aubry P, Geale DW (2011) A review of bovine anaplasmosis. Transbound Emerging Diseases 58: 1-30.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: Walker JM (ed). The proteomics protocols handbook. Humana Press. United States. pp: 571-607.
- Gillespie JJ, Ammerman NC, Ammerman NC, Dreher-Lesnick SM, Rahman S, Worley MJ, Setubal JC, Seubal, Sobral BS, Azad AF (2009) An anomalous type IV secretion system in rickettsia is evolutionarily conserved.

- Plos One. 4: e4833. Doi: 10.1371/journal.pone.0004833.
- González-Pedrajo B, Dreyfus G (2003) Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico XXVII: 45-63.
- Gupta R, Jung E, Brunak S (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>. Fecha de consulta: 10 de marzo de 2019.
- Jiménez-Ocampo R, Vega Munguía C, Rodríguez SD (2012) Diversidad genética de la región variable de los genes msp1a y msp4 en cepas de *Anaplasma marginale* de México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 3: 373-387.
- Juhas M, van der Merr Jr, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW (2012) Genomic islands: tools of bacterial horizontal genes transfer and evolution. Fems Microbiogy Reviews 33: 376-93
- Llosa M, Gomis FX, Coll M, de la Cruz F (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. Molecular Microbiology 45: 1-8.
- Moller S, Croning MDR, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. Bioinformatics 17: 646-653.
- Ocampo-Espinoza V, Salazar Vázquez JE, Durán Aguilar M, García Ortiz MA, Cantó Alarcón GJ, Rodríguez SD (2006) *Anaplasma marginale*: Lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. Veterinary Microbiology 114: 34-40.
- Potgieter FT, van Rensburg L (1987) Tick transmission of *Anaplasma centrale*. Onderstepoort Journal Veterinary Research 54: 5-7.
- Redzej A, Ukleja M, Connery S, Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Thalassinos K, Hayward RD, Orlova EV, Waksman G (2017) Structure of a VirD4 coupling protein bound to a VirB type IV secretion machinery. The EMBO Journal 36: 3080-3095.
- Rodríguez SD, Garcia-Ortiz MA, Ocampo R, Vega, Murguía CA (2009) Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. Infection Genetics Evolution 6: 1092-1101.
- Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez de León A, Silva VH, Torres AJFdeJ, Fragoso SH, Romero D, Cruz R, Saldiema F, García D (2017) Potencial economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuaria 8: 61-74.
- Saha S, Raghava GPS (2004) BcePred: Prediction of continuous B-Cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In: Nicosia G, Cutello V, Bentley PJ, Timis J (eds.) Artificial Immune Systems ICARIS 2004. Lecture Notes in Computer Scienc vol. 3239. Springer, Berlin, Heidelberg. pp: 197-204.
- Saha S, Raghava GPS (2006) Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins 65: 40-48
- Sinai AP, Joiner KA (1997) Safe haven: the biology of nofugenic pattogen vacuoles. Annual Reviews. Microbiology 51: 415-462.
- Stein M, Rappuoli R, Covacci A (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United Satates of America 97: 1263-1268.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment trough sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.

- Willadsen P, Nielsen JM, Riding GA (1989) Purification and properties of a novel nucleotide-hydrolysing enzyme (5 - nucleotidase) from *Boophilus microplus*. *Biochemical Journal* 258: 79-85.
- Wilson B, Salyers A, Whitt D, Winkler M (2011) *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. 3rd Edition. ASM Press. Washington DC. 259p.
- Zhao L, Mahony D, Cavallaro A, Zhang B, Zhang J, Deringer J, Zhao C, Brown W, Yu C, Mitter N, Middelberg (2016) Immunogenicity of outer membrane protein VirB9-1 and VirB9-2 a novel nanovaccine against *Anaplasma marginale*. *Plos One* 11(4): e0154295. Doi: 10.1371/journal.pone.0154295.