



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

" UBICACIÓN DE LA PROTEÍNA VirB9 EN *Anaplasma marginale* CON BASE EN ANÁLISIS *IN SILICO* Y BIOLÓGICOS"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Rafael Jiménez Ocampo

Tutor: Sergio D. Rodríguez Camarillo

Comité tutorial: Juan Joel Mosqueda Gualito

Alfredo Sahagún Ruíz

México D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Becario CONACYT No. Registro 221737

Esta tesis se llevó a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyectos CONACYT 90300 y SEP-CONACYT P62525.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el apoyo total que me brindo para mi formación como Maestro en Ciencias. Al Doctor Homero Salinas González por su invaluable apoyo. Al Dr. Juan B. Rentería por brindarme su apoyo. Al Dr. Sergio Rodríguez Camarillo como mi tutor y parte fundamental en mi formación en estos 6 cortos años. Al Dr. Juan Mosqueda Gualito por su exigencia y ejemplo para mi carrera en la ciencia, al Dr. Alfredo Sahagún Ruíz por su apoyo y disposición en todo momento para el desarrollo de este proyecto, de igual manera agradezco a los doctores Estefan Miranda, Raquel Cossio y Minerva Camacho por su valioso apoyo con reactivos y consejos de biología molecular, al M en C. Juan A. Ramos Aragón por su apoyo en la microscopía y al MVZ Alberto Arzave Suárez y personal del bioterio del CISEI del Instituto Nacional de Salud Pública, (INSP) por la donación y apoyo de los conejos de experimentación.

De igual forma agradezco el apoyo de todos los investigadores del INIFAP-Durango y CENID- PAVET especialmente a los compañeros de la unidad de anaplasmosis; Miguel Ángel García Ortíz, Edmundo Rojas, Francisco Preciado y Carlos Vega. A los compañeros estudiantes de los diferentes laboratorios por su apoyo en el trabajo diario así como al personal administrativo del CENID-PAVET dirigidos por el Dr. Zeferino García, gracias por su disposición y amabilidad en todo momento.

VITA

El MVZ Rafael Jiménez Ocampo nació el 20 de Abril de 1983 en la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Realizó estudio de educación media superior en el Colegio de Bachillerato Tecnológico Agropecuario CBTa. No. 8 en la comunidad de Xoxocotla, Morelos. En el año 2001 Rafael ingreso a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla donde estudió la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, obtuvo su título en el año 2006 con la tesis "Secuenciación de la región variable del gen *msp1α* de los aislados MEX-17-017-01 (Pte de Ixtla, Mor.), MEX-01-001-01 (Aguascalientes, Ags.) y MEX-07-068-01 (Pichucalco, Chis.) de *Anaplasma marginale*", con la dirección del Dr. Sergio D. Rodríguez Camarillo. En el año 2006 ingreso al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP como investigador asociado en el Campo Experimental "Valle del Guadiana" Durango Dgo. En 2007 obtuvo una beca de la Agencia de Cooperación Internacional del Japon para participar en un curso de formación en integración de cultivos y ganadería en zonas áridas en el Centro Internacional de Agricultura de Zonas Áridas ICARDA en Alepo, República Arabe de Siria. En 2009 estudio un diplomado en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara en el departamento de Salud Pública. El MVZ ha publicado artículos científicos en revistas nacionales e internacionales y ha participado como ponente en diferentes congresos. En el 2008 ingresó al programa de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal concluyendo en el 2010 bajo la tesis "Ubicación de la proteína VirB9 en *Anaplasma marginale* con base en análisis *in silico* y biológicos".

RESUMEN:

Anaplasma marginale es una rickettsia intraeritrocítica obligada que infecta a los bovinos de regiones tropicales y subtropicales, es el agente causal de la anaplasmosis bovina responsable de importantes pérdidas económicas. La vacunación es uno de los métodos efectivos de control contra enfermedades infecciosas, pero esta medida no ha cumplido su potencial contra la anaplasmosis por la diversidad genética que presenta este microorganismo. Con el fin de diseñar inmunógenos eficientes, se realizan esfuerzos por identificar y ubicar antígenos conservados en aislados de diferentes regiones geográficas. Proteínas homólogas al Sistema de Secreción Tipo IV reportadas en otras bacterias Gram negativas que han sido identificadas en *A. marginale* y, dentro de estas, se encuentra la proteína VirB9 con capacidad antigénica. El objetivo del trabajo fue determinar la localización de la proteína VirB9 en la membrana de *A. marginale* de origen mexicano, mediante análisis *in silico* y ensayos biológicos. La proteína fue clonada y secuenciada a partir de ADN genómico de tres aislados de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de México; las secuencias de aminoácidos mostraron 100% de identidad con aislados de *A. marginale* de EEUU, Puerto Rico y Brasil. En las secuencias, se identificaron epítomos tipo B que fueron sintetizados de forma comercial; en forma paralela el gen de la proteína VirB9 fue expresado con paquetes comerciales; los péptidos y proteína recombinante se utilizaron para la producción de anticuerpos específicos en conejos y por medio de inmunofluorescencia en cuerpos iniciales vivos se identificó la proteína. El análisis *in silico* indica que VirB9 no se encuentra anclada a la membrana del *A. marginale* y que posiblemente se encuentra asociada a otras proteínas que conforman el sistema homólogo de secreción tipo IV; respecto a la función de esta proteína, se encontró que posee un dominio CagX y se presupone que es una proteína de transferencia conyugal. El resultado de los ensayos biológicos indica que VirB9 está expuesta en la superficie externa de la membrana, estas características fortalecen el postulado de la utilización de rVirB9 como agente vacunal.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*, Anaplasmosis bovina, Proteína VirB9

ABSTRACT

Anaplasma marginale is an obligate intraerythrocytic bacteria that infects cattle mainly in tropical and subtropical regions. *A. marginale* is the causative agent of bovine anaplasmosis and responsible for significant economic losses in the livestock industry worldwide. Vaccination is one of the most effective methods of control for Anaplasmosis, but this measure has not fulfilled its potential due to wide genetic diversity presented by this organism. Efforts to identify and characterize antigens conserved in isolates from different geographical regions are oriented to discover efficient immunogens. Proteins homologous to Type IV Secretion System (SSTIV) reported in other Gram-negative bacteria have been identified in *A. marginale* and, within these, the antigenic VirB9 protein. The aim of this study was to characterize VirB9 from Mexican isolates of *A. marginale* by *in silico* analysis and biological assays. The protein was cloned and sequenced from genomic DNA of three isolates from different geographical regions of Mexico. The amino acid sequences obtained showed 100% identity with isolates of U.S., Puerto Rico and Brazil. Type B epitopes were identified on these sequences and synthesized on a commercial basis, in parallel rVirB9 protein was expressed by commercial packages, peptides and recombinant protein were used for the production of anti-VirB9 polyclonal antibodies in rabbits and by immunofluorescence using a live initial bodies was identified protein. *In silico* analysis also indicates that VirB9 is not anchored to the membrane of the organism and is possibly associated with other proteins that make up the type IV secretion counterpart, regarding the role of this protein was found to have a domain CagX so is presumed to be a conjugal transfer protein, the result of biological analysis reveals that this protein is exposed on the outer surface of the membrane, These features strengthen the premise of using rVirB9 as vaccine agent.

Key words: *Anaplasma marginale*, Bovine anaplasmosis, Protein VirB9.

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Anaplasmosis del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, en Jiutepec, Morelos.

ÍNDICE

		Página
1	Introducción	1
2	Marco teórico	3
2.1	Definición de la enfermedad	3
2.2	Taxonomía	4
2.3	Ciclo de vida	5
2.4	Diagnostico	6
2.5	Importancia económica	7
2.6	Distribución de la enfermedad	8
2.7	Genoma	9
2.8	Caracterización de aislados	11
2.9	Proteínas de superficie	12
2.10	Nuevas proteínas relevantes	13
2.11	Sistemas de secreción	13
2.11.1	Sistema de secreción tipo I	14
2.11.2	Sistema de secreción tipo II	14
2.11.3	Sistema de secreción tipo III	15
2.11.4	Sistema de secreción tipo IV	15
2.11.5	Sistema de secreción tipo V	17

2.11.6	Sistema de secreción tipo VI	18
2.12	Sistema homólogo de secreción tipo IV en <i>A. marginale</i>	18
2.13	Mecanismos inmunológicos	19
3	Hipótesis	22
4	Objetivo general	22
5	Objetivos particulares	22
6	Metodología	23
7	Resultados	33
8	Discusión y conclusiones	58
9	Referencias bibliográficas	62
10	Anexos	76

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1 Características generales del genoma de <i>A. marginale</i> .	11
2 Análisis de iniciadores.	33
3 Epítomos seleccionados.	42
4 Microorganismos relacionados que poseen un dominio CagX.	46
5 Similitud de VirB9 de <i>A. marginale</i> y otros microorganismos.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
1	Eritrocitos infectados de <i>A. marginale</i>	3
2	Ciclo biológico del <i>A. marginale</i>	5
3	Distribución anaplasmosis en México	8
4	Mapa genético del <i>A. marginale</i>	10
5	Sistema de secreción tipo IV en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
6	Electroforesis producto PCR VirB9	34
7	Alineación de nucleótidos VirB9 aislados mexicanos	35
8	Alineación de nucleótidos VirB9 aislados mexicanos y aislados PR1 y St Maries	36
9	Marco abierto de lectura	37
10	Frecuencia de aminoácidos	38
11	Identificación de intrones	38
12	Identificación de un péptido señal	39
13	Alineación de la secuencias de aminoácidos de VirB9 aislados mexicanos, PR1, Brasil y Florida, St Maries EEUU.	39
14	Predicción de estructura secundaria	40

		Página
15	Predicción de hidrofobicidad y dominios transmembranales	41
16	Predicción de hélices transmembranales	42
17	Predicción de epitopos	43
18	Análisis BLAST de epitopos	44
19	Identificación de dominios	45
20	Árbol filogenético	47
21	Cinética de expresión VirB9	48
22	Western-Blot cinética de expresión VirB9	49
23	Cinética de expresión vector sin inserto	50
24	Western-Blot cinética de expresión vector sin inserto	50
25	Solubilidad de la proteína rVirB9	51
26	Electroforesis de la purificación de la proteína rVirB9	52
27	Westren-Blot de la purificación de la proteína rVirB9	52
28	Inmunofluorescencia Indirecta	54
29	Reconocimiento de rVirB9 por anticuerpos de bovino inmune	55
30	Reconocimiento de rVirB9 por anticuerpos de conejos anti rVirB9	55
31	Localización celular de la proteína VirB9	57

ABREVIATURAS

LB	Luria Bertani	kDa	Kilodaltones
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	nm	nanómetros
G	Gramos	DO	Densidad óptica
Min	Minuto	CI	Cuerpos Iniciales
rpm	Revoluciones por minuto	EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-ácido
xg	Gravedades	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
pb	Pares de bases	SDS	Duodecil sulfato de sodio
aa	Aminoácidos	TEMED	Tetrametilen-etilen-diamina
μl	Microlitro	IPTG	Isopropil β-D-Tiogalactósido
μg	Microgramo	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
mg	Miligramo	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
ml	Mililitro	ELISA	Inmunoensayo enzimático
ADN	Ácido desoxiribonucleico	μm	micrómetro
° C	Grados centígrados	SSTIV	Sistema de secreción tipo IV
pH	Potencial de Hidrógeno	CFDA se	Éster succinimidil diacetato de carboxi-fluoresceína

1. INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa de distribución mundial que causa considerables pérdidas económicas en los países en vías de desarrollo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales (Ristic 1960, Rodríguez *et al.*, 2000). *Anaplasma marginale*, el agente causal, está presente en México, con una alta incidencia y es de reporte obligatorio (Osorno y Ristic, 1977, Rodríguez *et al.*, 2009, DOF, 2007). Esta rickettsia es transmitida por garrapatas e infecta los eritrocitos de los animales susceptibles, donde se multiplica durante los siguientes 15 a 45 días; en algunos animales este periodo puede extenderse a mayor número de días (Ristic 1960). La enfermedad puede presentarse en forma aguda con signos de anemia, pérdidas de peso, fiebre, abortos en el último tercio de gestación y puede ocasionar la muerte en muchos casos (Rodríguez *et al.*, 2003). La enfermedad es causada por *A. marginale*, que es la especie más patógena comparada con *A. marginale* subsp. *centrale* la cual es exótica en México. (Osorno *et al.*, 1997). La vacunación representa la mejor opción para el control de esta enfermedad, y aunque actualmente existen vacunas inactivadas y atenuadas, estas presentan riesgos que limitan su efectividad (Rodríguez *et al.*, 2009). Una de las limitaciones de las vacunas inactivadas está dada por la amplia diversidad antigénica que presentan aislados de regiones geográficas distantes (de la Fuente *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2008). La búsqueda de antígenos conservados en aislados de las diferentes regiones geográficas donde se presenta la enfermedad, ha dado lugar a la utilización de nuevos avances tecnológicos, los cuales han generado el descubrimiento de nuevas proteínas de *A. marginale*. Estas nuevas proteínas necesitan ser estudiadas con el propósito de desarrollar un inmunógeno eficaz para controlar las infecciones de la enfermedad y disminuir las pérdidas económicas. Un grupo de proteínas en estudio dentro de bacterias Gram negativas, son las del Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV) homólogo entre las que se encuentra la proteína VirB9 la cual

ha mostrado tener capacidad antigénica (Barigye *et al.*, 2004; López *et al.*, 2007 y Vidotto *et al.*, 2008). El objetivo de la presente investigación fue ubicar la proteína VirB9 en aislados mexicanos de *A. marginale*, mediante análisis *in silico* y ensayos biológicos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de la Enfermedad

Anaplasma marginale fue descrito por primera en América del Norte en 1893 por Smith y Kilborne, y posteriormente en Sudáfrica en el año de 1910 Arnold Theiler diferenció la anaplasmosis de la babesiosis, observando puntos marginales en los eritrocitos de bovinos y designó a este microorganismo como el agente causal de la anaplasmosis (**Figura 1**) y posteriormente describió la subespecie *A centrale* la cual parecía ser menos patógena (Smith y Kilborne 1893; Theiler, A. 1910; Theiler, A. 1911; Palmer 2009). *A marginale* pertenece al genogrupo II de las *Ehrlichias* en el orden *Rickettsiales* y a la familia *Anaplasmataceae* (Dumler *et al.*, 2001). La forma de la rickettsia es alargada, esférica o cocoide ovalada de 0.2 a 1.0 μm de diámetro (Ristic y Kreir, 1984).

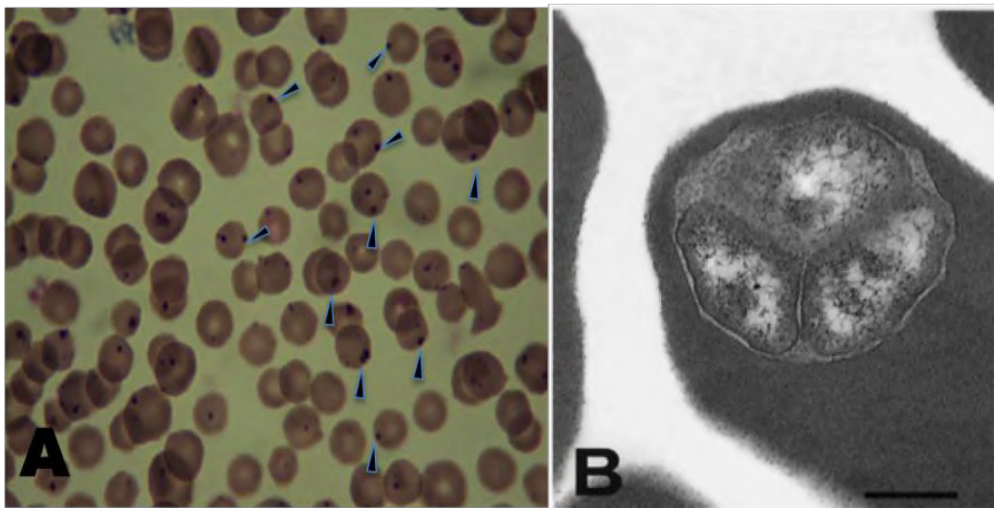


Figura 1. Eritrocitos infectados con *A. marginale* (A) cuerpos de inclusión (Puntas de flecha) se encuentran localizados en la periferia del eritrocito en un frotis de sangre teñida con Giemsa (Imagen A Laboratorio de Anaplasmosis CENID-PAVET, INIFAP). (B) Micrografía electrónica de un cuerpo de inclusión de *A. marginale* que contiene tres organismos. Barra (B) 0.5 μm (Imagen B Tomado de Kocan *et al.*, 2003).

Esta bacteria se cree que es transmitida en forma biológica por garrapatas de varios géneros de la familia Ixodidae (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005) y puede ser propagada de forma iatrogénica (Zaugg *et al.*, 1986; Palmer *et al.*, 2000). La

anaplasmosis se caracteriza por que los animales sufren de anemia severa, fiebre, ictericia, anorexia, pérdida de peso corporal y baja en la producción láctea, abortos en el último tercio de la gestación y la muerte de los animales no tratados a tiempo. El diagnóstico de la enfermedad puede ser directo o indirecto. El diagnóstico diferencial en el ganado bovino se debe realizar contra babesiosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar e intoxicaciones por cobre, col, nabo y helecho macho (Blood y Radostits 1992; Corona *et al.*, 2004).

2.2 Taxonomía

Anaplasma marginale ha tenido diversas clasificaciones a lo largo del tiempo por ser la primera rickettsia en ser identificada, se le consideró equivocadamente como virus y como parásito protozoario hasta la séptima edición del manual de Bergey 1957 (Brayton *et al.*, 2009), recientemente debido a un trabajo de Dumler y colaboradores (2001) se ha unificado la nomenclatura de *A. marginale* y bacterias relacionadas.

(Reino) Bacteria

(Filo) Proteobacteria

(Clase) Alfa-proteobacteria

(Orden) Rickettsiales

(Familia) Anaplasmataceae

(Genero) *Anaplasma*

(Especie tipo) *A. marginale*

A. marginale ss *centrale*

A. bovis

A. ovis

A. phagocytophilum

A. platys

A. equi

2.3 Ciclo de vida y transmisión

La transmisión de esta bacteria se lleva a cabo por medio de vectores biológicos o mecánicos, todos los bovinos pueden ser susceptibles aunque el ganado *Bos indicus* presenta mayor resistencia a la infestación por garrapatas en comparación con el ganado *Bos taurus* (Otim *et al.*, 1980; Parker *et al.*, 1984). Cuando una garrapata se alimenta de eritrocitos infectados de un animal portador de la rickettsia (**Figura 2**), los cuerpos iniciales de la bacteria viajan hacia el intestino medio de la garrapata donde tienen un primer ciclo de replicación y de aquí viaja a otros tejidos como la glándula salival donde tienen varios ciclos de replicación (Kocan *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1999).

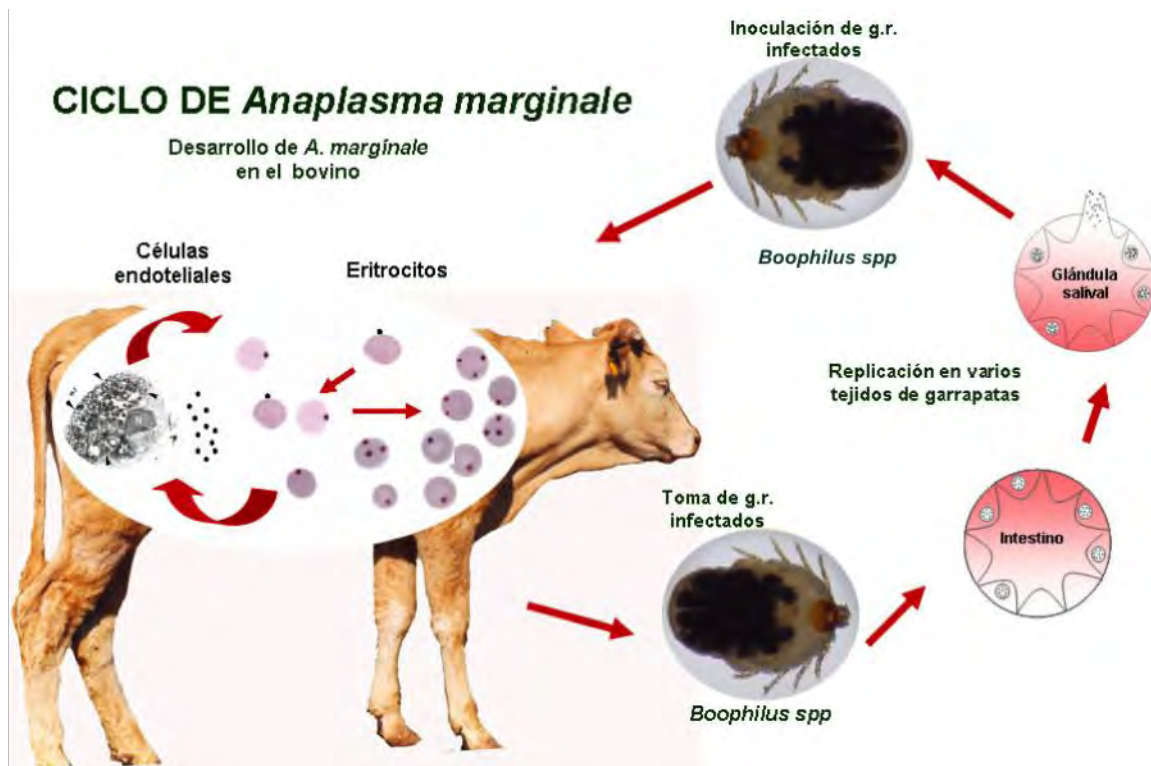


Figura 2. Ciclo de vida del *Anaplasma marginale* (Modificado de Rodríguez *et al.*, 2009)

La garrapata infectada es un vector que al alimentarse en otros bovinos inocula la rickettsia en el sistema circulatorio donde los cuerpos iniciales penetrarían a las células endoteliales (Carreño *et al.*, 2007) y eritrocitos por medio de la

invaginación de la membrana citoplasmática sin que ocurra lisis celular. En una vacuola los cuerpos iniciales se multiplican por fisión binaria y en casos agudos de la enfermedad, los cuerpos de inclusión pueden llegar a ser numerosos (Ristic, 1980).

La transmisión del *A. marginale* puede ser de diversas formas: a) Mecánica, b) Biológica y c) Transplacentaria.

a) Transmisión mecánica. De manera iatrogénica por instrumentos de manejo, como agujas, aretadores, narigones, sierras o navajas para el descorne o material quirúrgico contaminado, también por insectos hematófagos de los géneros *Tabanus*, *Stomoxis*, *Hematobia* y varios géneros de mosquitos (Ewing 1981; Scoles *et al.*, 2008).

b) Transmisión biológica. Mediante garrapatas de géneros *Boophilus*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* spp (Potgieter *et al.*, 1983, Zaugg *et al.*, 1986; Rodríguez – Vivas *et al.*, 2005; Scoles *et al.*, 2007).

c) Transmisión transplacentaria. Se han documentado casos de transmisión transplacentaria (vaca-producto) por lo que se estima que esta forma de transmisión podría influir de manera importante en la conservación de la rickettsia en la naturaleza y en los hatos libres de garrapatas (Potgieter *et al.*, 1987, Salabarría y Pino, 1988; Bock *et al.*, 2003; Goncalves Ruiz *et al.*, 2005)

2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad puede llevarse a cabo por métodos directos por la observación de la rickettsia al microscopio en frotis de sangre completa infectada y coloreada por diversos métodos de tinción incluyendo Giemsa, Wright o Azul de metileno (Rodríguez *et al.*, 1996). Otros métodos directos incluyen el uso de naranja de acridina y la observación al microscopio por medio de técnicas de fluorescencia directa, así como la amplificación de ADN del agente causal por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Aboytes, 1992; Torioni *et al.*, 1998; Figueroa *et al.*, 1993). Existen también

métodos indirectos que se basan en la detección de anticuerpos específicos en suero de animales sospechosos, lo cual ayuda en la confirmación del diagnóstico. Las técnicas más comunes incluyen: la fijación del complemento, Inmunofluorescencia indirecta y el Ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Tello et al., 1986; González *et al.*, 1978; Goff *et al.*, 1985; Torioni de Echaide y col., 1998).

2.5 Importancia económica

A nivel mundial las enfermedades transmitidas por garrapatas son un problema para la producción ganadera (Jongejan y Uilenberg 2004; Jonnson *et al.*, 2008). Dentro de estas enfermedades la anaplasmosis bovina es considerada como una enfermedad de alta prevalencia, que causa pérdidas económicas, restricciones comerciales y en México es considerada una enfermedad de reporte obligatorio (OIE, 2008, DOF, 2008); debido al curso de la enfermedad se registran pérdidas en la producción, por decremento en el peso, disminución en la producción de leche, abortos y muerte de animales, aunado a esto se suma el pago de servicios a profesionales en medicina veterinaria y los costos por el tratamiento de los animales. En 1999 se responsabilizó a esta enfermedad por la mortalidad del 26% del ganado dentro de los programas de mejoramiento genético en México (Rodríguez *et al.*, 1999). En 1973 en los Estados Unidos, la Asociación Nacional Ganadera calculó las pérdidas anuales en 1,000 millones de dólares; en 1976 en el estado de California estimó pérdidas de 300 millones de dólares, en Texas durante 1982 informaron de pérdidas por 97,984 dólares (Wagner et al., 1991) En Cuba, durante los primeros años de la década de 1990, la anaplasmosis bovina se presentaba como una de las primeras causas de mortalidad en el ganado adulto; en 1993 se registraron pérdidas superior a los dos millones de dólares, de acuerdo con datos de la Dirección de Medicina Veterinaria de Cuba (Corona et al., 2004). Aunque el costo económico mundial de la enfermedad esta subestimado debido a que rara vez se confirma el diagnóstico y la enfermedad se presenta conjuntamente con otros microorganismos (Brayton *et al.*, 2009) Debido a esto la anaplasmosis

representa un obstáculo para la competitividad y el desarrollo de la ganadería en regiones donde se presenta de forma endémica, los factores ambientales favorables como temperatura y humedad hacen que se presente la proliferación de vectores incrementando la incidencia de la enfermedad.

2.6 Distribución de la enfermedad

La anaplasmosis bovina es una enfermedad de distribución mundial con mayor presencia en regiones tropicales y subtropicales. En México la enfermedad es endémica y está distribuida con variaciones que dependen de los factores climáticos como temperatura y humedad (**Figura 3**). En una gran parte de la región norte del país la prevalencia de la enfermedad es menor al 10%, estos estados son: Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí. Los Estados de Baja California Sur, Jalisco, Aguascalientes, Colima, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo,

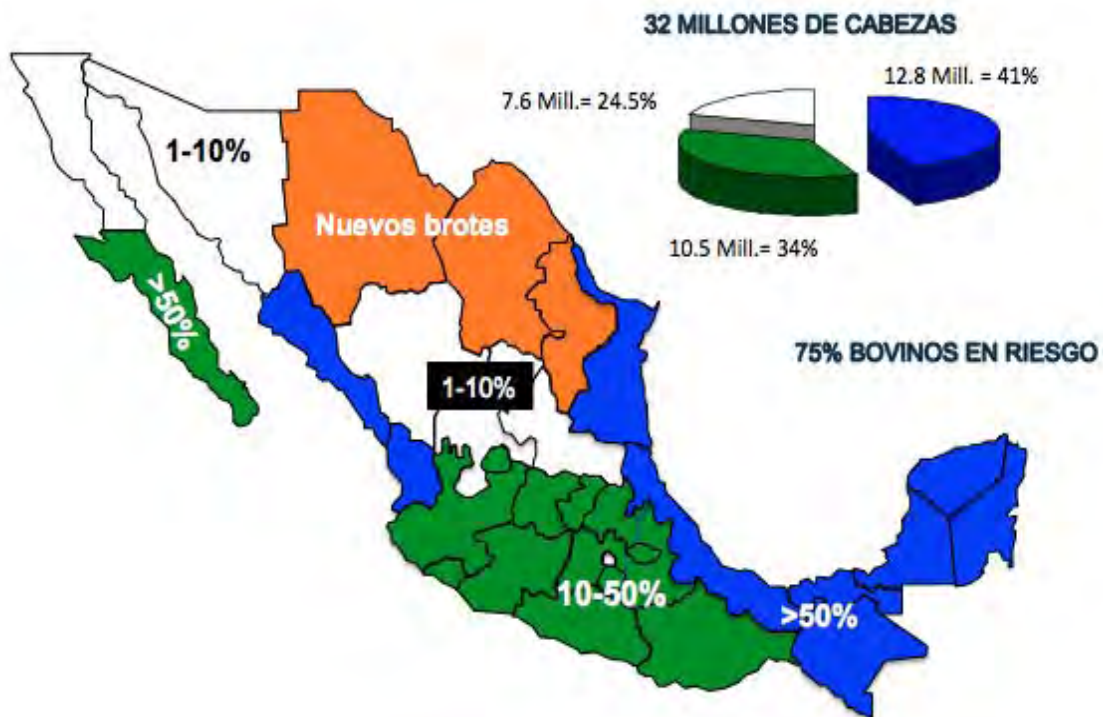


Figura 3. Distribución de la anaplasmosis bovina en México y proporción de ganado en relación con endemidad. La zona de color naranja se incluye en el área blanca para fines de endemidad y está marcada únicamente para señalar nuevos brotes en los Estados de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila (Modificado de Rodríguez *et al.*, 2009).

Estado de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Guerrero y Oaxaca tienen una prevalencia entre el 10 y el 50%. En la zona costera del pacífico comprendiendo Sinaloa, Nayarit y la zona costera del Golfo integrada por Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Chiapas, tienen una prevalencia mayor al 50% (Osorno y Ristic 1977; Ocampo *et al.*, 2006).

2.7 Genoma

El primer reporte de secuenciación del genoma completo de *A. marginale* fue publicado por Brayton y col. (2005) utilizando la cepa St Maries (**Figura 4**); el genoma en este aislado consiste de 1,197,687 pares de bases (pb); asimismo, se reportó la cantidad de G + C que fue de 49.8%.

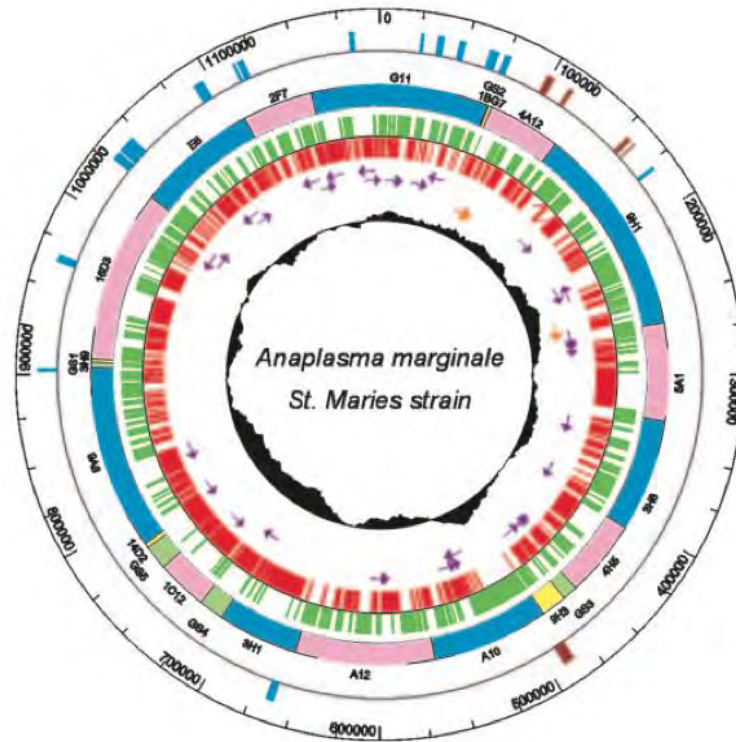


Figura 4. Mapa genético de *A. marginale*. El círculo interior representa la proporción GC (G-C/G+C). El segundo y tercer círculo muestran la posición y la orientación de los genes RNAr (flechas naranja y rNAT (flechas moradas). El cuarto y quinto círculo muestran las posiciones de las secuencias codificantes predichas en su orientación hacia adelante (rojo) y de reversa (verde) el sexto círculo muestra la posición de los BACs (Bacterial Artificial Chromosome) (BACs completos en azul y rosa; parciales en amarillo) y en verde fragmentos de PRC que han sido secuenciados. El séptimo círculo muestra las posiciones de las superfamilias genéticas *msp1* (azul) y *msp2* (café). (Obtenido de Brayton *et al.*, 2009).

Actualmente se encuentran también en el banco de genes los genomas de las cepas Mississippi, Florida, Virginia y Puerto Rico (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). *A. marginale* es la especie tipo y recientemente se han incluido en la familia *Anaplasmataceae* al agente de la ehrlichiosis granulocítica en humanos, *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*, *Anaplasma (Ehrlichia) equi*, *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* y *Anaplasma (Ehrlichia) platys* además de comprender a *A. centrale* y *A. ovis* (Dumler *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Características generales del genoma de *A. marginale*

Tamaño del genoma	1,197,687 pb
G + C	49%
Codificación de proteínas (%)	86%
Asignación funcional	567
Asignación familiar conservada	107
Conservadas hipotéticamente	126
Hipotéticos	151
Pseudogenes funcionales	16
Dominios truncados	8
Densidad de genes	0.79
Longitud media de los genes	1077
ARN Ribosomal	3
ARN transferencia	37

Modificado de Brayton *et al.*, 2005.

2.8 Caracterización de aislados

Diferentes aislados de *A. marginale* han sido caracterizados alrededor del mundo de acuerdo a su morfología, secuencias proteicas, características antigénicas y su habilidad para infectar y ser transmitidas por garrapatas (Scoles *et al.*, 2007; Galleti *et al.*, 2009; Ueti *et al.*, 2007). *A. marginale* es un organismo que utiliza la variación genética como método de evasión inmunitaria, lo que dificulta su control por medio de vacunas (Futse *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2000). Aún cuando la inmunoprofilaxis es la forma idónea de control para esta enfermedad no existen vacunas inactivadas efectivas. Por otro lado, algunos países usan cepas de *A. marginale* de baja virulencia en forma rutinaria, aunque esto conlleva el riesgo de transmisión de otros patógenos de la sangre (Bock *et*

al., 2003; Maas, 2007); en México sin embargo, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha validado a nivel de campo vacunas locales inactivadas y una vacuna atenuada que se han usado en bovinos de los estados de Veracruz, Colima y Tamaulipas (Orozco Vega *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009).

2.9 Proteínas de Superficie

Dentro de los primeros estudios de antígenos inmunorelevantes de la rickettsia se han caracterizaron seis proteínas de la superficie llamadas “Proteínas Principales de Superficie” (MSP por sus siglas en inglés) con diferentes pesos moleculares (PM); MSP1a de 105 kDa, MSP4 de 31kDa y MSP-5 de 19kDa, las cuales están codificadas por un sólo gen cada una; en contraste, MSP1b de 105kDa, MSP2 de 36kDa, MSP3 de 86kDa son codificadas por familias multigénicas (Palmer *et al.*, 1984, de la Fuente *et al.*, 2003; Brayton *et al.*, 2005). Dichas proteínas han sido evaluadas por su inmunogenicidad para vacunas, o diagnóstico y determinación de relaciones filogenéticas (Vidotto *et al.*, 1994; Palmer y McElwain 1995; Torioni *et al.*, 1998). Los trabajos filogenéticos de diferentes aislados se han centrado principalmente en el complejo MSP1 (MSP1a y MSP1b) y MSP4, mientras que se ha encontrado una amplia diversidad para MSP1a, que se podría explicar en sentido de la presión ejercida por el sistema inmune y movimiento del ganado (Kocan *et al.*, 2008). MSP2 y MSP3 se encuentran codificados por dos familias multigénicas muy grandes y polimórficas (Palmer *et al.*, 1986). La secuencia de MSP2 presenta una composición antigénica que varía en cada ciclo de rickettsiemia en el ganado de forma programada (Palmer *et al.*, 2009) y al azar en las garrapatas persistentemente infectadas (Rurangirwa *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2001; Löhr *et al.*, 2002). MSP2 se encuentra codificada en un locus policistrónico, MSP3 al igual que MSP2, varía en sus propiedades antigénicas y su estructura entre aislados de diferente región geográfica (Barbet *et al.*, 2000, Brayton *et al.*, 2001). MSP4 es codificada por gen único, presenta una mínima diversidad en aislados mexicanos; finalmente, MSP5 presenta un epítipo tipo B

conformacional altamente inmunogénico (Munodzana *et al.*, 1998) y es muy conservada en los aislados hasta la fecha analizados (Strick *et al.*, 2007); y es ampliamente utilizada con fines diagnósticos por medio de la prueba de ELISA competitiva (Torioni-Echaide *et al.*, 1998; Almazán *et al.*, 2008, Jiménez *et al.*, 2008,).

2.10 Nuevas proteínas relevantes

A pesar de varios estudios realizados en la caracterización de las proteínas antes mencionadas, es probable que existan más de 6 proteínas en la superficie de la membrana de la rickettsia. Estudios preliminares usando electroforesis de dos dimensiones e inmunoblot mostraron proteínas de diferentes pesos moleculares que son reconocidas por IgG2 en animales vacunados y protegidos contra la anaplasmosis (Riding *et al.*, 2003, Hope *et al.*, 2003; Barigye *et al.*, 2004). Actualmente, basados en la secuencia del genoma de la rickettsia los estudios se enfocan en los mecanismos participantes y en los antígenos asociados a la inmunidad inducida y se han identificado gran cantidad de proteínas no reportadas, incluyendo proteínas de translocación y algunas homologas del Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV) (López *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2008; Suttén *et al.*, 2010).

2.11 Sistemas de secreción

Muchas especies bacterianas utilizan sistemas especializados para la transferencia y secreción de macromoléculas a través de las membranas, estos sistemas de secreción se agrupan en seis grandes grupos llamados tipo I, II, III, IV, V, y VI (Juhas *et al.*, 2008). Las bacterias secretan o translocan una gran cantidad de proteínas a la membrana celular y al medio exterior incluyendo resistencia a antibióticos o metales pesados, toxinas, adhesinas y enzimas, muchas de estas sustancias secretadas son necesarias para mantener el ciclo de vida bacteriano (Rances *et al.*, 2009). Específicamente, las bacterias Gram-negativas han evolucionado con múltiples estrategias para transportar proteínas a través de la membrana, cada estrategia incluye diferentes complejos

moleculares especializados conocidos como sistemas de secreción y se han clasificado en Sec-dependientes y Sec-independientes; las primeras utilizan una secuencia señal en el extremo amino terminal usualmente de 20-25 aminoácidos y las Sec-independientes traslocan desde el citosol al exterior celular sin intermediarios. Las proteínas atraviesan las barreras lipídicas, membrana interna y membrana externa, separadas por el espacio periplásmico y el peptidoglicano (Pei *et al.*, 2008; Filloux, 2009).

2.11.1 Sistema de secreción tipo I

Es un sistema Sec-independiente para la translocación, es decir se trata de un sistema de un sólo paso, no hay intermediarios en el periplasma, está constituido de tres componentes, un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador β -C (de sus siglas en inglés β -C) (TP-binding cassette) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión). El prototipo para ejemplificar este sistema es la secreción de la toxina α -hemolisina, toxina que se produce principalmente en cepas de *E. coli* que causan infecciones del tracto urinario (*E. coli* uropatogena) y es un factor de virulencia importante debido a su actividad citolítica y citotóxica (Holland *et al.*, 2005).

2.11.2 Sistema de secreción tipo II

Este sistema es el responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas como por ejemplo la toxina del cólera. Esta vía también es conocida como sistema general de secreción. Ocurre en dos etapas primero la maquinaria Sec transloca el sustrato con el péptido líder a través de la membrana plasmática por lo que este sistema es una vía Sec-dependiente. El péptido es generalmente una secuencia corta de aproximadamente 30 aminoácidos de los cuales uno o varios presentan carga positiva y una secuencia de 0 a 20 aminoácidos de esta secuencia son hidrofóbicos. En la segunda etapa de translocación la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico para posteriormente ser

secretada a través de la membrana externa por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o secretín (Sandkvist, 2001).

2.11.3 Sistema de secreción tipo III

Este sistema constituye un área de estudio que ha sido extensamente investigada en los últimos años. Es una vía Sec-independiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta las células del huésped desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas. Este sistema ha sido identificado en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. El mecanismo se asemeja a una jeringa, de ahí que este sistema sea conocido también como inyectisoma. Este sistema tiene una estructura macromolecular constituida por más de 20 proteínas, que forma un canal continuo de secreción y permite la “inyección” o “translocación” de diferentes proteínas (efectores de virulencia), directamente al citoplasma de la célula hospedera. Dichas proteínas efectoras afectan diversas vías de transducción de señales, alterando múltiples funciones celulares, lo que facilita la infección bacteriana (He *et al.*, 2004).

2.11.4 Sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV es un aparato de transportación ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas y Gram positivas es una vía recientemente identificada, homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de ADN y proteínas (**Figura 5**). Se conoce que para algunos patógenos como *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Anaplasma phagocytophilum* y otras rickettsias que utilizan esta vía para secretar toxinas (Rances *et al.*, 2008), La exportación de la toxina pertussis (agente causante de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos (González-Pedrajas y Dreyfus, 2003). El sistema de

secreción tipo IV fue primeramente descrito para *Agrobacterium tumefaciens* consistiendo de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4 que transfieren el complejo Proteína-ADN en un sólo paso desde el citoplasma hasta la célula eucarionte (Pei *et al.*, 2008). El papel del SSTIV en los mecanismos de patogénesis se ha descrito en diferentes organismos incluyendo, *A. tumefaciens*, *L. pneumophila*, *H. pylori*, *B. pertussis* y *B. suis* (Yeo y Waksman 2004; Baron *et al.*, 2002) donde VirB3 a VirB6 y VirB8 a VirB11 son esenciales para mediar la persistencia de estas bacterias en células del sistema reticuloendotelial de los hospederos (den Hartigh *et al.*, 2008). Los datos obtenidos por supresión de estos genes ha demostrado que se disminuye su capacidad de crecimiento en la línea celular J774A.1 y cuando el gen suprimido es restablecido, el crecimiento *in vitro* es parcialmente restaurado (Pei *et al.*, 2008). Las proteínas del SSTIV VirB también se cree que participan en la citotoxicidad hacia macrófagos infectados con mutantes rugosos de *Brucella melitensis* en los que el antígeno O de superficie está acortado, por lo que el SSTIV está más expuesto y puede translocar proteínas de citotoxicidad más fácilmente (den Hartigh *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009). Se ha reportado también de ejercer un papel en la patogénesis en *Bartonella*, donde VirB se requiere para el establecimiento de la infección intraeritrocítica, mientras que una cepa que carece de VirB4 se ha demostrado ser no virulenta (González y Dreyfus, 2003). En *A. marginale* se han reportado proteínas homólogas al sistema de secreción tipo IV. Se han realizado estudios con las proteínas VirB2, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4 y CTP (Brayton *et al.*, 2005, López *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2008) En un estudio reciente se renombró a la CTP como VirB9-1 y la proteína VirB9 como VirB9-2 en concordancia con los reportes para *Anaplasma phagocytophilum* (Sutten *et al.*, 2010).

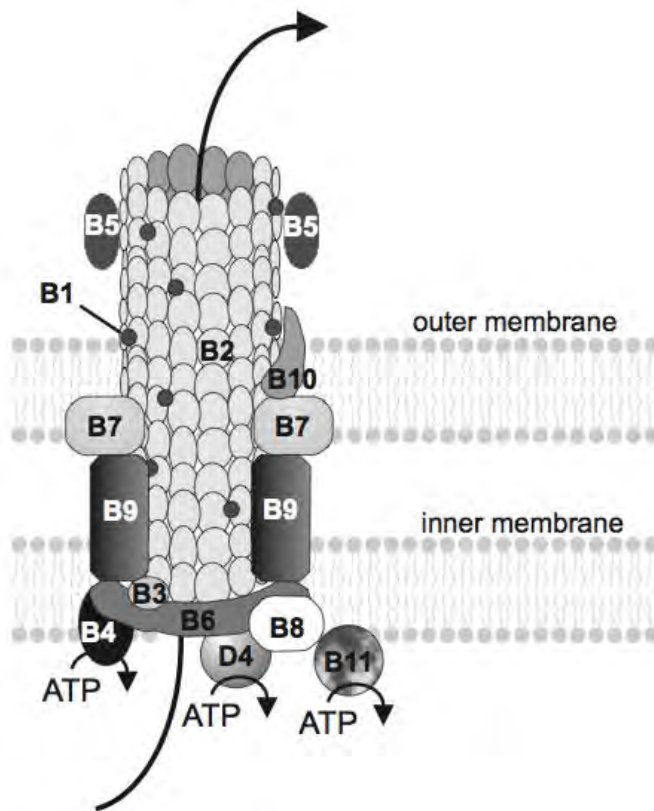


Figura 5. Sistema de secreción tipo IV *Agrobacterium tumefaciens* KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.jp/kegg/>).

2.11.5 Sistema de secreción tipo V

El sistema de secreción tipo V es Sec-dependiente formado por tres vías distintas que comparten una serie de características comunes. La vía tipo V (A) comprende la vía clásica de los autotransportadores, la vía de tipo V (B) comprende la forma dimérica y la forma trimérica de los autotransportadores forma la secreción tipo V (C). Las tres diferentes vías del sistema de secreción tipo V comparten dos etapas del mecanismo de translocación, en donde las proteínas son translocadas a través de la membrana interna en una forma Sec-dependiente, mientras que la secreción a través de la membrana externa depende de un β -barril. La simplicidad mecánica de este sistema puede explicar por qué la secreción tipo V es el mecanismo más frecuente para la exportación de proteínas en bacterias Gram-negativas (Junker *et al.*, 2006).

2.11.6 Sistema de secreción tipo VI

Este sistema de secreción se ha descrito recientemente en bacterias Gram-negativas tanto en las especies patógenas como mutualistas, (Bingle *et al.*, 2008). Igual que los sistema de secreción tipo III y IV, el sistema de secreción de tipo VI es Sec-independiente y, probablemente, coloca directamente su substrato dentro del citoplasma de las células del huésped (Bingle *et al.*, 2008).

2.12 Sistema homólogo de secreción tipo IV en *A. marginale*

El análisis del genoma de *A. marginale* y *E. ruminantium* ha mostrado que genes homólogos del SSTIV están anotados en sus genomas (Brayton *et al.*, 2005; Collins 2005) y están compuestos por un operón conteniendo *sodB*, *VirB3*, *VirB4*, y *VirB6* y un segundo operón más distante que contiene *VirB8*, *VirB9*, *VirB10*, *VirB11* y *VirD4*, mientras que en *E. ruminantium*, existen dos clusters de genes VirB (*VirD4*, *VirB8*, *VirB9*, *VirB10*, *VirB11* y *VirB3*, *VirB4*, *VirB6*) y tres genes adicionales (*Erum5210*, *Erum5220*, and *Erum5230*) que probablemente codifican para proteínas del SSTIV.

En estudios recientes con *A. marginale*, se ha encontrado que *VirB9*, *VirB10* y la proteína conyugal de transferencia CTP son reconocidos por linfocitos B y T en respuesta a la inmunización con membranas de la rickettsia en el ganado; así *VirB9* recombinante es reconocida en forma intensa y específica por linfocitos CD4⁺. En estos estudios sugieren que *VirB9* podría ser usada para el desarrollo de vacunas contra la anaplasmosis ya que presenta una homología del 99% para la secuencia de nucleótidos y 100% para la secuencia de aminoácidos para los aislados de *A. marginale* estudiados en Brasil y Estados Unidos y muestra una alta respuesta inmunogénica (Vidotto *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007).

Mediante análisis *in silico* de los genomas de bacterias y en particular de *A. marginale* se han identificado proteínas homólogas del SST4 que cuando son producidas en forma recombinante, son identificadas por anticuerpos de animales inmunoprotegidos contra la enfermedad; lo reportado por algunos autores indica que *VirB9* podría ser utilizado en el desarrollo de vacunas (López

et al., 2007; Araújo *et al.*, 2008; Vidotto *et al.*, 2008). Sin embargo hasta la fecha sólo se conocen las secuencias de VirB9 de los aislados: PR1 de Brasil, Pto Rico, St. Maries, Virginia, Mississippi y Florida de Estados Unidos (López *et al.*, 2007; Vidotto *et al.*, 2008; GenBank). A pesar de que ya existe un banco de cepas Mexicanas de *A. marginale*, no existía información respecto de este marcador desconociendo la posible variabilidad para la proteína VirB9 en aislados mexicanos, de igual manera se desconocía la localización de la proteína VirB9 en *A. marginale*. El éxito de una vacuna recombinante o sintética depende en mucho que las proteínas/péptidos usados sean comunes a muchos aislados del patógeno en cuestión y que se encuentre en la superficie de la membrana externa para el reconocimiento por el sistema inmune del hospedero. Por lo que en este estudio se localizó la proteína VirB9 de *A. marginale* con base en análisis *in silico* y biológicos.

2.13 Mecanismos inmunológicos

Las bacterias del género *Anaplasma* así como otros patógenos intracelulares permanecen fuera del alcance del sistema inmune mientras que se encuentran dentro de la célula hospedera, sin embargo los animales que se recuperan a partir de una infección natural o con cepas de baja virulencia, pueden alcanzar protección sólida y duradera. La infección con *Anaplasma* induce la producción de anticuerpos IgG de diferentes subclases los cuales son asociados con funciones diferentes y resultados también diferentes en la resolución del cuadro clínico. En los bovinos la IgG1 está asociada con una respuesta inmune de tipo Th2 (Humoral), mientras que IgG2, está asociada a una respuesta inmune tipo Th1 (celular). La protección contra la Anaplasmosis se asocia a una respuesta de tipo Th2, que se inicia a partir del reconocimiento de los cuerpos iniciales y/o eritrocitos infectadas por macrófagos y células dendríticas, posterior se da la destrucción y fagocitosis de los cuerpos iniciales de *A. marginale* cuyos antígenos son procesados y reducidos a fragmentos pequeños los cuales son presentados en el contexto de los receptores clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, a linfocitos T cooperadores CD4⁺ los cuales responden con

citocinas como el IFN- γ , interleucinas 2 y 12 (IL-2, IL-12) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Brown *et al.*, 1998). El interferón gamma estimula linfocitos B los cuales empiezan a diferenciarse dando células plasmáticas, produciendo anticuerpos específicos de tipo IgG2 que van dirigidos a los epítomos correspondientes en los antígenos de *A. marginale* brindando especificidad favoreciendo la fagocitosis por los macrófagos y la producción de óxido nítrico que participa en la destrucción de bacterias incluyendo las rickettsias (Brown *et al.*, 1998; Barigye *et al.*, 2004). Este modelo propone una colaboración íntima entre la inmunidad humoral (IgG2) e inmunidad celular (CD4⁺) dicho modelo fue originalmente descrito por Brown *et al.*, (1998) y verificado por Barigye *et al.*, (2004) explicando la respuesta inmune de los animales protegidos; estos animales sin embargo, bajo condiciones de estrés o que induzcan estados de inmunosupresión, pueden padecer recidivas (Barbet *et al.*, 2001). Estas recidivas se explican en parte por un fenómeno de variabilidad antigénica de los genes *msp2* y *msp3*. En este sentido, estos genes sufren un proceso de recombinación en mosaico, donde una serie de genes truncados funcionales que componen el dominio hipervariable, se fusionan con el gen principal (dominio conservado), dando lugar a variantes que suceden periódicamente cada 6 a 8 semanas, induciendo una respuesta inmune específica contra cada variante en cada ciclo de rickettsemia (Brown *et al.*, 2003; 2004).

Sin embargo, en experimentos de inmunización con antígenos en forma de ADN o recombinantes y posterior desafío de los animales inmunizados se ha observado que puede haber un decremento en los títulos de anticuerpos específicos, este fenómeno no parece deberse al efecto de células Th reguladoras sino más bien a la desaparición de las células Th CD4⁺ específicas presentes, al menos en las proteínas *Msp2* (Abbott *et al.*, 2005) y *Msp1a* (Han *et al.*, 2008). Esta desaparición de células CD4⁺ parece ser inducida por una sobrecarga de antígeno debida a la replicación masiva del patógeno, aunque se ha reportado en virus y otras bacterias (Finlay *et al.*, 2006). Los mecanismos inducidos en las células Th que hacen que estas desaparezcan (mueran) no se conocen bien, pero se ha postulado la apoptosis.

De esta manera, aunque se conoce ya mucho de la respuesta del sistema inmune del ovino hacia diferentes proteínas de superficie (Msp's) otras proteínas deben estar involucradas en el proceso de inmunidad contra *A. marginale*.

3. HIPÓTESIS

La proteína VirB9 está integrada y expuesta en la superficie de la membrana externa del *Anaplasma marginale*

4. OBJETIVO GENERAL

Ubicar la proteína VirB9 en aislados mexicanos de *A. marginale*, mediante análisis *in silico* y ensayos biológicos

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Amplificar el gen VirB9 de varios aislados mexicanos por PCR
2. Identificar el grado de identidad entre aislados
3. Analizar "*in silico*":
 - 3.1. La estructura probable de la proteína VirB9
 - 3.2. La presencia de epítomos tipo B en dominios externos
4. Expresar la proteína recombinante y diseñar péptidos sintéticos
5. Producir anticuerpos anti-VirB9
6. Determinar la localización celular de la proteína mediante ensayos biológicos

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Amplificación, clonación y secuenciación del gen *VirB9*

El estudio se desarrolló en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP. Se trabajó con aislados de *A marginale* de campo de diferentes regiones geográficas del país. De cada una de las cepas de *A. marginale* estudiadas se realizó la extracción de ADN por medio del paquete comercial Ultra Clean DNA® BloodSpin MoBio®, (Carlsbad CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron tubos estériles con capacidad de 2 ml y se adicionaron: la sangre de cada uno de los aislados en volúmenes de 200 µl; 20 µl de proteasa K equivalente a 0.36 mg y 200 µl de la solución B1, compuesta por guanidina-HCl en monolaurato de polioxietilene sorbitan 20 (Tween 20), esta mezcla se agitó vigorosamente en Vortex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a 65 °C en baño María, Posteriormente, los tubos se centrifugaron (Microcentrífuga Hermle, Modelo Z230M) a 3 000 g por 5 segundos acto seguido se agregó 200 µl por cada tubo, de la solución B2 constituida por etanol absoluto, se agitó nuevamente en vortex durante 15 segundos. Nuevamente se centrifugó a 13,000 g por 5 segundos, la mezcla obtenida se transfirió a un tubo con filtro y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 g, después, se desechó el sobrenadante, transfiriendo únicamente el filtro a un tubo nuevo de 2 ml, al tubo con el filtro se agregaron 500 µl de la solución 3 conformada por guanidina-HCl y etanol, se centrifugó durante 30 segundos a 13,000 g, terminado este proceso, se removió el filtro y se decantó el sobrenadante se adicionó 500 µl de la solución 4 cuya composición es Tris-NaCl-etanol y se centrifugó durante 30 segundos a 13,000 g, descartando el sobrenadante. El filtro se transfirió por segunda ocasión a un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de la solución 5 compuesta de 0 mM de Tris-HCl, se incubó durante 5 minutos a 65 °C en baño María y se centrifugó 1 minuto a 13,000 g. El filtro se retiró, y el ADN quedó inmerso en el sobrenadante del tubo. El ADN se mantuvo a -20° C hasta su utilización. Con el ADN extraído

se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un par de iniciadores de acuerdo a las secuencias reportadas en el GenBank siguiendo los parámetros necesarios para obtener unas condiciones de amplificación óptima. Los iniciadores se enviaron sintetizar a la compañía Invitrogen: sentido 5'- ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGC-3' y antisentido 5'-CTAAAGCACCGTATTCACTACTTC-3'; estos iniciadores amplifican para 840 pares de bases amplificando en su totalidad el gen VirB9, los cuales se utilizaron en una concentración de 1 μ M de cada uno. La amplificación se hizo en un termociclador (Biometra T1™, Göttingen, Alemania) programado con un paso inicial de desnaturalización 94°C por 30 segundos, alineamiento a 52°C por 45 segundos y un paso final de extensión de 72°C por 90 segundos. Los amplicones obtenidos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El fragmento de VirB9 amplificado de los aislados Aguascalientes, Aguascalientes; Yautepec, Morelos y Tizimín, Yucatán, se clonaron en el vectores de clonación TOPO TA Cloning® Kit PCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y en el estuche CLONE-JET™ (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canadá), la reacción de clonación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La selección de las clonas del estuche TOPO TA Cloning se realizó mediante marcadores de selección de resistencia a la ampicilina y un segundo marcador por medio del gen reportero de la β -galactosidasa, al inducir la expresión con 40 μ g/ml de X-gal 5 bromo-4 cloro-3 indol-B-D galactosido (Amersham life science Piscataway, NJ) obteniéndose colonias azules y blancas de las cuales se seleccionaran las clonas transformadas (blancas), para la selección de las colonias con el estuche CLONE-JET se realizó por medio del gen de resistencia a ampicilina.

Se seleccionaron tres clonas recombinantes de los tres aislados de *A. marginale*, que fueron previamente verificadas por PCR específico utilizando los iniciadores VirB9; una vez realizada la confirmación se procedió a inocular cada una de las colonias en 14 ml del medio LB con ampicilina y se incubaron por 14 horas a 37°C. Posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico, utilizando el

estuche comercial *Wizard® plus SV Minipreps Purification System* de PROMEGA (Madison Wisconsin). Este estuche se basa en el método de lisis alcalina y en la adsorción del ADN en una resina de sílice.

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría a 260/280 nm. Para realizar la secuenciación, se envió al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México tres clonas de cada aislado conteniendo el inserto en una concentración de 750 µg/16 µl de ADN y las muestras fueron secuenciadas en sentido y antisentido con los iniciadores proporcionados en cada vector.

6.2 Análisis *in silico* de la proteína VirB9

Las secuencias nucleotídicas y cromatogramas se obtuvieron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor para posteriormente convertirlas en formato FASTA con la utilidad disponible en el sitio de internet <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/readseq.cgi> de la base de datos GenBank disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Se obtuvieron las secuencias reportadas de la proteína VirB9 de los aislados: Florida y St Maries de Estados Unidos de Norteamérica, el aislado PR1 proveniente de Brasil y las secuencias de la proteína VirB9 de otras especies de *Anaplasma*.

La estimación de la secuencia de aminoácidos se realizó a partir de la secuencia de nucleótidos con los programas disponibles en <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Se realizó la alineación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para identificar diferencias en las secuencias con los programas disponibles en las páginas <http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html> y Clustal W en <http://align.genome.jp/>. Con este último programa se realizó un árbol filogenético bajo el algoritmo Neighbor Joining. Se realizó la detección de intrones en la secuencia de la proteína VirB9 de aislados mexicanos estudiados con el programa GENSCAN, disponible en la página <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>. El peso molecular y el punto isoeléctrico de

la proteína se obtuvo en la utilería disponible en línea en <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>, y con el programa SignalP 3.0 disponible en el sitio: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Se identificó si la proteína contenía un péptido señal. La predicción de estructuras secundarias se realizó mediante el programa PSIPRED disponible en la página <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> y el programa MEMSAT3 disponible en <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>. La predicción de hidrofobicidad se realizó por medio del programa ProtScale disponible en <http://www.expasy.ch/tools/protscale.html> mediante el algoritmo Kyte Doolittle, donde valores superiores a 1.6 nos indican posibles regiones hidrofóbicas. Para la predicción de dominios transmembranales se realizó con el programa TMPred disponible en http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html donde valores superiores mayores a 500 son significativos. Mediante el programa TMHMM se logró conocer si nuestras secuencias contienen hélices transmembranales, este programa se encuentra en el sitio <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>. Para la predicción de epítomos lineales y regiones antigénicas se trabajó con los programas bioinformáticos disponibles en línea, ABCPred, BCEPred y ANTIGENIC disponibles en http://bioinfo.bgu.ac.il/bsu/immunology/epitope_pred/index.htm. Por medio del programa Pfam fueron determinados los dominios y su ubicación en la proteína VirB9 <http://pfam.sanger.ac.uk/>.

6.3 Expresión de la proteína rVirB9

Para la expresión de la proteína VirB9 se realizó un PCR con los iniciadores diseñados previamente en el aislado Yautepec, Morelos y se llevó a cabo la reacción de ligación en el vector pET SUMO (K300-01 Invitrogen, Carlsbad, Ca.). La reacción se incubó toda la noche a 15°C, para posteriormente realizar la transformación en células de *E. coli* MATCH1; la selección de clones recombinantes se llevó a cabo por medio de PCR con los iniciadores VirB9, el cual fue visualizado en una matriz de agarosa al 1% en un transiluminador UVP (Upland CA). La verificación de la dirección del inserto 5-3' se llevó a cabo

mediante un PCR con el iniciador sentido VirB9 y antisentido pET SUMO T7 y, para confirmar la dirección del fragmento se envió a secuenciar ADN de tres clonas en una concentración de 750 µg/16 µl con los iniciadores del vector al Instituto de Biotecnología de la UNAM; a la secuencia de nucleótidos obtenida se estimó la secuencia de aminoácidos con el programa disponibles en <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> donde se verificó el marco de lectura abierto.

La clona recombinante con el fragmento en dirección 5'-3' seleccionada fue inoculada en 14 ml de medio de LB con kanamicina y se incubó por 14 horas a 37°C en agitación constante a 200 rpm, el medio inoculado fue centrifugado a 8,000 g 10 min a temperatura ambiente para realizar la extracción de ADN plasmídico por medio del estuche comercial SV minipreps DNA purification system (Promega Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el ADN plasmídico obtenido se procedió a realizar la transformación en células *E. coli* BL21 con 10 ng/5 µl de ADN la mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 30 minutos, después la mezcla recibió un choque térmico de 30 seg a 42°C, posteriormente se mantuvo en hielo 5 minutos y se agregaron 250 µl medio S.O.C. (20 g Triptona, 5 g extracto de levadura 0.5 g NaCl y 10 ml de KCl 250 mM por litro). para incubarlo a 37°C una hora con agitación a 200 rpm, pasado el tiempo, la reacción de transformación fue inoculada en 10 ml de medio LB conteniendo 50 µg/ml de kanamicina y glucosa al 1%, incubándose por 14 horas a 37°C con agitación continua.

Para optimizar la expresión de la proteína VirB9 se realizó la expresión de la proteína inoculando 10 ml de medio LB con kanamicina, glucosa % con 500 µl del cultivo de toda la noche arriba mencionado, los 10 ml se incubaron por 4 horas a 37°C en agitación hasta obtener un valor de 0.5 DO a 600 nm. El cultivo se dividió en dos (5 ml cada cultivo) y se realizó la inducción con 1 mM IPTG en uno de las fracciones. Se o tuvieron alicuotas de 500 µl aproximadamente ajustando a 0.4 DO a 600 nm con la finalidad de equilibrar la cantidad de células por alicuota, esto se realizó cada hora desde en el tiempo 0, 2, 5, y 12, cada

alícuota fue centrifugada a 20,000 g por 30 seg, los sobrenadantes fueron eliminados y las pastillas fueron resuspendidas en 500 µl de solución de lisis (50 mM fosfato de potasio, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glicerol, 0.5% Triton X-100 y 10 mM imidazol) la mezcla se congeló en nitrógeno líquido y descongeló en baño María a 42°C en tres ocasiones para después centrifugarlas a 20,000 g por 1 minuto. Se obtuvo un sobrenadante y una pastilla a los cuales se les adicionaron 50 µl de la solución de muestra 2X SDS-PAGE.

Una vez realizada la electroforesis de las muestras se procedió a realizar un Western-blot realizando primeramente la transferencia de las proteínas en una cámara semi-seca (BioRad) a una membrana de PVDF a 250 mA por una hora, posteriormente se realizó el bloqueo de la membrana por una hora con una solución de bloqueo (PBS, Triton X-100, 0.1% y BSA 3%) y después 4 lavados de 5 minutos con solución de lavado (PBS, Triton X-100, 0.1%) se agregó el primer anticuerpo (HIS-Probe, Sta. Cruz) diluido 1:8000 en PBS 1X, Triton 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) 1% y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados de la membrana siguiendo las indicaciones previas y se agregó el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:5000 (Cabra α IgG conejo Sta. Cruz) se incubó en agitación dos horas a temperatura ambiente y se lavó la membrana como se describió anteriormente, el revelado de la membrana se realizó con BCIP/NBT 15 min en oscuridad.

Para determinar la solubilidad de la proteína recombinante, se realizó un Western blot al sobrenadante y a la pastilla del cultivo de 12 horas, los cuales fueron sometidos a una lisis con 50 mM fosfato de potasio, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glicerol, 0.5% triton X-100 y 10 mM imidazol, al sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 50 µl de la solución de muestra 2X SDS-PAGE.

6.4 Purificación de la proteína VirB9

Debido a que la proteína recombinante VirB9 expresada no es soluble se procedió a obtener una pastilla de 300 ml de cultivo la cual fue lisada con

solución B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 mM Urea, pH 8.0), 5 ml por gramo de peso húmedo, la mezcla se agitó 60 min a temperatura ambiente evitando la formación de espuma, el lisado fue centrifugado a 10,000 g por 30 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante fue conservado hasta su purificación por una columna.

El lisado fue transferido a una columna de níquel, Ni-NTA Superflow, QUIAGEN de 1.5 ml, primeramente la columna fue equilibrada con 7.5 ml de solución B con un flujo de 1 ml/min. Posteriormente se agregaron 5 ml del lisado y se incubo en refrigeración a 4°C por 12 horas, posteriormente se agregaron 15 ml de la solución B. La columna fue lavada con 15 ml de solución C (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 mM Urea, pH 6.3) removiendo uniones inespecíficas a la resina, se colectaron estas fracciones para su posterior análisis. La elución de la proteína se realizó con solución D (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 mM Urea, pH 5.9) y solución E (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 mM Urea, pH 4.5) 7.5 ml de cada uno y se procedió a su análisis por SDS-PAGE.

6.5 Producción de anticuerpos anti-VirB9

Los péptidos conteniendo los epítomos lineales tipo B obtenidos como resultado del análisis *in silico* de la proteína VirB9 (epítomo 1.- LSAPSLAKNP y epítomo 2.- AAGYKEVADE) fueron enviados a sintetizar de forma comercial en la compañía Invitrogen y se utilizó un tercer péptido conteniendo un epítomo no relacionado como control de la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina*, todos los péptidos fueron conjugados con Hemocianina de *Megathura crenulata* (Keyhole Limpet KLH). KLH comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) también fue usado como control.

Para la producción de anticuerpos específicos se usaron conejos machos con un peso aproximado de 2 kg. Los conejos fueron mantenidos en el Bioterio del Centro de investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional en Salud Pública. Cada uno de los dos péptidos sintéticos, la proteína recombinante rVirB9 y KLH fueron inoculados en dos conejos a una concentración de 20 µg/ml

de péptidos y 100 µg/ml de rVirB9 con adyuvante Montannide ISA70 (SEPPIC Francia) vía subcutánea con intervalos de 15 días en las primeras dos inoculaciones y posteriormente en intervalos de 10 días a una concentración de 100 µg/ml de péptidos inoculando en 12 ocasiones. El monitoreo de la respuesta humoral de los conejos respecto a los péptidos y proteína recombinante se verificó por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) como se describe a continuación: se fijaron laminillas de sangre de bovino infectada con la cepa Yautepec, Morelos de *A. marginale* con un porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) del 41% y como control se utilizaron laminillas de sangre de un bovino no infectado, todas las laminillas fueron conservadas en congelación a -80°C hasta su uso. Cada ocasión que se realizó la inmunofluorescencia se obtuvieron de congelación las laminillas congeladas y se desecaron una 1 hora a 37°C en estufa dentro de un frasco conteniendo gel de silica, posteriormente se fijaron en acetona por 30 min. Se realizó la dilución de 1:80 de los sueros problema en P S pH 7.4 y se agregaron 0 µl dentro de cada uno de los círculos delimitantes, como control positivo se utilizó suero de conejo anti-rMSP5 de *A. marginale* (proteína recombinante MSP5 por sus siglas en ingles Major Surface Protein 5). Los sueros se incubaron 30 minutos a 37° C dentro de una cámara húmeda. Las laminillas fueron lavadas dos veces con PBS y otra ocasión más con agua destilada 5 minutos en agitación (Goldman *et al.*, 1972). Posteriormente se agregaron 0 µl de conjugado en una dilución : 00 (α IgG conejo Dylight 488 filtro de absorción 493 y emisión 518 (Jackson West Grove PA). Se lavaron las laminillas según lo descrito previamente y posteriormente fueron observadas al microscopio (Leica DMLB) de epifluorescencia con glicerina fosfatada en el objetivo 100X.

6.6 Reconocimiento de la proteína rVirB9

Para este ensayo se realizaron electroforesis de acrilamida utilizando marcador molecular (Fermentas SM0671), cuerpos iniciales de la rickettsia obtenidos de glóbulos rojos de bovino infectados con el aislado Yautepec, Morelos. También se utilizaron membranas de glóbulos rojos de bovino, cultivos de *E. coli* BL21 sin

vector, cultivo con vector sin inserto y cultivo con vector con inserto VirB9, terminada la electroforesis de las muestras se procedió a realizar un Western-blot realizando la transferencia de las proteínas en una cámara semi-seca (BioRad) a una membrana de PVDF (Millipore) a 250 mA por una hora, posteriormente se realizó el bloqueo de las membranas por una hora con una solución de bloqueo (PBS, Triton X-100, 0.1% y BSA 3%) y después 4 lavados de 5 minutos con solución de lavado (PBS, Triton X-100, 0.1%) se agregó el suero correspondiente para cada membrana utilizando sueros de conejos que reconocieron el *A. marginale* por medio de la técnica de inmunofluorescencia y suero de un bovino inmune en una dilución 1:100 en PBS 1X, Triton 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) 1% y se incubó toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de la membrana siguiendo las indicaciones previas y se agregó el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:5000 (Ca ra α IgG conejo Sta. Cruz y Ca ra α IgG bovino, Jackson). Las membranas fueron incubadas en agitación dos horas a temperatura ambiente y se lavó la membrana como se describió anteriormente, el revelado de las membranas se realizó con BCIP/NBT 15 min en oscuridad.

6.7 Localización celular de la proteína VirB9

Para la localización celular de la proteína VirB9 se llevó a cabo la extracción de cuerpos iniciales siguiendo la técnica de Palmer y McGuire (1984) con ciertas modificaciones. Cuarenta ml de sangre fresca de un bovino infectado de *A. marginale* experimentalmente con el aislado de Yautepec, Mor. fue centrifugada a 5,000 g 15 min a temperatura ambiente, se eliminó el suero y células blancas, el paquete celular fue lavado en dos ocasiones llevando al volumen original con medio RPMI 1640 adicionado con 2 mM de L-glutamina y 25 mM de HEPES, el paquete de glóbulos rojos fue resuspendido en 80 ml de solución de lisis (Cloruro de amonio 0.83%; 0.01 M Tris pH 7.5) y se mantuvo 10 min en hielo para después centrifugarla a 23,000 g por 30 min a 4°C, el sobrenadante fue eliminado y se agregaron 80 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 2 mM de L-glutamina y 25 mM de HEPES, se centrifugó como se describió anteriormente en

dos ocasiones eliminando el sobrenadante, se agregó nuevamente 80 ml del medio RPMI 1640 con L-glutamina y HEPES y se sonicó por 2 minutos a 50 W con 1 min de descanso en baño de hielo, para posteriormente centrifugar en dos ocasiones a 1700 g por 15 min a 4°C y eliminar el sobrenadante, en la pastilla se obtuvieron los cuerpos iniciales de *A. marginale*.

Con los cuerpos iniciales liberados de los glóbulos rojos infectados con *A. marginale* se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando los sueros pre-inmunización y post-inmunización con rVirB9 producidos en conejos en una dilución 1:80, se incubó por 30 min a 37 °C en agitación, finalizada la incubación se centrifugó por 2 min a 8,000 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml con PBS pH 7.4, este proceso de lavado se repitió en tres ocasiones, posteriormente se agregó un anticuerpo conjugado a Dylight 594 (Jackson West Grove PA), filtro de absorción 591 y emisión 616 en una dilución 1:100 y se incubó por 30 min a 37 °C en agitación, pasado el tiempo se realizaron tres lavados conforme a lo descrito previamente y se resuspendieron las células en 3 ml de PBS. Después de la inmunofluorescencia se realizó una tinción vital con éster succinimidil diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA de Molecular Probes, Invitrogen) a los CI se le agregaron 500 µl de PBS atemperado a 37 °C conteniendo CFDA en una concentración final de 1.25 µM, las células fueron incubadas 15 min a 37° C pasado este tiempo se centrifugó 1 minuto a 8,000 g en microcentrífuga y la pastilla fue resuspendida con 500 µl el medio RPMI 1640 descrito previamente y se incubó por 30 min a 37 °C, terminado el tiempo de incubación 5 µl de los CI se depositaron en una laminilla y se hizo un extendido, que fue fijado con 5 µl de metanol, las laminillas se secaron por 15 min y se agregaron 5 µl de la solución de montaje Vectashield H1300 (Vector Laboratorios) se colocó un cubreobjetos el cual fue sellado con barniz, las laminillas fueron observadas al microscopio de epifluorescencia Leica DMLB con aceite de inmersión en el objetivo 100X y se obtuvieron fotografías con una cámara Sony alfa-230.

7. RESULTADOS

7.1 Amplificación, clonación y secuenciación del gen *VirB9*

Los iniciadores específicos diseñados para lograr la amplificación del gen *VirB9*, de *A. marginale* funcionaron adecuadamente para lograr la amplificación, el iniciador en sentido está ubicado en el codón de inicio de la proteína y el iniciador antisentido se encontró en el codón de paro de la proteína. Las características de los iniciadores utilizados se describen en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Análisis de iniciadores mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 disponible en <http://www.idtdna.com>

Iniciador	Sentido	Antisentido
Secuencia 5' 3'	ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGC	CTAAAGCACCGTATTCACACTTC
Longitud	26 bases	24 bases
% de GC	26.9	41.7
Temp Fusión	51.2	53.3
ΔG	0.41 kcal.mole ⁻¹	0.02 kcal.mole ⁻¹
Delta G	-5.36 kcal/mole	-3.61 kcal/mole

Con los iniciadores previamente diseñados se amplificó el gen *VirB9* por medio de PCR utilizando ADN genómico de seis diferentes aislados mexicanos de *A. marginale*, observándose un amplicón entre 800 y 900 pb en cada aislado analizado de las diferentes regiones geográficas de México.

La separación de los amplicones en geles de agarosa (**Figura 6**) mostró que el tamaño observado de los amplicones de los seis aislados inicialmente estudiados fueron muy similares, por lo que se decidió secuenciar solo tres de los aislados geográficamente distantes los cuales fueron: Tizimin, Yucatán; Aguascalientes, Aguascalientes y Yautepec, Morelos para compararlas entre sí y determinar si existían diferencias. Los productos de PCR de las cepas fueron ligados a vectores de clonación TOPO TA Cloning® Kit PCR 2.1 (Invitrogen,

Carlsbad, CA) y en el kit CLONE-JET™ (Fermentas Life Sciences Ontario Canad) y transformados células TOP 10 y DH5α de *E. coli*; para después de estas bacterias obtener el ADN plasmídico para su secuenciación (**Figura 7**).

De las secuencias de nucleótidos de las clonas analizadas en formato FASTA y se obtuvo una secuencia consenso a partir de las tres secuencias en sentido y tres secuencias en antisentido resultando una secuencia de 840 pb para cada uno de los aislados. A las secuencias consenso se realizó un alineamiento con el programa Clustal W. En la alineación se observaron solo dos diferencias en los nucleótidos 369 y 501. Las cepas de Tizimín y Yautepec presentaron una citosina en el nucleótido 369, mientras que Aguascalientes una timina; los aislados Tizimín y Yautepec presentan una adenina y Aguascalientes presenta una guanina en el nucleótido 501.

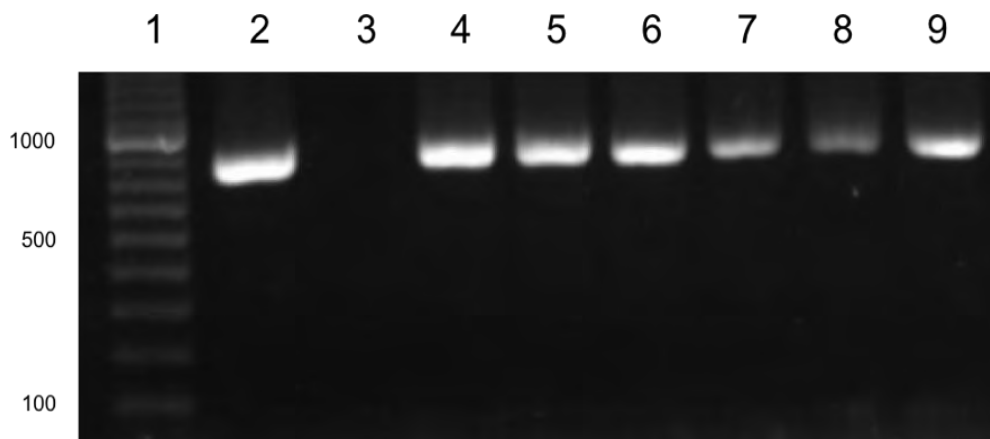


Figura 6. Electroforesis del producto de PCR VirB9 en agarosa al 1%. 1. Marcador, 2. Control (+) eritrocitos de bovino infectado, 3. Control (-) eritrocitos de bovino negativo, 4. Aguascalientes, Ags; 5. Texcoco, Mex; 6. Yautepec, Mor; 7. Tizimín, Yuc; 8. Soto la marina, Tam; 9. Veracruz, Ver.

7.2 Análisis *in silico* de la proteína VirB9

Alineación de secuencias mexicanas con sus contrapartes reportadas

En la alineación de las secuencias de VirB9 de aislados mexicanos con aislados PR1 de Brasil y St. Maries de EEUU se observan tres mutaciones silenciosas (**Figura 8**), en los nucleótidos 369, 501 ya descritas previamente y en la posición 663 donde se observa que los aislados mexicanos y St. Maries presentan una timina en dicha posición y el aislado PR1 de Brasil tiene una citosina.

AGUASCALIENTES	ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTTACAGGA	60
YUCATAN	ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTTACAGGA	60
MORELOS	ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTTACAGGA	60
AGUASCALIENTES	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
YUCATAN	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
MORELOS	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
AGUASCALIENTES	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
YUCATAN	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
MORELOS	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
AGUASCALIENTES	TTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAAGTGATGGCTATGGGAGACAGCGTTCAC	240
YUCATAN	TTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAAGTGATGGCTATGGGAGACAGCGTTCAC	240
MORELOS	TTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAAGTGATGGCTATGGGAGACAGCGTTCAC	240
AGUASCALIENTES	TGGAAGGTAAGCCCGTAGATAACAAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
YUCATAN	TGGAAGGTAAGCCCGTAGATAACAAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
MORELOS	TGGAAGGTAAGCCCGTAGATAACAAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
AGUASCALIENTES	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGGCAGGAGCTACGCTTTTGTATCTTGTTCAAAG	360
YUCATAN	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGGCAGGAGCTACGCTTTTGTATCTTGTTCAAAG	360
MORELOS	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGGCAGGAGCTACGCTTTTGTATCTTGTTCAAAG	360
AGUASCALIENTES	TCTGCTGGCTCCGTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGGCAGGGTGGAC	420
YUCATAN	TCTGCTGGCTCCGTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGGCAGGGTGGAC	420
MORELOS	TCTGCTGGCTCCGTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGGCAGGGTGGAC	420
AGUASCALIENTES	TCCCCCTGTTGGATATGGCCACGTTGGTGCCTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
YUCATAN	TCCCCCTGTTGGATATGGCCACGTTGGTGCCTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
MORELOS	TCCCCCTGTTGGATATGGCCACGTTGGTGCCTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
AGUASCALIENTES	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGCTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCT	540
YUCATAN	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGCTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCT	540
MORELOS	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGCTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCT	540
AGUASCALIENTES	AACAGTGGCGAGGTTACTGTGCGCCCAATGCAACTGGCAAGAATTATGTATACTCTGCA	600
YUCATAN	AACAGTGGCGAGGTTACTGTGCGCCCAATGCAACTGGCAAGAATTATGTATACTCTGCA	600
MORELOS	AACAGTGGCGAGGTTACTGTGCGCCCAATGCAACTGGCAAGAATTATGTATACTCTGCA	600
AGUASCALIENTES	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACCTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
YUCATAN	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACCTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
MORELOS	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACCTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
AGUASCALIENTES	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTTTCTGTGGGCAGACATGGC	720
YUCATAN	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTTTCTGTGTGGGCAGACATGGC	720
MORELOS	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTTTCTGTGTGGGCAGACATGGC	720
AGUASCALIENTES	AAAAAAGTGCCATGCAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
YUCATAN	AAAAAAGTGCCATGCAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
MORELOS	AAAAAAGTGCCATGCAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
AGUASCALIENTES	AAGCGGCTGTACCTTACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTGTGAAATACGGTCTTTAG	840
YUCATAN	AAGCGGCTGTACCTTACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTGTGAAATACGGTCTTTAG	840
MORELOS	AAGCGGCTGTACCTTACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTGTGAAATACGGTCTTTAG	840

Figura 7. Alineación de nucleótidos VirB9 de los aislados mexicanos; Aguascalientes, Yucatán y Morelos. Se observan en blanco las diferencias.

AGUASCALIENTES	ATGAATTTCTATAAAAACTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTACAGGA	60
YUCATAN	ATGAATTTCTATAAAAACTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTACAGGA	60
MORELOS	ATGAATTTCTATAAAAACTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTACAGGA	60
PR1	ATGAATTTCTATAAAAACTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTACAGGA	60
ST._MARIES	ATGAATTTCTATAAAAACTGCTTGCCTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTACAGGA	60
AGUASCALIENTES	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
YUCATAN	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
MORELOS	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
PR1	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
ST._MARIES	GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA	120
AGUASCALIENTES	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCCTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
YUCATAN	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCCTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
MORELOS	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCCTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
PR1	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCCTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
ST._MARIES	ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCCTTGTGTTTAAACCACGGGTATCACTCG	180
AGUASCALIENTES	TTTATAGAGTTCTCCAAGGTGAGACCATAAAAAGTATGGCTATGGGAGACAGCGTTTAC	240
YUCATAN	TTTATAGAGTTCTCCAAGGTGAGACCATAAAAAGTATGGCTATGGGAGACAGCGTTTAC	240
MORELOS	TTTATAGAGTTCTCCAAGGTGAGACCATAAAAAGTATGGCTATGGGAGACAGCGTTTAC	240
PR1	TTTATAGAGTTCTCCAAGGTGAGACCATAAAAAGTATGGCTATGGGAGACAGCGTTTAC	240
ST._MARIES	TTTATAGAGTTCTCCAAGGTGAGACCATAAAAAGTATGGCTATGGGAGACAGCGTTTAC	240
AGUASCALIENTES	TGGAAGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
YUCATAN	TGGAAGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
MORELOS	TGGAAGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
PR1	TGGAAGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
ST._MARIES	TGGAAGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG	300
AGUASCALIENTES	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTTCAAAG	360
YUCATAN	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTTCAAAG	360
MORELOS	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTTCAAAG	360
PR1	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTTCAAAG	360
ST._MARIES	ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTTCAAAG	360
AGUASCALIENTES	TCTGCTGGCTCTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGCAGGGTGGAC	420
YUCATAN	TCTGCTGGCTCTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGCAGGGTGGAC	420
MORELOS	TCTGCTGGCTCTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGCAGGGTGGAC	420
PR1	TCTGCTGGCTCTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGCAGGGTGGAC	420
ST._MARIES	TCTGCTGGCTCTGATGCCCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGCAGGGTGGAC	420
AGUASCALIENTES	TCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGCTGCGTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
YUCATAN	TCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGCTGCGTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
MORELOS	TCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGCTGCGTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
PR1	TCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGCTGCGTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
ST._MARIES	TCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGCTGCGTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG	480
AGUASCALIENTES	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC	540
YUCATAN	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC	540
MORELOS	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC	540
PR1	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC	540
ST._MARIES	TTTCGATCTAAAAGGGGCGGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC	540
AGUASCALIENTES	AACAGTGGCAGGTTACTGTGCGCCGAAATGCAACTGGCAAGAAATTATGTACTCTGCA	600
YUCATAN	AACAGTGGCAGGTTACTGTGCGCCGAAATGCAACTGGCAAGAAATTATGTACTCTGCA	600
MORELOS	AACAGTGGCAGGTTACTGTGCGCCGAAATGCAACTGGCAAGAAATTATGTACTCTGCA	600
PR1	AACAGTGGCAGGTTACTGTGCGCCGAAATGCAACTGGCAAGAAATTATGTACTCTGCA	600
ST._MARIES	AACAGTGGCAGGTTACTGTGCGCCGAAATGCAACTGGCAAGAAATTATGTACTCTGCA	600
AGUASCALIENTES	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
YUCATAN	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
MORELOS	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
PR1	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
ST._MARIES	AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT	660
AGUASCALIENTES	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTCCTGTGGGCAGACATGGC	720
YUCATAN	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTCCTGTGGGCAGACATGGC	720
MORELOS	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTCCTGTGGGCAGACATGGC	720
PR1	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTCCTGTGGGCAGACATGGC	720
ST._MARIES	TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTCCTGTGGGCAGACATGGC	720
AGUASCALIENTES	AAAAAAGTGCATGCGAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
YUCATAN	AAAAAAGTGCATGCGAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
MORELOS	AAAAAAGTGCATGCGAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
PR1	AAAAAAGTGCATGCGAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
ST._MARIES	AAAAAAGTGCATGCGAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC	780
AGUASCALIENTES	AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTAGTGAATACGGTGTCTTAA	840
YUCATAN	AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTAGTGAATACGGTGTCTTAA	840
MORELOS	AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTAGTGAATACGGTGTCTTAA	840
PR1	AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTAGTGAATACGGTGTCTTAA	840
ST._MARIES	AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGGCGTGAAGTAGTGAATACGGTGTCTTAA	840

Figura 8. Alineación de las secuencias de nucleótidos de VirB9 de los aislados mexicanos, PR1 de Brasil y St. Maries de EEUU.

Marcos abiertos de lectura

Las secuencias consenso de cada aislado fueron analizadas con el programa ORF Finder disponible en el NCBI para determinar los marcos abiertos de lectura. En la **Figura 9** se observa el resultado de este análisis donde los 840 pb codifican para una proteína de 279 aminoácidos.

```
1 atgaatttctataaaaacttgcttgctgctcggtctactgacc
M N F Y K N L L A C S A L L T
46 gttgttttacaggaggtgtggcacagtctgcogtaagcggtgtt
V V F T G G V A Q S A V S G G
91 gcacctgtgtctgtagacagtaggatcaaaccttgtatacagc
A P V S V D S R I K T F V Y S
136 ccgaacgagatattaccgttgtgtttaaccacgggtatcaactcg
P N E I F T V V F N H G Y H S
181 tttatagagttctcacaaggtgagaccataaaaagtgatggctatg
F I E F S K G E T I K V M A M
226 ggagacagcgttcaactggaaggtaaagcccgtagatacaaaactg
G D S V H W K V K P V D N K L
271 ttcattatgccactggagaggaaggaagcaagacaaatagctggta
F I M P L E R E G K T N M L V
316 gaaaccaacaagggcaggagctacgcttttgatcctgtttcaaag
E T N K G R S Y A F D L V S K
361 tctgtggccctgatgcccgggggtataaagaagtgccggatgag
S A G P D A A G Y K E V A D E
406 ctggcaggggtgactccccctgttgatagcctacgtgggtg
L G R V D S P L L D M A Y V V
451 cgtttttactaccggataataacagggagttcgtatctaaaaggg
R F Y Y P D N N R E F D L K G
496 gccggactggcggacttgtctgctccgagcttggcaagaacccc
A G L A D L S A P S L A K N P
541 aacagtggcaggttactgtgcccgaatgcaactggcaagaat
N S G E V T V R P N A T G K N
586 tatgtatactctgcaagcagcgtgtagcaacaatagtcctgtg
Y V Y S A S S A D A T I V P V
631 aaaacttttgatgatggggcctacatattttcagttctatgac
K T F D D G A L T Y F Q F Y D
676 aataacaaggtgatcccaaaagtgtttctgtggcagacatggc
N N K V I P K V F S V G R H G
721 aaaaagtgccatgcaggatgtgctacttaagggtatgtaata
K K V P C R M L L L K G Y V I
766 atcgaaggagtcacacaagcggctgtaccttgactacggcaagagt
I E G V H K R L Y L D Y G K S
811 gccgtcgaagtagtgaatacgggttag 840
G V E V V N T V L *
```

Figura 9. Marco abierto de lectura determinado por el programa ORF Finder disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Frecuencia de Aminoácidos en la secuencia VirB9

En la estructura primaria de la proteína VirB9 *A. marginale* fue identificada la frecuencia de cada uno de los aminoácidos, donde se observó que los aminoácidos más frecuentes son valina, glicina, lisina, leucina, serina y alanina,

constituyendo el 51.2% de la proteína, es decir mayormente por aminoácidos que no tienden a formar estructuras complejas (**Figura 10**).

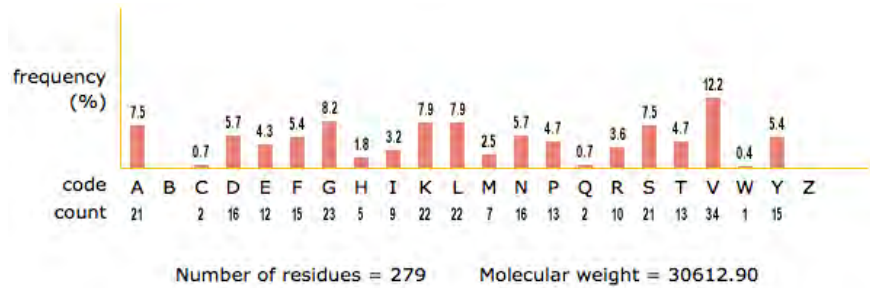


Figura 10. Frecuencia de aminoácidos en la secuencia de VirB9

Identificación de intrones.

Para determinar la existencia de intrones en la secuencia de nucleótidos de VirB9 se utilizó el programa GENSCAN, por ser un organismo procarionta, no se encontraron en la secuencia intrones (**Figura 11**).

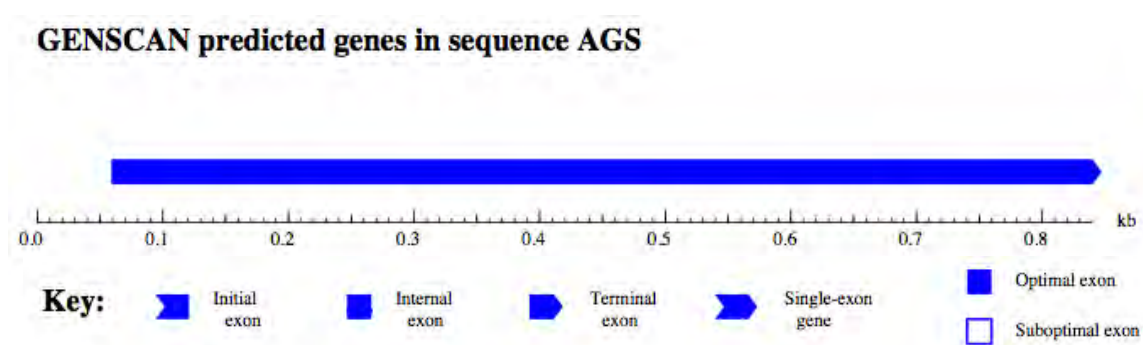


Figura 11. Identificación de intrones, resultado del programa GENSCAN.

Identificación de péptido señal.

En la secuencia de aminoácidos de VirB9 *A. marginale* fue identificado un péptido señal en la posición 1-24 por medio del programa SignalP (**Figura 12**).

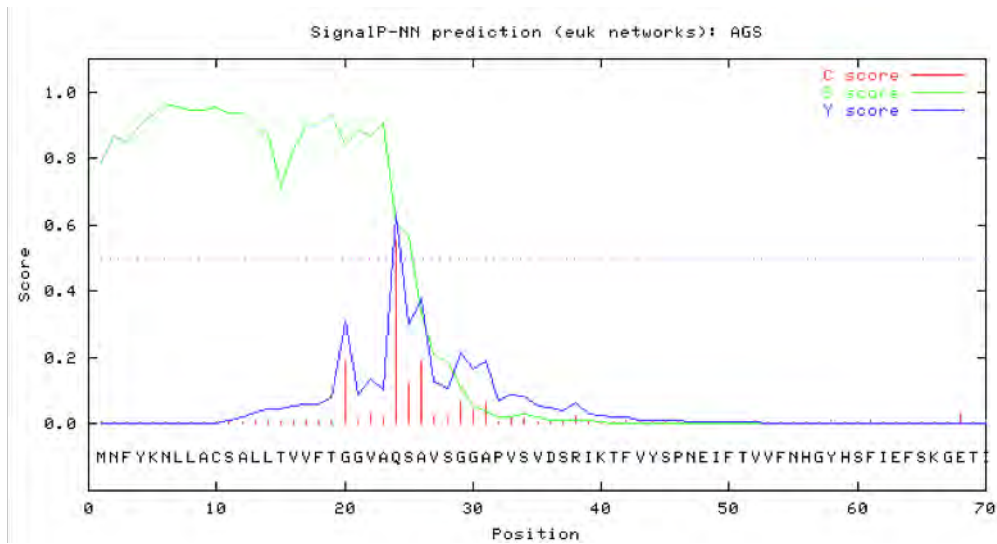


Figura 12. Identificación de un péptido señal por el programa SignalP, en la proteína VirB9 de *A. marginale*.

Alineación de Aminoácidos.

Con las secuencias o tenidas con el programa “ORF Finder” se realiz la alineación de aminoácidos de las secuencias mexicanas con los de las cepas PR1 de Brasil y Florida y St Maries de EEUU, se observo que la proteína es conservada en un 100% en los aislados mexicanos y sus contrapartes de Brasil y EEUU (Figura 13).

AGUASCALIENTES	<u>MNFYKNLLACSAALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVH</u>	80
YUCATAN	<u>MNFYKNLLACSAALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVH</u>	80
MORELOS	<u>MNFYKNLLACSAALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVH</u>	80
PR1	<u>MNFYKNLLACSAALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVH</u>	80
FLORIDA	<u>MNFYKNLLACSAALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVH</u>	80
ST MARIES	<u>MNFYKNLLACSAALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVH</u>	80
AGUASCALIENTES	<u>WKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAVYVRFYYPDNNRE</u>	160
YUCATAN	<u>WKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAVYVRFYYPDNNRE</u>	160
MORELOS	<u>WKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAVYVRFYYPDNNRE</u>	160
PR1	<u>WKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAVYVRFYYPDNNRE</u>	160
FLORIDA	<u>WKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAVYVRFYYPDNNRE</u>	160
ST MARIES	<u>WKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAVYVRFYYPDNNRE</u>	160
AGUASCALIENTES	<u>FDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIIPKVSVGRHG</u>	240
YUCATAN	<u>FDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIIPKVSVGRHG</u>	240
MORELOS	<u>FDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIIPKVSVGRHG</u>	240
PR1	<u>FDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIIPKVSVGRHG</u>	240
FLORIDA	<u>FDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIIPKVSVGRHG</u>	240
ST MARIES	<u>FDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIIPKVSVGRHG</u>	240
AGUASCALIENTES	<u>KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLYLDYGKSGVEVVNTVL</u>	279
YUCATAN	<u>KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLYLDYGKSGVEVVNTVL</u>	279
MORELOS	<u>KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLYLDYGKSGVEVVNTVL</u>	279
PR1	<u>KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLYLDYGKSGVEVVNTVL</u>	279
FLORIDA	<u>KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLYLDYGKSGVEVVNTVL</u>	279
ST MARIES	<u>KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLYLDYGKSGVEVVNTVL</u>	279

Figura 13. Alineación de la secuencias de aminoácidos de VirB9 aislados mexicanos PR1, Brasil y Florida, St Maries EEUU. De *A. marginale*

Predicción de estructura secundaria.

Por medio del programa PSIPRED <http://bioinfadmin.cs.ucl.ac.uk/psipred/> fue posible identificar la estructura secundaria de la proteína VirB9 *A. marginale*, dicha estructura tiene una secuencia helice alfa al inicio de la proteína que coincide con el péptido señal (no se muestra aquí). En la parte media de la proteína se observan tres posibles regiones de helice alfa pero la gran mayoría de la proteína está conformada por plegamientos beta y torsiones (vueltas) (Figura 14).

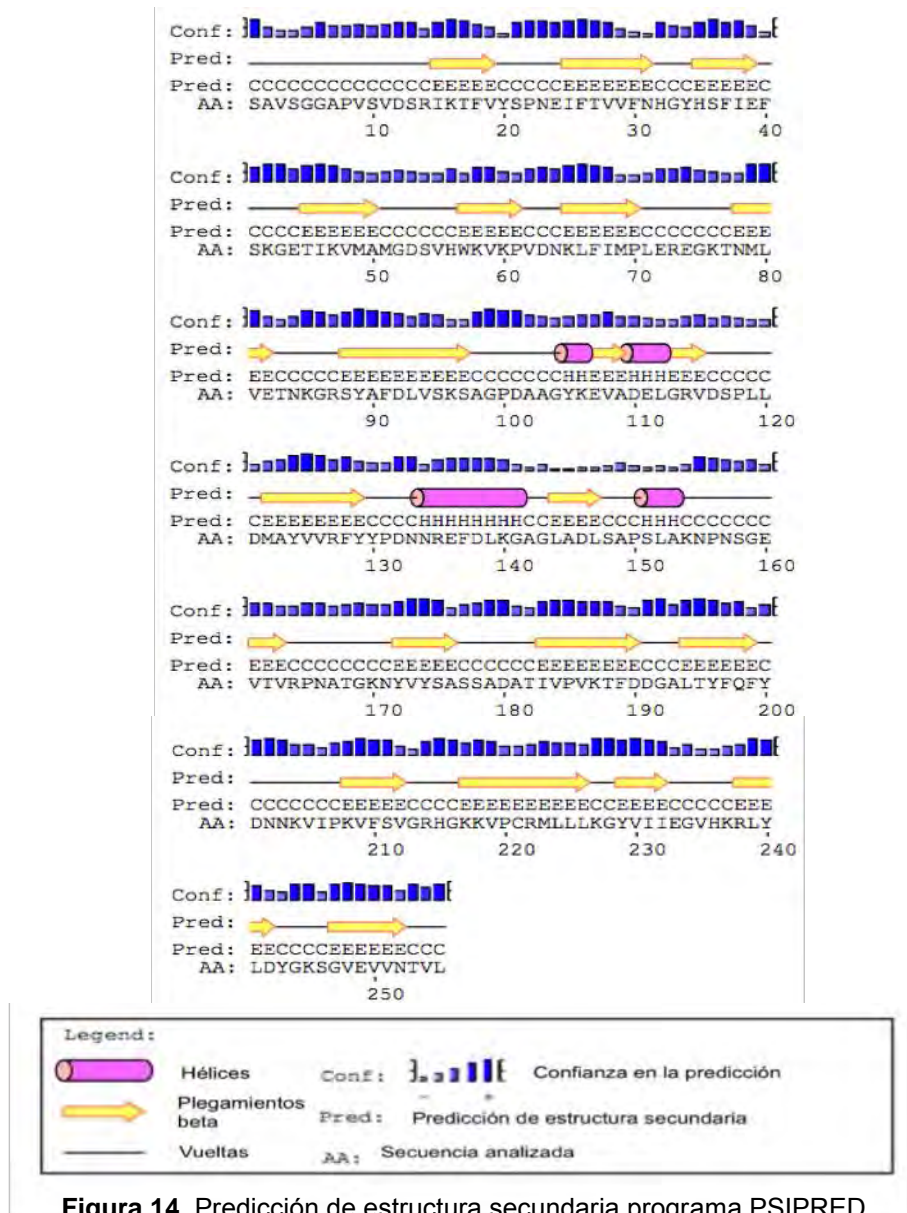


Figura 14. Predicción de estructura secundaria programa PSIPRED.

Predicción de hidrofobicidad, dominios transmembranales y hélices transmembranales

El análisis de la secuencia de aminoácidos con los programas “ProtScale” y TMpred mostraron una sola región hidrofóbica (mayor a 1.5, ProtScale) pero el número de aminoácidos es muy pequeño para representar una región transmembranal (**Figura 15A**, círculo). Los resultados obtenidos con el programa “TMpred” no muestran dominios transmembranales ya que en ningún momento se rebasan valores significativos (mayores a 500) en este programa y los valores observados son menores a cero (**Figura 15B**).

La predicción de hélices transmembranales muestran que la proteína VirB9 no contiene ningún helice transmembranal por medio del programa TMHMM con una alta probabilidad (**Figura 16**).

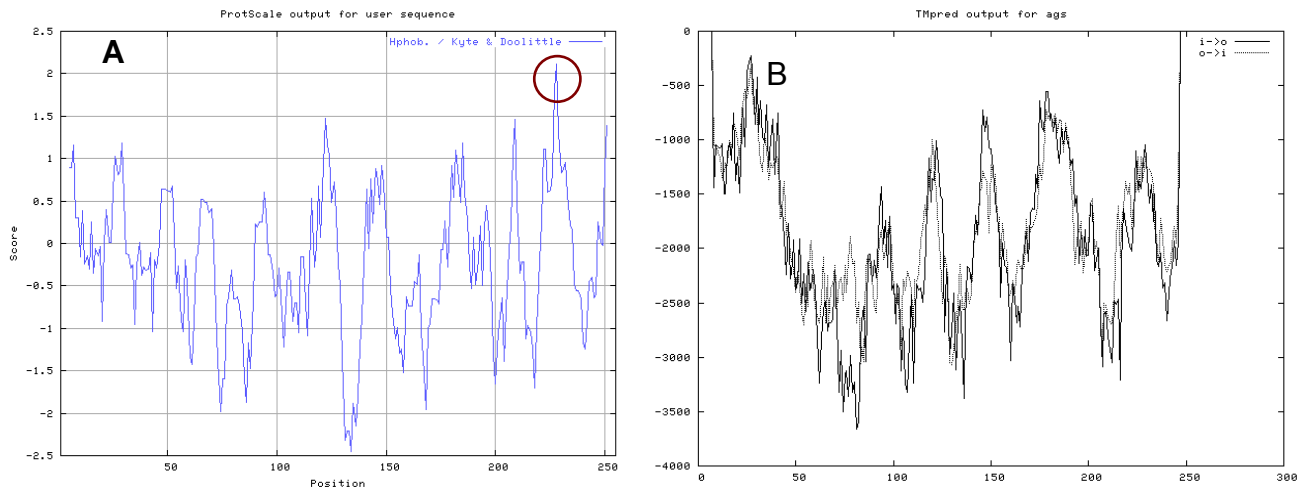


Figura 15. Análisis de la secuencia de aminoácidos de VirB9 por los programas, **A** ProtScale y **B**.TMpred, no reportan secuencias hidrófobas que puedan indicar dominios transmembranales.

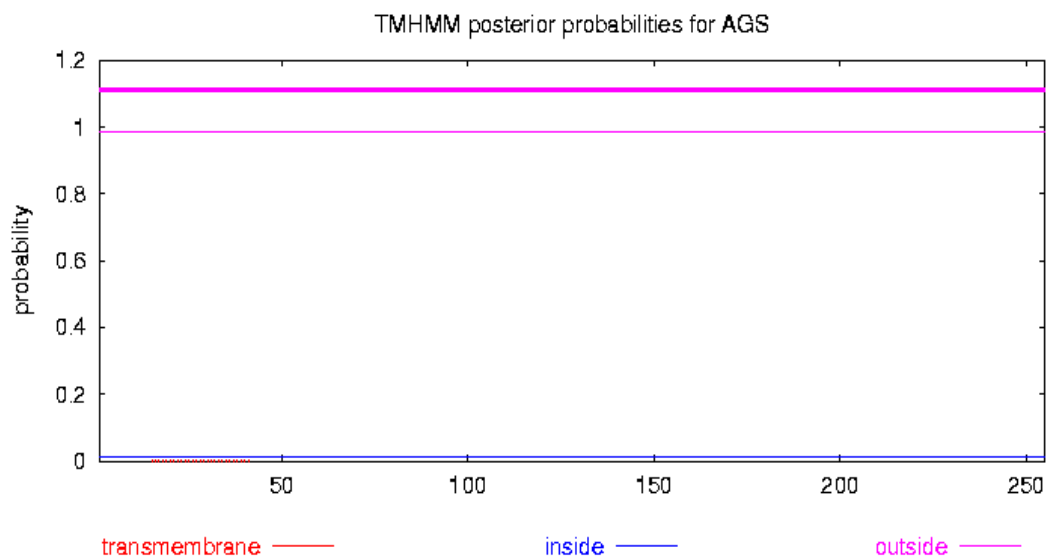


Figura 16. Predicción de hélices transmembranales por el programa TMHMM.

Predicción de epitopos tipo B

Para realizar los análisis biológicos de la proteína VirB9, la secuencia de aminoácidos se sometió a análisis por los programas ANTIGENIC, ABCPred y BCEPred (**Figura 17**) para identificar epitopos tipo B y regiones antigénicas. El resultado reportado por los programas, se seleccionaron dos secuencias para su síntesis de forma comercial los cuales fueron inoculados en los conejos. Los péptidos seleccionados tienen una longitud de 10 aminoácidos que coinciden parcialmente en los programa para la identificación de epitpos B y regiones antigénicas. En el cuadro 3 se muestran los dos epitopos seleccionados por programa ABCPred con un puntaje de 0.78 donde 1.0 es el mejor puntaje asignado a los epitopos de acuerdo a ese programa.

Cuadro 3. Epitopos seleccionados

Programa	Aminoácidos	Longitud	Posición	Puntaje
ABCPred	LSAPSLAKNP	10	147-156	0.78
ABCPred	AAGYKEVADE	10	102-112	0.78

ANTIGENIC

```
(10) Score 1.102 length 10 at residues 144->153
      *
Sequence: LADLSAPSLA
      144         153

(11) Score 1.098 length 11 at residues 55->65
      *
Sequence: VHWKVKPVDNK
      55         65

(12) Score 1.097 length 6 at residues 194->199
      *
Sequence: LTYFQF
      194         199

(13) Score 1.091 length 8 at residues 16->23
      *
Sequence: KTFVYSPN
      16         23

(14) Score 1.047 length 8 at residues 105->112
      *
Sequence: YKEVADEL
      105         112
```

ABCpred

Rank	Sequence	Start position	Score
1	LSAPSLAKNP	147	0.78
1	AAGYKEVADE	102	0.78
2	LVSKSAGPDA	93	0.77
2	YHSFIEFSKG	34	0.77
3	LVETNKGRSY	80	0.74
3	PDNNREFDLK	131	0.74
4	AMGDSVHWKV	50	0.70
5	AVSGGAPVSV	2	0.69
6	MAYVVRFYYP	122	0.68
7	VDNKLFIPL	62	0.67
7	REFDLKGAGL	135	0.67
8	GETIKVMAMG	43	0.66
9	KTNMLVETNK	76	0.65

BCEpred

```

GYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVHWKVKPVDNKLFIMPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDI
GYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVHWKVKPVDNKLFIMPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDI

MAYVVRFYYPDNNREFDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIPKVFVSVGRHGKQVPE
MAYVVRFYYPDNNREFDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVVSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVIPKVFVSVGRHGKQVPE

```

Figura 17. Predicción de epítomos por medio de tres programas ANTIGENIC, ABCpred BCEpred.

Para asegurar que los epítomos seleccionados fueran exclusivos de *A. marginale*, los epítomos fueron sometidos a un análisis BLAST para confirmar su especificidad, observándose identidad a las proteínas VirB9 de *A. marginale* y *A. centrale* para el epítomo 1.- LSAPSLAKNP y para el epítomo 2.- AAGYKEVADE sólo se observó una identidad del 100% con *A. marginale* respecto a las secuencias ya reportadas en el banco de genes (**Figura 18**)

Se identifico la ubicación de los epitopos seleccionados para la síntesis comercial en el gráfico de predicción de hidrofobicidad, los epitopos seleccionados se muestran con las flechas en verde, encontrándose en regiones con mayor posibilidad de ser hidrofílicas (**Figura 19**).

```

>[ref|YP_003328109.1] type IV secretion system protein VirB9 [Anaplasma centrale str.
Israel]
gb|ACZ48795.1| type IV secretion system protein VirB9 [Anaplasma centrale str.
Israel]
Length=279

Score = 32.5 bits (69), Expect = 6.1
Identities = 10/10 (100%), Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 1 LSAPSLAKNP 10
      LSAPSLAKNP
Sbjct 171 LSAPSLAKNP 180

>[ref|YP_154362.1] [G] VirB9 protein [Anaplasma marginale str. St. Maries]
ref|YP_002564069.1| [G] VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Florida]
ref|ZP_05277643.1| VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Mississippi]
ref|ZP_05278608.1| VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Puerto Rico]
ref|ZP_05279570.1| VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Virginia]
gb|AAV87107.1| [G] VirB9 protein [Anaplasma marginale str. St. Maries]
gb|ACA60747.1| VirB9 [Anaplasma marginale]
gb|ACM49813.1| [G] VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Florida]
Length=279

GENE ID: 3171330 virB9 | VirB9 protein [Anaplasma marginale str. St. Maries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 32.5 bits (69), Expect = 6.1
Identities = 10/10 (100%), Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 1 LSAPSLAKNP 10
      LSAPSLAKNP
Sbjct 171 LSAPSLAKNP 180

>[ref|YP_154362.1] [G] VirB9 protein [Anaplasma marginale str. St. Maries]
ref|YP_002564069.1| [G] VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Florida]
ref|ZP_05277643.1| VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Mississippi]
ref|ZP_05278608.1| VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Puerto Rico]
ref|ZP_05279570.1| VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Virginia]
gb|AAV87107.1| [G] VirB9 protein [Anaplasma marginale str. St. Maries]
gb|ACA60747.1| VirB9 [Anaplasma marginale]
gb|ACM49813.1| [G] VirB9 protein (virB9) [Anaplasma marginale str. Florida]
Length=279

GENE ID: 3171330 virB9 | VirB9 protein [Anaplasma marginale str. St. Maries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 33.7 bits (72), Expect = 2.5
Identities = 10/10 (100%), Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 1 AAGYKEVADE 10
      AAGYKEVADE
Sbjct 126 AAGYKEVADE 135

```

Figura 18. Análisis BLAST de los epitopos tipo B. exsite 100% de identidad con lo reportado en los genomas de *A. marginale* y *A. centrale*.

Dominio de la proteína VirB9

Por medio del programa Pfam se identificó el único dominio de la proteína VirB9 el cual es un dominio CagX que va del aminoácido 36 al 278. Este dominio está asociado a proteínas con una función de transferencia conyugal. También se observó la secuencia en aminoácidos, la predicción de hidrofobicidad, la ubicación de los epítomos seleccionados (flechas verticales, **Figura 19**) ubicados en la parte funcional de la proteína y la posición del dominio CagX de VirB9. El dominio CagX también se encuentra en VirB9 de organismos como *A. centrale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ruminantium* (**Cuadro 4**).

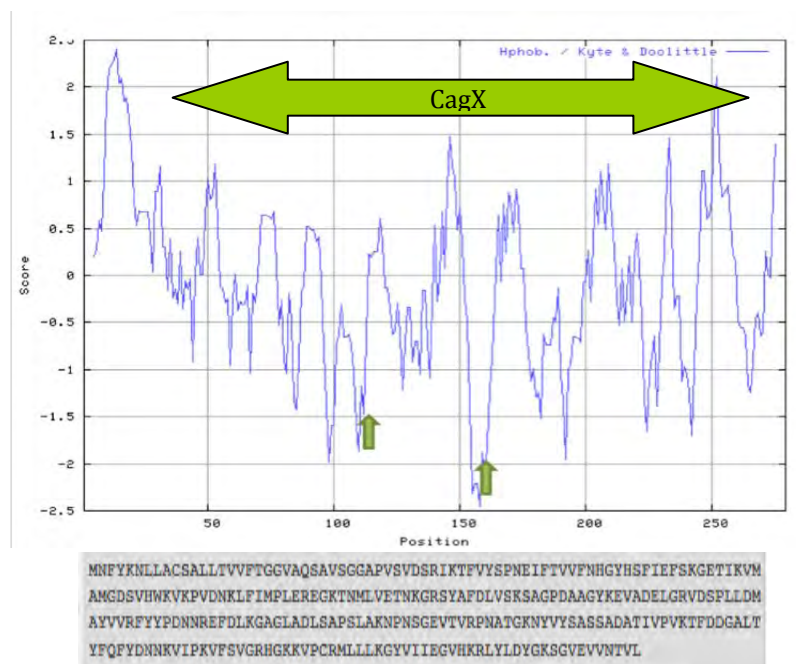


Figura 19. Identificación de dominio en predicción de hidrofobicidad y la ubicación de epítomos representados por las flechas verdes y posición del dominio CagX.

Cuadro 4. Microorganismos relacionados que también poseen un dominio CagX. Análisis por Pfam.

Microorganismo	No. aa	dominio	inicio	final	N. acceso
<i>A. marginale</i>	279	CagX	36	278	-----
<i>A. centrale</i>	279	CagX	36	278	ACZ48795
<i>A. phagocytophilum</i>	281	CagX	30	257	AAM00421
<i>E. chaffeensis</i>	273	CagX	36	272	YP_506875
<i>E. canis</i>	275	CagX	39	262	AAQ12004
<i>E. ruminantium</i>	267	CagX	37	274	YP_179895

Comparación VirB9 de *A. marginale* con otras VirB9 reportadas.

Para efectos comparativos la secuencia de aminoácidos de VirB9 de *A. marginale*, se alineó a otras proteínas VirB9 reportadas en *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ruminantium* y con *Agrobacterium tumefaciens* aislados A4, se observó un alto grado de homología superior al 50% con los microorganismos relacionados (**cuadro 5**).

Cuadro 5. Similitud de VirB9 de *A. marginale* y otros microorganismos.

Microorganismo	No. aa	Similitud <i>A. marginale</i>	N. acceso
<i>A. marginale</i>	279	-----	-----
<i>A. centrale</i>	279	92%	ACZ48795
<i>A. phagocytophilum</i>	281	56%	AAM00421
<i>E. chaffeensis</i>	273	51%	YP_506875
<i>E. canis</i>	275	53%	AAQ12004
<i>E. ruminantium</i>	267	51%	YP_179895
<i>A. tumefaciens</i>	293	23%	AAF77169

Árbol filogenético de la proteína VirB9

Después de observar una gran homología en las secuencias de aminoácidos se obtuvo un árbol filogenético de la proteína VirB9 de secuencias de *Anaplasma* y *Ehrlichia* reportadas, para observar la relación evolutiva de esta proteína, se observó claramente que por un lado del árbol se encuentran los Anaplasmas y por otra rama se encuentran las Ehrlichias. También se observó como el *Anaplasma marginale* y *A. centrale* están en una rama y cercana se encuentra *A. phagocytophilum*, en otra rama se encuentran *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ruminantium* y distante en otra rama se encuentra como control *Agrobacterium tumefaciens*.

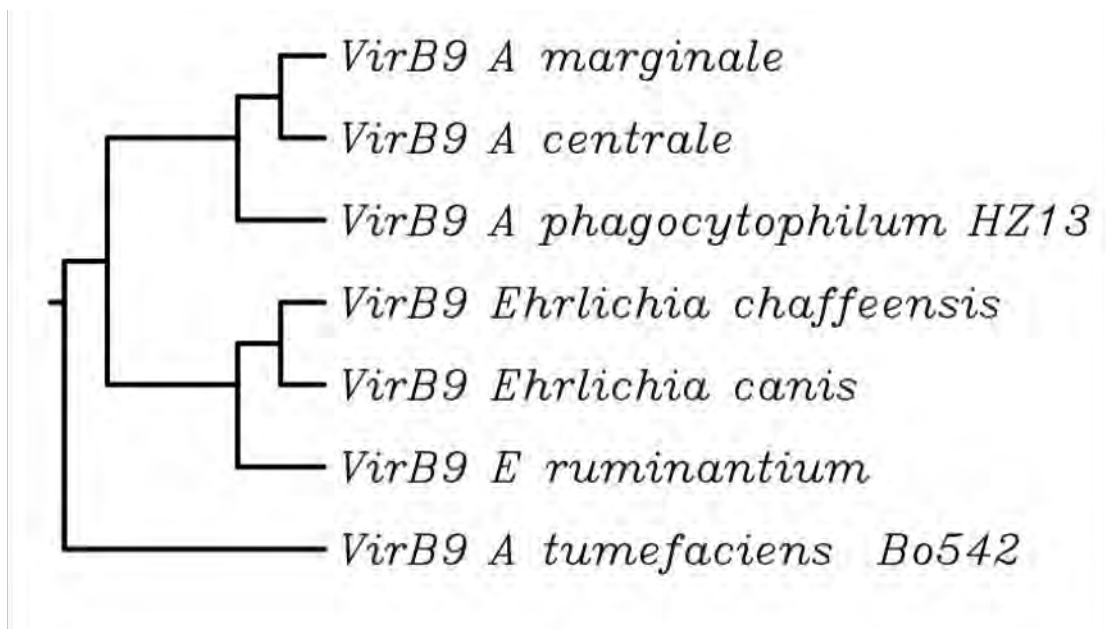


Figura 20. Árbol filogenético mediante el algoritmo Neighbor Joining de VirB9 *A. marginale* aislado mexicano y microorganismos relacionados reportadas en el GenBank. *Anaplasma centrale* ACZ48795, *Anaplasma phagocytophilum* HZ13 AAM00421, *Ehrlichia canis* AAQ12004 *Ehrlichia chaffeensis* YP_506875 *Ehrlichia ruminantium* str Welgevonden YP_179895, control VirB9 de *Agrobacterium tumefaciens* AAF77169.

7.3 Expresión de la proteína rVirB9

Se logró la expresión de la proteína rVirB9 con el vector pET SUMO (Invitrogen) transformando células de *E. coli* BL21. Se realizó la cinética de la expresión de la proteína para identificar el momento de mayor expresión, el mejor tiempo de expresión fue después de una incubación de 12 horas del cultivo a 37°C inducido con 1mM de IPTG. En la **Figura 21** se muestra un gel de acrilamida al 12 % teñido con Azul de Coomassie (SimplyBlue SafeStain Invitrogen) donde se observa un incremento en la expresión de VirB9 a través del tiempo (banda de aproximadamente 41 kDa) a diferencia de los cultivos no inducidos. En la **Figura 22**, se observa el Western-Blot donde se muestra la identificación de la proteína recombinante con la etiqueta de histidina mediante el anticuerpo específico.

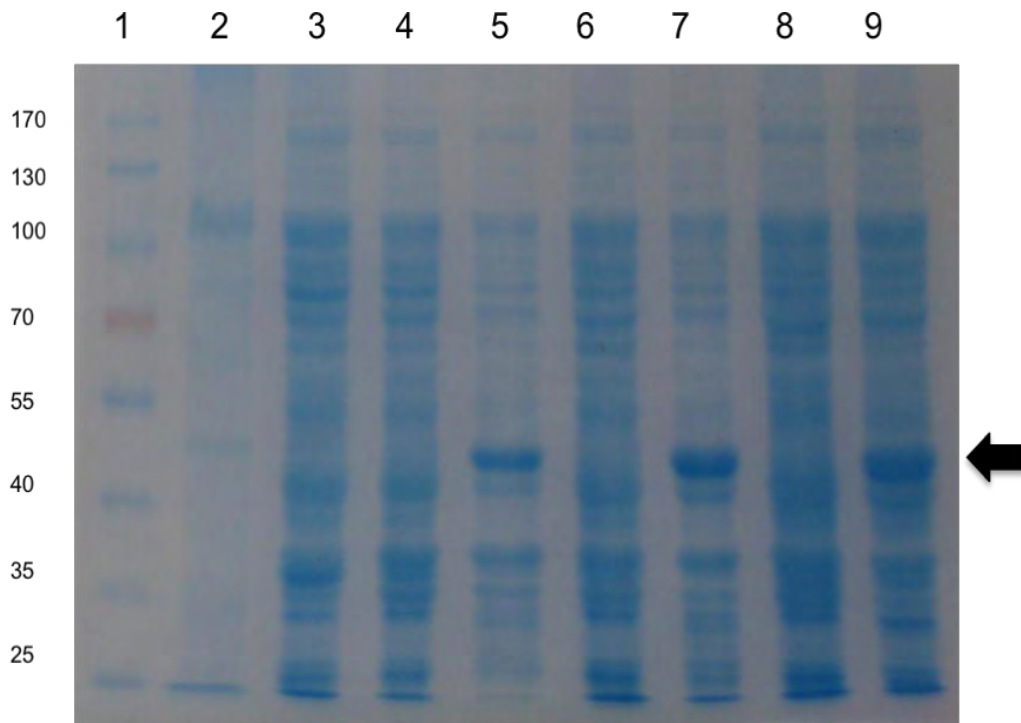


Figura 21. Cinética de expresión de VirB9 en células BL21. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Control positivo de expresión Hcat52 de *H. contortus*; 3. BL21 transformadas con vector sin VirB9; 4 a 9, células BL21 transformadas con vector/VirB9; 4, 6 y 8 cultivos sin inducción a tiempos cero, 5 y 12 horas; carriles 5, 7 y 9 células inducidas con IPTG a los mismos tiempos. Gel teñido con Azul de Coomassie (Simply blue safe stain Invitrogen). Se usó el equivalente de 1 ml de cultivo estandarizado a 0.4 DO, a 600 nm.

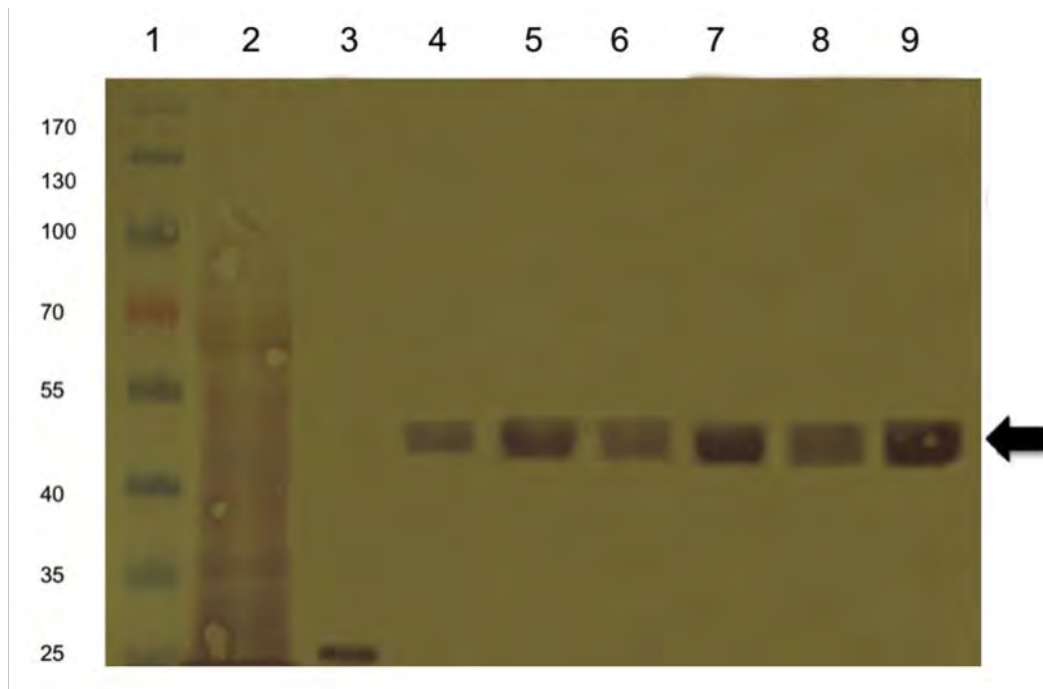


Figura 22. Western blot de la cinética de expresión de VirB9. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Control positivo de expresión Hcat52 de *H. contortus*; 3. BL21 transformadas con vector sin VirB9; 4 a 9, células BL21 transformadas con vector/VirB9; 4, 6 y 8 cultivos sin inducción a tiempos cero, 5 y 12 horas; carriles 5, 7 y 9 células inducidas con IPTG a los mismos tiempos.. El gel se probó con anticuerpo Anti-tag (histidinas) Sta Cruz y se reveló BCIP/NBT (Sigma).

Para confirmar que el sistema de expresión estaba funcionando adecuadamente, células BL21 se transformaron con el vector pET SUMO sin el inserto de VirB9, como se observa en la **Figura 23**, las células transformadas expresaron solamente la etiqueta de histidina/SUMO que tiene un peso molecular de 11 kDa. En la **Figura 24**, la etiqueta es reconocida por el anticuerpo específico y fue determinado el tiempo de mejor expresión por la cinética de expresión.

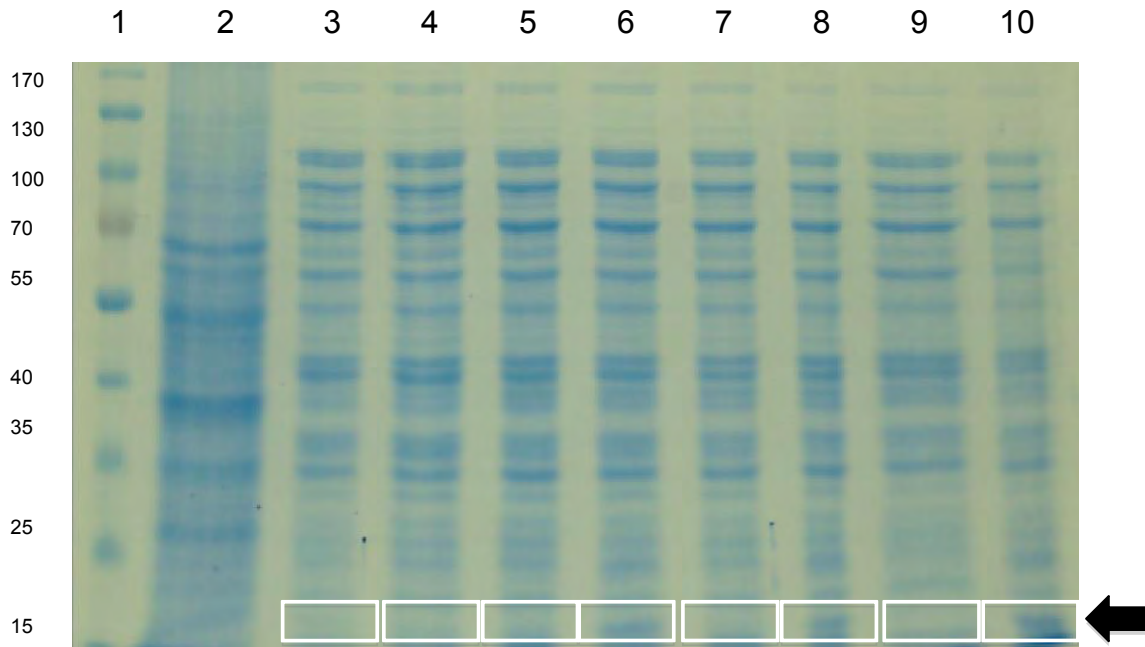


Figura 23. Cinética de expresión de las células BL21 transformadas con el vector pET SUMO, pero sin el inserto de VirB9. 1. Marcador; 2. Control Positivo proteína con histidinas; carriles 3, 5, 7 y 9 cultivos no inducidos a tiempos 0, 2, 5 y 12 hrs. Carriles 4, 6, 8 y 10, cultivos inducidos a los mismo tiempos. Gel teñido con Azul de Coomassie (Simply blue safe stain Invitrogen).

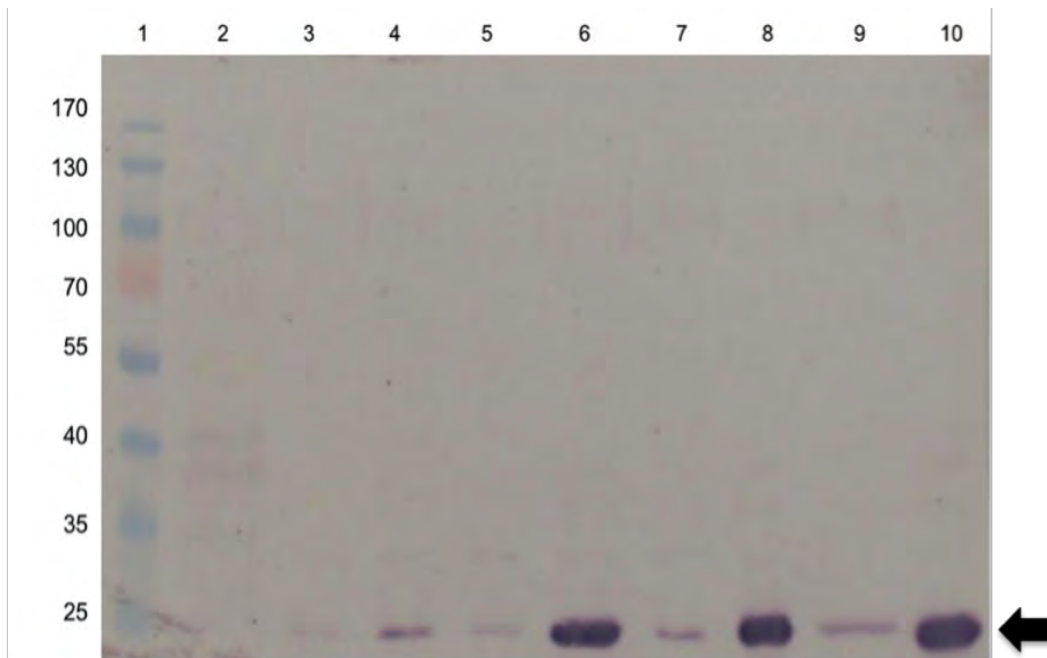


Figura 24. Western Blot de la cinética de expresión de células BL 21 con el vector pET SUMO sin el inserto de VirB9. 1. Marcador; 2. Control Positivo proteína con histidinas; carriles 3, 5, 7 y 9 cultivos no inducidos a tiempos 0, 2, 5 y 12 hrs. Carriles 4, 6, 8 y 10, cultivos inducidos a los mismo tiempos. El gel se probó con anticuerpo Anti-tag (histidinas) Sta Cruz y se reveló BCIP/NBT

7.4 Purificación de la proteína rVirB9

Una vez que se determinó el mejor tiempo de expresión de la proteína rVirB9, se determinó si esta proteína se encontraba de forma soluble en el citoplasma de *E. coli*. Cultivos inducidos de la cepa BL21 expresando la proteína rVirB9 e inducidos con IPTG fueron sometidos a una lisis con 50 mM fosfato de potasio, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glicerol, 0.5% Triton X-100 y 10 mM imidazol, se obtuvo un sobrenadante y pastilla, los cuales se separaron por electroforesis de acrilamida al 12% de concentración. En la **Figura 25A** se observa que la proteína se encuentra en pastilla (carril 3) y esta es reconocida por el anticuerpo específico **Figura 25B**, por lo que se deduce que la proteína de interés está en forma no soluble y que posiblemente se encuentra como cuerpos de inclusión dentro de las células. La proteína rVirB9 fue extraída de las células por métodos desnaturalizantes con cloruro de guanidina y urea, el lisado se purificó mediante

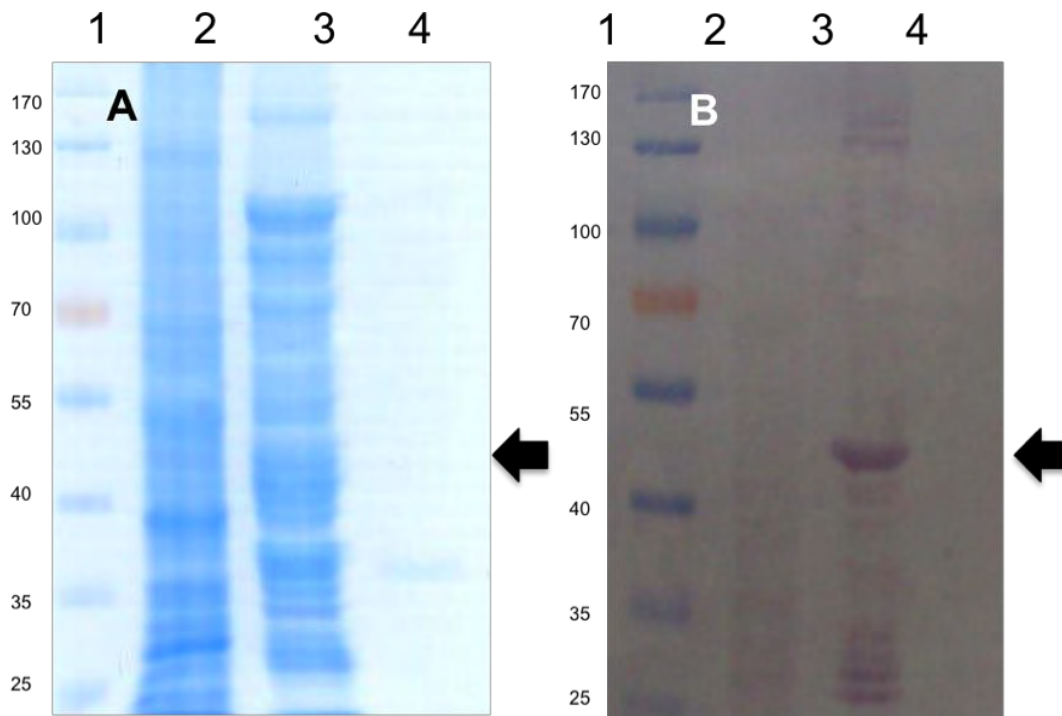


Figura 25. Solubilidad de la proteína rVirB9. A) Gel acrilamida 1. Marcador; 2. Control Positivo proteína con etiqueta de histidinas Hcat52; 3. Pastilla; 4. Sobrenadante. Gel teñido con Coomassie (Simply blue safe stain Invitrogen). B) Western Blot misma disposición.

cromatografía por columnas de afinidad de níquel, en la **Figura 26** se observa la electroforesis y **Figura 27** se observa la proteína recombinante identificada por el anticuerpo anti-histidinas, la máxima cantidad de proteína obtenida de 500 ml de cultivo fue de 0.22 mg/ml

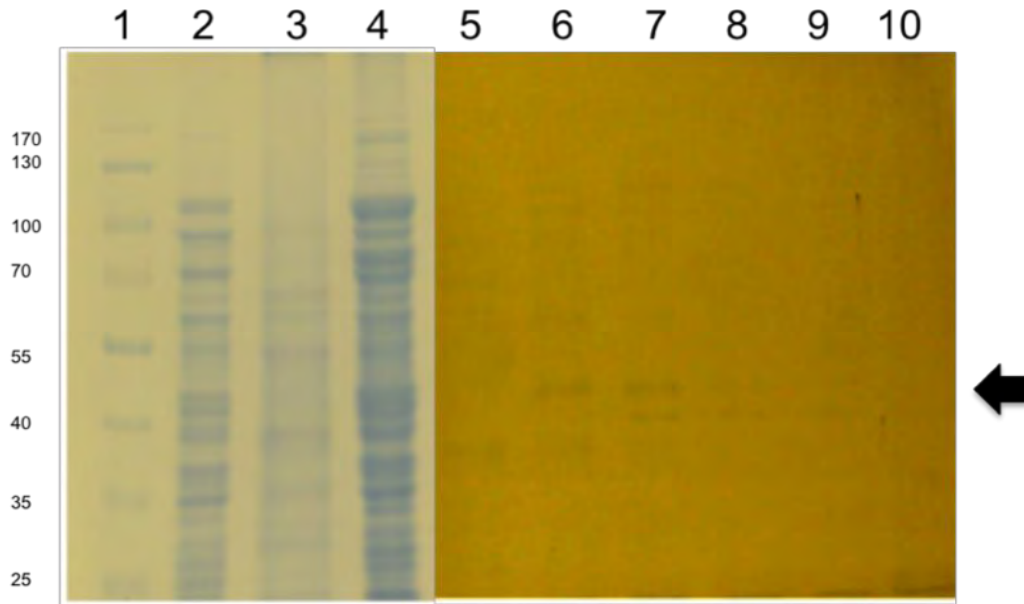


Figura 26. Electroforesis Purificación de la proteína rVirB9. 1, Marcador; 2, células transformadas con el vector sin inserto VirB9; 3. Control Positivo proteína con cola de histidinas; 4, Cultivo expresando VirB9; 5. Lavado solución B; 6. Lavado solución C; 7. Elusión solución D; 8. Elusión solución D; 9. Elusión solución E; 10. Elusión solución E.

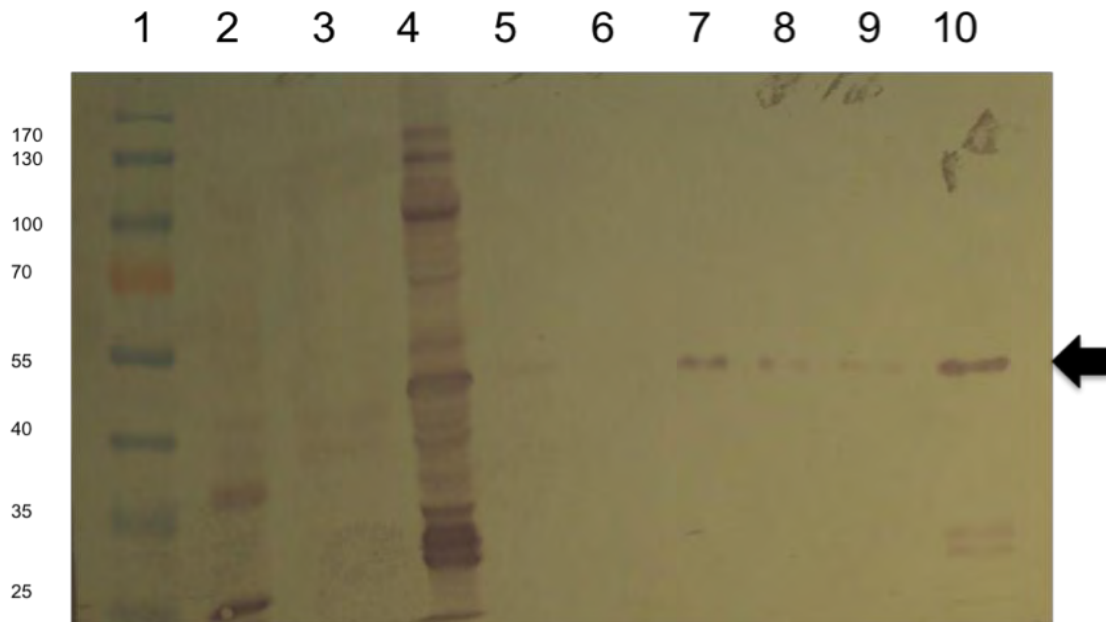


Figura 27. Western-Blot, Puificación de la proteína rVirB9 1. Marcador; 2. Cultivo vector sin inserto VirB9; 3. Control positivo proteína con cola de histidinas; 4. Cultivo expresando VirB9 sometido a la purificación; 5. Lavado solución B; 6. Lavado solución C; 7. Elusión solución D; 8. Elusión solución D; 9. Elusión solución E; 10. Elusión solución E.

7.5 Producción de anticuerpos anti-VirB9

Utilizando los anticuerpos anti-péptidos y anti-rVirB9 producidos en conejos, se realizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en laminillas de glóbulos rojos de bovinos infectados con *A. marginale*. En el control positivo suero anti rMSP5 se observan las rickettsias fluoresciendo **Figura 30 A**, al igual en el suero post-inmunización con la proteína rVirB9 **Figura 30 C**, a diferencia de los sueros pre-inmunes de rMSP5 y rVirB9 donde no se observan las rickettsias fluoresciendo, para los sueros post-inmunización de los péptidos uno y dos se observan como los sueros pre-inmunes es decir no reconocen el *A. marginale* a pesar de que los conejos fueron inoculados en 12 ocasiones.

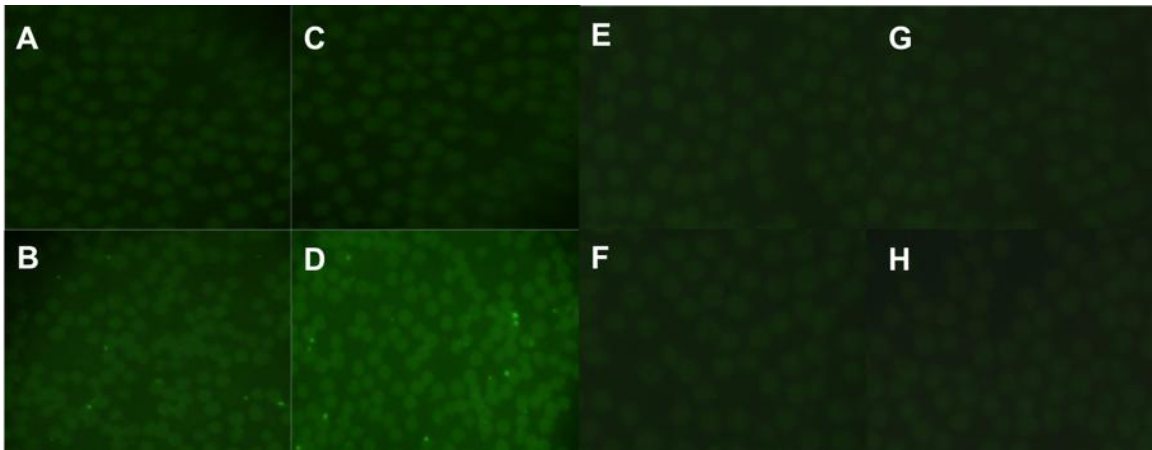


Figura 28. Inmunofluorescencia indirecta; A) Suero pre inmunización rMSP5; B) Suero post-inmunización rMSP5; C) Suero pre-inmunización rVirB9; D) Suero post-inmunización rVirB9; E) Suero pre-inmunización Péptido 1; F) Suero post-inmunización Péptido 1; G) Suero pre-inmunización Péptido 2; H) Suero post-inmunización Péptido 2.

7.6 Reconocimiento de rVirB9

La proteína rVirB9 fue reconocida por anticuerpos de un bovino inmune a *A. marginale* **Figura 28** observando el reconocimiento de la proteína con un peso molecular de 41 kDa y otra en 28 kDa aproximadamente en el carril de la

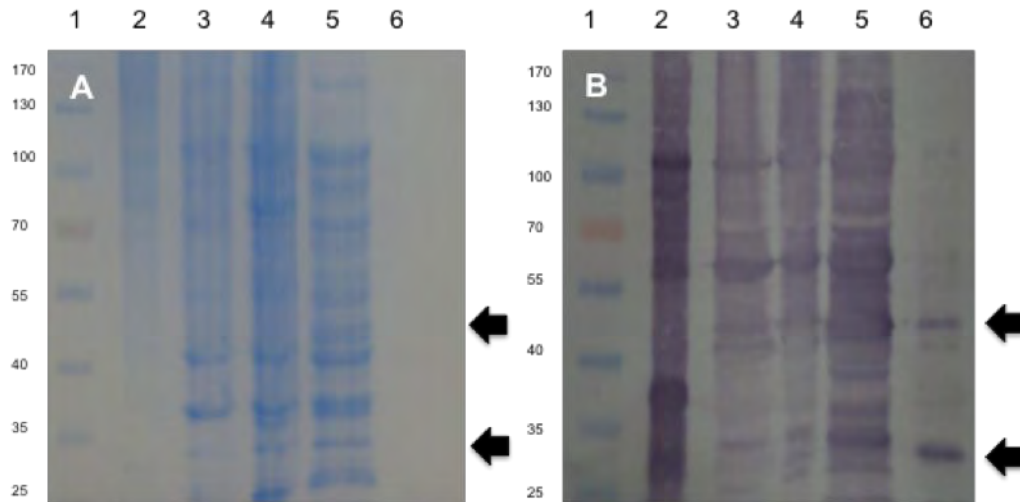


Figura 29. Identificación de rVirB9 por anticuerpos de bovinos inmunes A) gel de acrilamida 1. Marcador, 2. Cuerpos iniciales, 3. *E. coli* BL21 sin vector, 4. *E. coli* BL21 con vector sin inserto; 5. *E. coli* con vector – VirB9; 6. rVirB9 purificada. B) Western Blot misma disposición. Flecha superior, rVirB9 con histidinas; flecha inferior, rVirB9 sin histidinas.

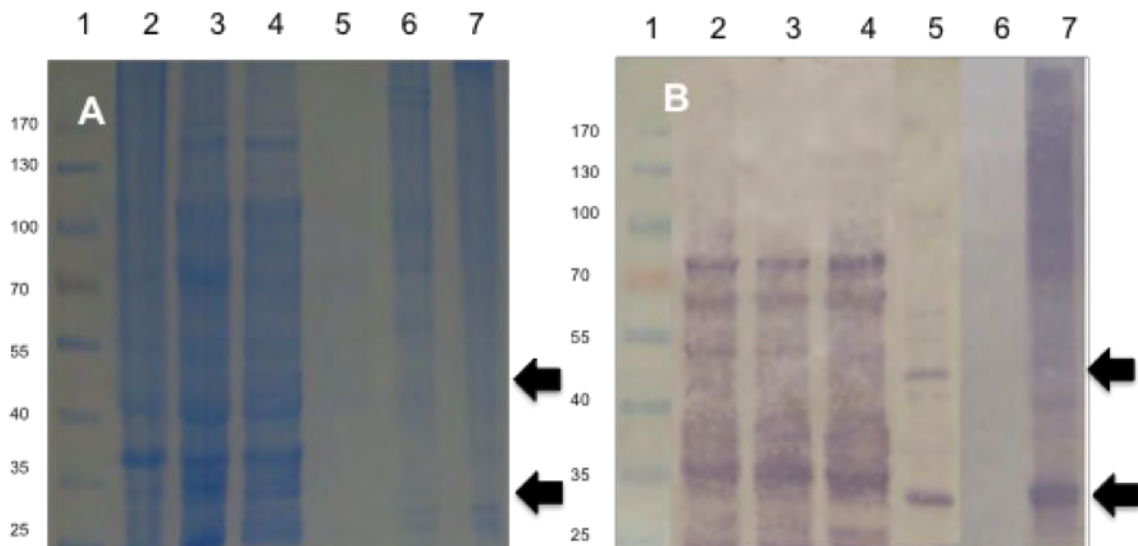


Figura 30. Identificación de rVirB9 por anticuerpos de conejos A) gel de acrilamida 1. Marcador, 2. *E. coli* BL21 sin vector, 3. *E. coli* BL21 con vector sin inserto; 4. *E. coli* con vector – VirB9; 5. rVirB9 purificada. 6. Membranas de glóbulos rojos. 7. Cuerpos iniciales B) Western Blot misma disposición. Flecha superior, rVirB9 con histidinas; flecha inferior, rVirB9 sin histidinas.

proteína purificada, la observación de dos pesos moleculares distintos obedece a la eliminación parcialmente la proteína fusión del vector que contenía las histidinas.

Los anticuerpos producidos en los conejos anti-rVirB9 reconocieron la proteína rVirB9 en el cultivo de *E. coli* BL21 con el vector más el inserto y la proteína purificada **Figura 29** al igual que una proteína de 28 kDa aproximadamente (carril 7) coincidiendo con el peso de la proteína VirB9.

7.7 Localización celular de la proteína VirB9

Para la identificación celular de la proteína VirB9 en *A. marginale* se realizó la técnica de IFI en cuerpos iniciales vivos teñidos con tinción vital, la cual penetra a las células por difusión pasiva, y por medio de las esterasas citoplasmáticas catalizan la hidrólisis convirtiendo el compuesto en fluoresceína libre (diacetato de succinimidil ester carboxi-fluoresceína CFDA se Molecular Probes, Invitrogen), asegurando que las membranas de los CI se mantengan intactas se utilizaron los anticuerpos anti-VirB9 producidos en los conejos y un segundo anticuerpo marcado con Dylight 594 (Jackson) observándose las células viables que presentan fluorescencia para la IFI es decir los anticuerpos reconocieron la proteína en la superficie del *Anaplasma marginale* vivo el cual presentaba las membranas intactas, comprobando la localización celular de VirB9.

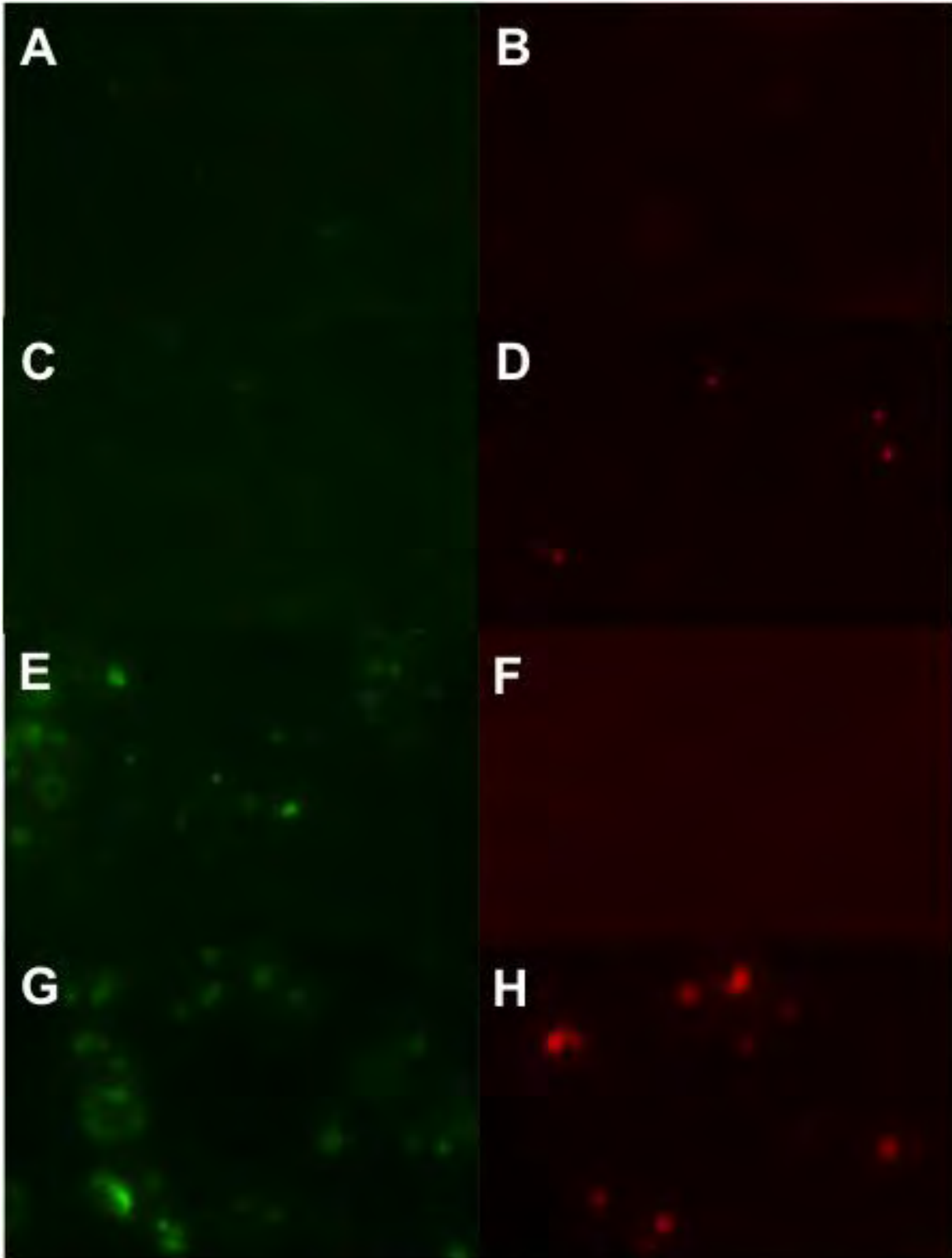


Figura 31. Localización celular de la proteína. A) Tinción vital células muertas suero preinmunización B) IFI células muertas suero preinmunización C) Tinción vital células muertas suero anti-VirB9 D) IFI células muertas suero anti-VirB9 E) Tinción vital células vivas suero preinmunización F) IFI células vivas suero preinmunización G) Tinción vital células vivas suero anti-VirB9 H) IFI células vivas suero anti-VirB9.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La ubicación de la proteína VirB9 en aislados mexicanos de *A. marginale* se logro mediante análisis *in silico* y ensayos biológicos, siendo el primer ensayo donde se reporta la ubicación de esta proteína del sistema homólogo de secreción tipo IV en la superficie externa de *A. marginale*. El cual infecta los glóbulos rojos de bovinos causando una alta morbilidad y mortalidad, estudios recientes en la búsqueda de antígenos inmunorelevantes se centran en proteínas de bajo o nulo polimorfismo, que sean codificadas por un solo gen y que tengan un papel en la virulencia y/o la supervivencia de los patógenos dentro de sus hospederos. Las proteínas del sistema de secreción tipo IV (SSTIV) son un sistema de translocación de ADN y proteínas entre bacterias y entre bacterias y hospederos en el caso de bacterias intracelulares, de manera que se relacionan con la invasión, permanencia y virulencia en bacterias Gram negativas (Bao *et al.*, 2009). Proteínas del SSTIV se han descrito en microorganismos relacionados como *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. centrale* entre otros (Rikihisa *et al.*, 2009; Felek *et al.*, 2003).

La proteína VirB9 del SSTIV es reconocida en la técnica de ELISA por IgG2 de animales vacunados con fracciones de membranas (López *et al.*, 2007) o naturalmente infectados con *A. marginale* (Araújo *et al.*, 2008) por lo que se ha propuesto como candidato vacunal. VirB9 llena muchos de los criterios arriba mencionados, pero a la fecha se desconoce su ubicación en la rickettsia.

Aún cuando ya se habían publicado las secuencias de VirB9 para aislados de Estados Unidos y Brasil, antes de este trabajo, no existía información en los aislados mexicanos. En el presente trabajo primero, se verificó la presencia de VirB9 en 6 aislados mexicanos; a partir de ADN genómico de seis aislados, se amplificó un segmento de aproximadamente 850 pb (**Figura 6**), consistente con lo publicado para este gen en el genoma de la cepa St. Maries (Brayton *et al.*, 2005). Segundo, se corroboró la homología de éstos con los previamente publicados; los productos de PCR de VirB9 de tres aislados (Aguascalientes,

Tizimin y Yautepec) fueron clonados y secuenciados; a pesar de que se observaron variaciones a nivel de nucleótidos entre los tres aislados clonados, una vez que se convirtieron a aminoácidos, las secuencias coincidieron al 100% (**Figura 7**); de la misma forma, las secuencias de VirB9 de los aislados mexicanos coinciden al 100% (**Figura 13**) con las secuencias publicadas para aislados de EEUU, Brasil y Puerto Rico (López *et al.*, 2007; Vidotto *et al.*, 2008), esto es consistente con el criterio deseado y con lo esperado. La secuencia de aminoácidos fue sometida a una serie de análisis *in silico*, la ausencia de dominios transmembranales, hélices transmembranales, predicción de hidrofobicidad y la predicción de la estructura secundaria de la proteína sugieren que dicha proteína no se encuentra anclada a la membrana de la rickettsia, pero sí que probablemente se encuentra asociada a otras proteínas que conforman el SSTIV. Aunque se ha reportado que esta proteína se ubica en el espacio periplásmico de algunos patógenos, en *Anaplasma phagocytophilum* se describe su presencia en la superficie de la membrana externa (Ge y Rikihisa 2007; Sivanesan *et al.*, 2010). En el caso de *A. tumefaciens* se sugiere que VirB9 está localizada en la membrana interna, en el espacio periplásmico y se le atribuye que estabiliza otras proteínas VirB, donde también participa como puesto de control en la selección de sustratos del periplasma a la membrana externa y participa en el ensamble de este sistema. Para el caso de *Helicobacter pylori*, el homólogo VirB9 se asocia a una estructura filamentosa que sobresale de la envoltura bacteriana (Jakubowski *et al.*, 2005; Christie 1997). Nuestros resultados identificaron un péptido señal similar a lo reportado en *A. phagocytophilum* y *E. chaffensis* señal que permite la translocación de la proteína VirB9 a la membrana. Asimismo, se observa un dominio CagX, presente en proteínas de transferencia conyugal, dicho dominio coincide para otras proteínas VirB9 de microorganismos relacionados. Se propone que la inhibición de la función de esta proteína puede inhibir la supervivencia intracelular de microorganismos como en *E. canis* (Felek *et al.*, 2003) por estos hechos algunos autores la proponen como candidato vacunal en *E. canis* y *A. marginale* (Felek *et al.*, 2003; Vidotto *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2008).

En estudios previos se mostró que animales inmunizados con membranas de *A. marginale* o naturalmente infectados, reconocían rVirB9 en forma específica (López *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2008); Sin embargo, hasta ahora no se ha usado en la inoculación de bovinos, sea en su forma nativa o recombinante. En el presente estudio, tampoco se realizó la inoculación con la proteína ya que no fue el objetivo, sin embargo, la proteína recombinante si es reconocida en inmunoblot por anticuerpos de un bovino inmunizado con cuerpos iniciales y protegido contra el desafío heterólogo (**Figura 28**). Uno de los criterios que también deben considerarse al seleccionar una proteína con potencial vacunal, es su capacidad inmunogénica. Al análisis de la secuencia por programas como Antigenic, BCEPred y ABCPred, se detectaron varios epitopos de tipo B y regiones antigénicas, es decir secuencias de aminoácidos que teóricamente pueden estimular la producción de anticuerpos. Dos de estas secuencias de diez aminoácidos fueron sintetizadas en forma comercial y ligadas a KLH para la producción de anticuerpos en conejos. Las respuestas de los conejos a estos péptidos fue muy pobre aún después de 12 inoculaciones. Conejos tuvieron que ser inoculados con la proteína recombinante a la que sí respondieron después de 3 inoculaciones con 100µg en cada ocasión. La razón por la que los conejos no respondieron como se esperaba no la sabemos pero se puede especular, desde que los epitopos no son lo suficientemente inmunogénicos, la proteína acarreadora (KLH) pudo ser demasiado antigénica y desviar la respuesta inmune hacia epitopos de KLH más que hacia los de VirB9. Aún cuando la proteína recombinante se encontraba en forma de cuerpos inclusión en las células usadas para expresión de la proteína, después de un proceso de solubilización, la proteína sí fue reconocida por el suero del bovino inmunizado. En ensayos de inmunofluorescencia, al usar los sueros de los conejos inmunizados con la proteína recombinante, estos reconocieron el *A. marginale* en una lamina de glóbulos rojos infectados por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, Para la localización celular de la proteína se utilizaron cuerpos iniciales vivos donde se verificó el reconocimiento de los anticuerpos anti-VirB9 producidos en los conejos, estos ensayos nos permitieron corroborar que las

membranas de los cuerpos iniciales se encontraban intactas y que los anticuerpos reconocen la proteína, la cual se encuentra en la superficie externa de la rickettsia, fortaleciendo el postulado de utilizar esta proteína como agente vacunal. A la fecha, a pesar de los estudios que se han hecho con esta proteína, este trabajo es el primer reporte de la ubicación VirB9 en *Anaplasma marginale*.

Se propone corroborar la ubicación de la proteína VirB9 por medio de otras técnicas microscópicas e inmunomarcaje. Así como evaluar la capacidad inmunogénica de la proteína rVirB9 en bovinos y estudiar otras proteínas homólogas del SSTIV con la finalidad de conocer la función, estructura y ubicación de las proteínas del sistema de secreción tipo IV, para estos trabajos se puede echar mano de las herramientas bioinformáticas buscando proteínas conservadas en los diferentes aislados de regiones geográficas distantes, las cuales sean codificadas por un solo gen y con características inmunorelevantes ya que la vacunación sería una forma de proteger y controlar los brotes de la enfermedad.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC. 2005. Rapid and long-term disappearance of CD4+ T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. J. Immunol. 174:6702-6715.
2. Aboytes TR. 1992. Development and practical applications of a PCR-based diagnostic system for the study of chronic bovine anaplasmosis. Ph.D. Dissertation University of Missouri, Columbia, USA.
3. Almazán GC, Medrano C, Ortiz M, de la Fuente. 2008. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. Vet. Parasitol. 158 103–109.
4. Araujo FB, Costa CT, Ramos CA, Farias TA, Souza II, Melo ES, Elisei C, Rosinha GM, Soares CO, Fragoso SN, 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. Mem Inst Oswaldo Cruz. 103:186-190.
5. Bao W, Kumagai Y, Niu H, Yamaguchi M, Miura K, Rikihisa Y. 2009. Four VirB6 paralogs and VirB9 are expressed and interact in *Ehrlichia chaffeensis*-containing vacuoles. J. Bacteriol. 191: 278-286.
6. Barbet AF, Yi J, Lundgren A, McEwen BR, Blouin EF, Kocan KM. 2001. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. Infect. Immun. 69:3057-3066.
7. Barbet AF, Lundgren A, Yi J, Rurangirwa FR, Palmer GH. 2000. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. Infect. Immun. 68:6133–6138.
8. Barbet AF. 1995. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. Vet. Parasitol. 57:43-49.

9. arigye R, Garc a-Ort z M, Rojas REE, Rodr guez SD. 2004. Identificaci n de ant genos IgG2 espec ficos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. T c . Pecu. M x; 42: 219-236.
10. Baron C, O'Callaghan D, Lanka E. 2002. Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. Mol. Microbiol. 43: 1359-1365.
11. BCM: Search Launcher Baylor College of Medicine <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> Consulta Mayo 2009.
12. Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. Curr. Opin. Microbiol. 11:3-8.
13. Bioinformatics Group <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> Mayo 2009.
14. Blood, D.C.; O.M. Radostits. 1992. Medicina Veterinaria. 7ma ed. Vol II. p 1142-1144. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México.
15. Bock RE, deVos AJ, Kingston TG, Carter PD. 2003. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus* Vet Parasitol. 118 (1-2):121-131.
16. Brayton KA, Dark MJ, Palmer GH. 2009. Anaplasma, in: Genome Mapping And Genomics In Animal-Associated Microbes. V. Nene, C. Kole (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 85-116.
17. Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP Jr. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. Proc Natl Acad Sci. 102:844-849.
18. Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH. 2001. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne Ehrlichial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:4130–4135.
19. Brown WC, Brayton KA, Styer CM, Palmer GH. 2003. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit variant-

- specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. *J. Immunol.* 170: 3790–3798.
20. Brown WC, Palmer GH, Meeus PF, Barbet AF, Kegerreis KA, McGuire TC. 2004. CD4⁺ T lymphocytes from *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) vaccinees recognize naturally processed epitopes conserved in MSP3. *Infect. Immun.* 72: 3688–3692.
 21. Brown WC, Zhu D, Shkap V, McGuire TC, Blouin EF, Kocan KM, Palmer GH. 1998. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4(+) T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect. Immun.* 66:5414-5422.
 22. Carreño AD, Alleman AR, Barbet AF, Palmer GH, Noh SM, Johnson CM. 2007. In vivo endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet. Pathol.* 44:427.
 23. Collins NE, Liebenberg J, de Villiers EP, Brayton KA, Louw E, Pretorius A, Faber FE, van Heerden H, Josemans A, van Kleef M, Steyn HC, van Strijp MF, Zweggarth E, Jongejan F, Maillard JC, Berthier D, Botha M, Joubert F, Corton CH, Thomson NR, Allsopp MT, Allsopp BA. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102:838-843.
 24. Corona Rodríguez M, Martínez S. 2004. Anaplasmosis bovina. *REDVET VI (4):* 1-27.
 25. Christie PJ, y Vogel JP. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends. Microbiol.* 8:354-360.
 26. Christie PJ. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* 179:3085–3094.
 27. Christie PJ. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiology.* 40:294–305.

28. de la Fuente J, Golsteyn Thomas EJ, van den Bussche RA, Hamilton RG, Tanaka EE, Druhan SE, Kocan KM. 2003. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5001-5005.
29. de la Fuente J, Kocan KM. 2001. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infect. Immun.* 69:5151-5156.
30. de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Garcia-Garcia JC, Rodríguez SD, García MA, Guglielmo AA, Mangold AJ, Friche Passos LM, Blouin EF, Kocan KM. 2002. Phylogeographic of new world strains of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae based on major surface protein sequences *Vet. Microbiol.* 88:275-285.
31. den Hartigh AB, Rolán HG, de Jong MF, Tsolis RM. 2008. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J. Bacteriology.* 190:4427-4436.
32. Diario Oficial de la Federación (DOF) 2007. Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos 7-14.
33. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
34. EMBL-EBI <http://www.ebi.ac.uk/> Mayo 2009.
35. Estrada-Peña A, Naranjo V, Acevedo-Whitehouse K, Mangold AJ, Kocan KM, de la Fuente J. 2009. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC. Biol.* 7:57.

36. Ewing SA. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In; Proc. Of the 7th National Anaplasmosis Conference, Mississippi State University, MS, USA. 395-423.
37. ExPasy Proteomic Server <http://www.expasy.ch/> Mayo 2009.
38. Felek S, Huang H, Rikihisa Y. 2003. Sequence and expression analysis of virB9 of the type IV secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. *Infect. Immun.* 71: 6063-6067
39. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.* 50:69-81.
40. Filloux A. 2009. The type VI secretion system: a tubular story. *EMBO. J.* 28, 309-310.
41. Finlay BB, McFadden G. 2006. Anti-Immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124:767-782.
42. Futse JE, Brayton KA, Knowles DP Jr, Palmer GH. 2005. Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. *Mol. Microbiol.* 57:212-221.
43. Galletti MF, Ueti MW, Knowles DP Jr, Brayton KA, Palmer GH. 2009. Independence of *Anaplasma marginale* strains with high and low transmission efficiencies in the tick vector following simultaneous acquisition by feeding on a superinfected mammalian reservoir host. *Infect. Immun.* 7(4):1459-64.
44. GenScan <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> Mayo 2009.
45. Gen Y, Rikihisa Y. 2007. Identification of novel surface proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by affinity purification and proteomics. *J. Bacteriol.* 189: 7819-7828.

46. Goff WL, Johnson WC, Kuttler KL. 1985. Development of an indirect fluorescent antibody test, using microfluometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 46:1080-1084.
47. Goldman M, Pipano E, Rosenberg AS. 1972. Fluorescent antibody test for *Babesia bigemina* and *Babesia Berbera*. *Res. Vet. Sci.* 13:77-81.
48. Gonçalves-Ruiz PM, Passos LMF, Ribeiro MFB. 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* 128:325-331.
49. González EF, Long RF, Todorovic RA. 1978. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 39:1538-1541.
50. González-Pedrajo y Dreyfus G. 2003. Sistema de secreción de proteínas en las bacterias Gram-negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico.* Vol. XXVII: 45-63.
51. Han S, Norimine J, Palmer GH, Mwangi W, Lahmers KK, Brown WC. 2008. Rapid deletion of antigen-specific CD4+ T cells following infection represents a strategy of immune evasion and persistence for *Anaplasma marginale*. *J. Immunol.* 181:7759-7769.
52. He SY, Nomura K, Whittam TS. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochem. Biophys. Acta.* 1694:181-206.
53. Holland IB, Schmitt L, Young J. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol. Membr. Biol.* 22:29-39.
54. Hope M, Riding G, Menzies M, Willadsen P. 2004. A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. *Vaccine.* 22:407-415.
55. Integrated DNA technologies <http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx> Mayo 2009.
56. Jakubowski SJ, Cascales E, Krishnamoorthy, Christie PJ. 2005. *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated

- component of a Type IV Secretion System, regulates substrate selection and T-Pilus biogenesis. *J. Bacteriol.* 187:3486-3495.
57. Jiménez OR, Rodríguez SD, Rosario R, Orozco LE, de la Fuente J. 2008. *Anaplasma marginale*: Análisis de las secuencias del fragmento variable del gen *msp1 α* y del gen *msp4* de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Téc. Pecu. Méx.* 46:69-78.
 58. Jongejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.
 59. Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.* 155: 1-9.
 60. Juhas M, Crook DW, Hood DW. 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol.* 10:2377-2386.
 61. Junker M, Schuster C, McDonnell AV, Sorg KA, Finn MC, Berger B, Clark PL. 2006. Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:4918-4923.
 62. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.jp/kegg/> Mayo 2009.
 63. Kocan KM, Blouin EF, Palmer GH, Eriks IS, Edwards WL. 1996. Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine-derived antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791:157-165.
 64. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF. 2008. Advances toward understanding the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. *Front. Biosci.* 13:7032-7045.
 65. Kocan KM de la Fuente J Guglielmone Mel n dez RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rew.* 16: 698-712.

66. Löhr CV, Rurangirwa FR, McElwain TF, Stiller D, Palmer GH. 2002. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infect. Immun.* 70:114-120.
67. Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC. 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect. Immun.* 75:2333-2342.
68. Maas J. Buying bulls: protecting your investment & protecting your herd; disponible en: http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-BE_cca/INF-BE_cca05/cca050708-BullDisPrv.pdf. Julio 2007.
69. MEMSAT <http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html> Mayo 2009.
70. Multiple sequence alignment <http://align.genome.jp/> Mayo 2009.
71. Munodzana D, McElwain TF, Knowles DP, Palmer GH. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infect. Immun.* 66:2619-2624.
72. National Center Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Mayo 2009.
73. Niu H, Rikihisa Y, Yamaguchi M, Ohashi N. 2006. Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. *Cell. Microbiol.* 8:523–534
74. Ocampo-Espinoza V, Vazquez JE, Aguilar MD, García OMA, Alarcón GJ, Rodríguez SD. 2006. *Anaplasma marginale*: lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Vet. Microbiol.* 114:34-40.
75. OIE. Organización Mundial de Salud Animal http://www.oie.int/esp/es_index.htm Acceso Febrero 2009.

76. Osorno MB, Ristic M. 1977. Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnostico, distribución de la enfermedad en México y uso de una vacuna atenuada de *Anaplasma marginale*. Vet. Méx. 8:85-98.
77. Otim C, Wilson AJ, Campbell RS. 1980. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Aust. Vet. J. 56:262-266.
78. Palmer GH and McElwain TF. 1995. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. Vet. Parasitol. 57:233-253.
79. Palmer GH, Barbet AF, Kuttler KL, McGuire TC. 1986. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. J. Clin. Microbiol. 23:1078-1083.
80. Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the *Ehrlichia Anaplasma marginale*. Microbes Infect. 2:167-176.
81. Palmer GH, McGuire TC. 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. J. Immunol. 133:1010-1015.
82. Palmer GH. 2009. Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: A centennial perspective. Onderstepoort J. Vet. Res. 76:75-79.
83. Parker RJ, Shepherd RK, Trueman KF, Jones GW, Kent AS, Polkinghorne IG. 1985. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. Vet. Parasitol. 17:205-213.
84. Pei J, Wu Q, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. 2008. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella mutants* is type IV secretion system dependent. Infect. Immun. 76:30-37.
85. Potgieter FT, Kocan KM, McNew RW, Ewing SA, 1983. Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. Am. J. Vet. Res. 44:2256-2261.
86. Potgieter FT, Van Rensburg. 1987. The persistence of colostral antibodies and the incidence on in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort. J. Vet. Res. 54:557-560.

87. Rances E, Voronin D, Tran-Van V, Mavingui P. 2008. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *J. Bacteriol.* 190:5020-5030.
88. Readseq <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/> Mayo 2009.
89. Riding G, Hope M, Waltisbuhl D, Willadsen P. 2003. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine.* 21:1874-1883.
90. Rikihisa Y, Lin M, Niu H, Cheng Z. 2009. Type IV secretion system of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1166:106-111.
91. Ristic M, Kreir JP. 1984. Family III. Anaplasmataceae Philip 1957, 980AL. In: 2nd Edition Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, pp. 719-729 Edited by N.R. Kreig and J.G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.
92. Ristic M. 1960. Studies of anaplasmosis. I. Filtration of causative agent. *Am. J. Vet. Res.* 21:890-894.
93. Ristic M. 1980. Anaplasmosis. In: Blood diseases of man and animals Vol. 2, Weindmand. Ristic M. (eds.) Academic press, Inc., New York, N.Y. pp. 474-539.
94. Rodríguez SD, Cossío R, García MA, Aboytes TR. 1996. Diagnostico de la anaplasmosis bovina en: Control de enfermedades parasitarias en el ganado bovino. Ed. Díaz P., Escamilla M., Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 30-38.
95. Rodríguez SD, García MA, Cantó GJ, Hernández G, Santos N, y Aboytes R. 2003 Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Cien. Vet.* 9: 123-147.
96. Rodríguez SD, García OMA, Cantó AGJ, Hernández SG, Santos N, Aboytes TR. 1999. Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale* *Tec. Pecu. Méx.* 37:1-12.
97. Rodríguez SD, García Ortiz MA, Hernandez SG, Santos CNA, Aboytes TR, Canto AGJ. 2000. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration

- against a homologous challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23:239-252.
98. Rodríguez SD, García-Ortiz MA, Jiménez OR, Vega y Murguía CA. 2009. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *Infect. Genet. Evol.* 9:1092-1101.
99. Rodríguez – Vivas RI Qui nez- vila FJ Fragoso-S nchez H. 2005. Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México. 227-247.
100. Rurangirwa FR, Stiller D, French DM, Palmer GH. 1999. Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the Ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3171-3176.
101. Salabarría FF y Pino R. 1988. Transmisión vertical de *Anaplasma marginale* en bovinos infectados durante el periodo final de la gestación. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 19:179-182.
102. Sandkvist M. 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40:271-283.
103. Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/> Mayo 2009.
104. Scoles GA, Miller JA, Foil LD. 2008. Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with mechanical transmission by the horse fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 45:109-114.
105. Scoles GA, Ueti MW, Noh SM, Knowles DP, Palmer GH. 2007. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 44:484-91.
106. Sivanesan D, Hancock MA, Villamil Giraldo AM, Baron C. 2010. Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic

- model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry*. 49:4483-4493.
107. Smith T, Kilborne FL. 1893. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern Cattle fever. USDA Bureau of Anim Bull. I: 1-301.
108. Stothard P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
109. Strik NI, Alleman AR, Barbet AF, Sorenson HL, Wamsley HL, Gaschen FP, Luckschander N, Wong S, Chu F, Foley JE, Bjoersdorff A, Stuen S, Knowles DP. 2007. Characterization of major surface protein 5 of *Anaplasma phagocytophilum* and the extent of cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin. Vaccine. Immunol.* 14:262-268.
110. Suttan EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, Brayton KA, Gillespie JJ, Brown WC. 2010. *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins VirB2, VirB7, VirB11 and VirD4 are immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine. *Infect. Immun.* 78:1314-1325.
111. Tello RM, Alvarez MJ, Ramos J, Oytes TR, Cant GJ. 1986. La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. *Tec. Pec. Mex.* 52: 45-50.
112. The National Institute for Biotechnology in the Negev <http://bioinfo.bgu.ac.il/bsu/index.htm> Mayo 2009.
113. Theiler, A. 1910. *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Report of the Government Veterinary Bacteriologist, 1908-1909. Transvaal, South Africa.
114. Theiler, A. 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. First Report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa. Johannesburg. South Africa.

115. TMHMM server <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> Mayo 2009.
116. Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.* 36:777-782.
117. Ueti MW, Reagan JO Jr, Knowles DP Jr, Scoles GA, Shkap V, Palmer GH. 2007. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 5:2959-2964.
118. Vidotto MC, McGuire TC, McElwain TF, Palmer GH, Knowles DP Jr. 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 62: 2940-2946.
119. Vidotto MC, Venancio EJ, Vidotto O. 2008. Cloning sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolated from Parana State, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 7:460-466.
120. Wagner G, Cruz D, Holman J. Epidemiology, diagnosis and control alternatives for anaplasmosis. En: *Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología animal Garrapatas y enfermedades que transmiten*. Morelos México 99 : 6 - 7 . Citado por Rodríguez – Vivas RI Quiñez- vila FJ, Fragoso-Sánchez H. 2005. Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México. 227-247.
121. Yeo HJ & Waksman, G. 2004. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J. Bacteriol.* 186:1919-1926.
122. Zaugg JL, Stiller D, Coan Me, Lincoln SD. 1986. Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on an Idaho field-infected, chronic carrier cow. *Am. J. Vet. Res.* 47:2269-2271.

123. Zhong Z, Wang Y, Qiao F, Wang Z, Du X, Xu J, Zhao J, Qu Q, Dong S, Sun Y, Huang L, Huang K, Chen Z. 2009. Cytotoxicity of *Brucella* smooth strains for macrophages is mediated by increased secretion of the type IV secretion system. *Microbiology*. 155:3392-402.

10. ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de nucleótidos, gen VirB9 en formato FASTA de tres aislados mexicanos.

>AGUASCALIENTES 840 pb

```
ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCGTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTTACAGGA
GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA
ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAACCACGGGTATCACTCG
TTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAAGTGATGGCTATGGGAGACAGCGTTCAC
TGGAAGGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG
ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTGTTTCAAAG
TCTGCTGGTCCTGATGCCGCGGGGTATAAAGAAGTGCCGGATGAGCTCGGCAGGGTGGAC
TCCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGGTGCCTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG
TTCGATCTAAAAGGGGCCGGGCTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC
AACAGTGGCGAGGTTACTGTGCGCCCGAATGCAACTGGCAAGAATTATGTATACTCTGCA
AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT
TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTTTCTGTGGGCAGACATGGC
AAAAAGTGCCATGCAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC
AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGCCGTGCAAGTAGTGAATACGGTGCTTTAG
```

>YUCATAN 840 pb

```
ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCGTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTTACAGGA
GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA
ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAACCACGGGTATCACTCG
TTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAAGTGATGGCTATGGGAGACAGCGTTCAC
TGGAAGGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG
ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTGTTTCAAAG
TCTGCTGGCCCTGATGCCGCGGGGTATAAAGAAGTGCCGGATGAGCTCGGCAGGGTGGAC
TCCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGGTGCCTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG
TTCGATCTAAAAGGGGCCGGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC
AACAGTGGCGAGGTTACTGTGCGCCCGAATGCAACTGGCAAGAATTATGTATACTCTGCA
AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT
TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTTTTCTGTGGGCAGACATGGC
AAAAAGTGCCATGCAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC
AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGCCGTGCAAGTAGTGAATACGGTGCTTTAG
```

>MORELOS 840 pb

```
ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCGTGCTCGGCTCTACTGACCGTTGTTTTTACAGGA
GGTGTGGCACAGTCTGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAA
ACCTTTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAACCACGGGTATCACTCG
TTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAAGTGATGGCTATGGGAGACAGCGTTCAC
```

TGGAAGGTAAAGCCCGTAGATAACAAACTGTTTCATTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAG
ACAAATATGCTGGTAGAAACCAACAAAGGCAGGAGCTACGCTTTTGATCTTGTTTCAAAG
TCTGCTGGCCCTGATGCCGCGGGGTATAAAGAAGTGGCGGATGAGCTCGGCAGGGTGGAC
TCCCCCCTGTTGGATATGGCCTACGTGGTGCGTTTTTACTACCCGGATAATAACAGGGAG
TTCGATCTAAAAGGGGCCGACTGGCGGACTTGTCTGCTCCGAGCTTGGCAAAGAACCCC
AACAGTGGCGAGGTTACTGTGCGCCCGAATGCAACTGGCAAGAATTATGTATACTCTGCA
AGCAGCGCTGATGCAACAATAGTCCCTGTGAAAACTTTTGATGATGGGGCCCTTACATAT
TTTCAGTTCTATGACAATAACAAGGTGATCCCAAAGTGTCTTCTGTGGGCAGACATGGC
AAAAAAGTGCCATGCAGGATGTTGCTACTTAAGGGCTATGTAATAATCGAAGGAGTCCAC
AAGCGGCTGTACCTTGACTACGGCAAGAGTGGCGTCGAAGTAGTGAATACGGTGCTTTAG

Anexo 2. Secuencia de Aminoácidos proteína VirB9 de los aislados mexicanos secuenciados en formato FASTA.

>Proteína VirB9

MNFYKNLLACSALLTVVFTGGVAQSAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHS
FIEFSKGETIKVMAMGDSVHWKVKPVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSK
SAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAYVVRFYYPDNNREFDLKGAGLADLSAPSLAKNP
NSGEVTVRPNATGKNYVYSASSADATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVI PKVFSVGRHG
KKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLLDYGKSGVEVVNTVL

Anexo 3. Secuencia de aminoácidos proteína VirB9 sin péptido señal en formato FASTA

>VirB9 255 aa

SAVSGGAPVSVDSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVHWKVK
PVDNKLFIPLEREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLD
DMAYVVRFYYPDNNREFDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVYSASSAD
ATIVPVKTFDDGALTYFQFYDNNKVI PKVFSVGRHGKKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLL
LDYGKSGVEVVNTVL

Anexo 4. Secuencia de aminoácidos proteína VirB9 que componen el dominio CagX

>VirB9 243 aa

DSRIKTFVYSPNEIFTVVFNHGYHSFIEFSKGETIKVMAMGDSVHWKVKPVDNKLFIPL
EREGKTNMLVETNKGRSYAFDLVSKSAGPDAAGYKEVADELGRVDSPLLDMAYVVRFYYP
DNNREFDLKGAGLADLSAPSLAKNPNSGEVTVRPNATGKNYVYSASSADATIVPVKTFDD
GALTYFQFYDNNKVI PKVFSVGRHGKKVPCRMLLLKGYVIEGVHKRLLDYGKSGVEVV
NTV