

**ANTÍGENOS SUBDOMINANTES DE *Anaplasma marginale*:
NUEVOS CANDIDATOS VACUNALES CONTRA LA ANAPLASMOSIS BOVINA**

***Subdominant Antigens of *Anaplasma marginale*: New Vaccine Candidates
Against Bovine Anaplasmosis***

Joilyneth Ferreira^{*,1} y Juan C. Martínez^{*}

^{*}Fundación Instituto de Estudios Avanzados, IDEA. Edificio A, Laboratorio de Estructura Molecular. Sartenejas, Baruta, Estado Miranda. Caracas 1080. Venezuela.

Correo-E:jferreira50@yahoo.com

Recibido: 23/11/16 - Aprobado: 17/07/17

RESUMEN

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa que afecta a los bovinos y es causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*. A pesar de su impacto global, hasta el momento, no se ha desarrollado una vacuna efectiva. Se ha postulado que la inmunización del ganado con la membrana externa de la rickettsia, genera protección parcial contra la exposición al *Anaplasma marginale* y que esta respuesta está dirigida a seis polipéptidos denominados Proteínas Principales de Superficie (MSPs del inglés, *Major Surface Proteins*). Estas proteínas presentan un carácter inmunodominante cuando se emplean como antígenos en su forma nativa o recombinante, lo que ha hecho pensar que son los antígenos indicados para una vacuna. Sin embargo, la protección brindada fluctúa entre una protección total o parcial a ninguna protección. La búsqueda de antígenos alternativos a las MSPs, se ha visto limitada a consecuencia de su muy baja o ausente capacidad inductora de formación de anticuerpos o de linfocitos T reactivos, los cuales son indispensables para su identificación mediante inmunoensayos. El objetivo de este trabajo fue describir las estrategias aplicadas recientemente para identificar nuevos antígenos de *A. marginale*, denominados antígenos subdominantes, porque representan una pequeña porción del proteoma de la rickettsia, los cuales han demostrado ser

ABSTRACT

The Anaplasmosis is an infectious disease of cattle caused by the intraerythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale*. Despite its overall impact, no effective vaccine has been developed so far. It has been postulated that immunization of cattle with the native outer membrane of rickettsia generates partial protection against *Anaplasma marginale* challenge; and that this response is directed to six polypeptides known as *Major Surface Proteins (MSPs)*. These proteins display an immunodominant character when they are used as immunogens in their native or recombinant form, which has suggested that they are the appropriate vaccine antigens. However, the protection provided varies from a total or partial protection to no protection. The search for alternative antigens to MSPs has been limited as a result of their very low or null capacity for inducing the production of potential antibodies or reactive T cells, which are essential for their identification through immunoassays. The objective of this review was to describe the recently applied strategies for the identification of new antigens of *A. marginale*, the so-called subdominant antigens, proteins that represent a small portion of the proteome of the rickettsia. These proteins have shown to be good vaccine candidates against anaplasmosis. Currently, molecular and bioinformatics studies have defined several surface proteins and components of the Type

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

buenos candidatos vacunales contra la anaplasmosis. Actualmente, diversos estudios moleculares y bioinformáticos han definido varias proteínas de superficie y componentes del Sistema de Secreción Tipo IV, como antígenos potenciales; entre ellos están las proteínas Ana17, Ana29, Ana32, Ana37 y Ana43, que le han brindado una protección parcial al ganado después de la exposición al proceso infeccioso; y las proteínas VirB9-1, VirB9-2 y VirB10 (Sistema de Secreción tipo IV), las cuales generan una fuerte respuesta inmune en el ganado, aunque se desconoce su nivel de protección.

(Palabras clave: Bovino; anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; antígenos subdominantes)

INTRODUCCIÓN

En medicina veterinaria, las vacunas han jugado un papel crucial en el desarrollo de la industria ganadera moderna, por su impacto en disminuir la tasa de mortalidad de los animales al controlar las infecciones de manera eficaz y menos costosa [1].

El desarrollo de la bioinformática ha permitido explorar los genomas de los microorganismos en la búsqueda de secuencias codificantes de proteínas que pudiesen ser expresadas y evaluadas como candidatos vacunales potenciales. Este enfoque para el diseño de vacunas, conocido como Vacunología Inversa [2], en conjunto con el análisis del proteoma y técnicas inmunológicas, han facilitado la identificación de posibles antígenos involucrados en la inmunidad protectora [3].

La Vacunología Inversa ha sido aplicada para el diseño de vacunas contra la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* [4,5], agente causal de la anaplasmosis bovina, la cual es una enfermedad infecciosa que afecta al ganado y a otros rumiantes [6-13], causando severas pérdidas económicas en el ámbito ganadero debido a su incidencia negativa sobre la ganancia de peso y producción de leche, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial [14].

En vista de la dificultad para la identificación de proteínas o grupos de proteínas necesarias para inducir una inmunidad protectora en el hospedador, lo cual ha sido una de las principales limitaciones para el desarrollo de vacunas; diversos autores se han

IV Secretion System as potential antigens; among them are the Ana17, Ana29, Ana32, Ana37, and Ana43 proteins, which have given partial protection to cattle after the infectious challenge; and VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 proteins (Type IV Secretion System), which generate a strong immune response in cattle, although their level of protection is unknown.

(Key words: Bovine; anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; subdominant antigens)

dado a la tarea de desarrollar diferentes estrategias para lograr la identificación de nuevos antígenos de *A. marginale* [15].

Tebele *et al.* [16] al igual que Brown *et al.* [17], inmunizaron a los bovinos con membranas externas del patógeno, lo que generó una fuerte respuesta inmune humoral y celular que se correlaciona con la inmunidad protectora observada en los animales cuando éstos fueron desafiados con cepas homólogas [16,17], pero no así con cepas heterólogas [9]. Por otro lado, el uso de sueros inmunes de conejos y anticuerpos monoclonales que tienen actividad neutralizante sobre inóculos infectivos de *A. marginale*, resultó en el reconocimiento de seis polipéptidos sobre la membrana plasmática de esta rickettsia, denominadas Proteínas Principales De Superficie MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 [18]. La vacunación de bovinos con las formas nativas o recombinantes de las MSPs, aunque generaron una fuerte respuesta inmune en los animales vacunados, solo confirieron un nivel variable de protección, el cual va desde una protección total contra la rickettsemia y la anemia, pasando por una protección parcial a ninguna protección [19]. Sin embargo, estas proteínas siguen siendo postuladas como blancos de la respuesta inmune protectora contra la rickettsia y, en consecuencia, se vislumbran como potenciales antígenos vacunales [20].

El carácter inmunodominante de las MSPs probablemente sea un mecanismo de evasión de la rickettsia a la respuesta inmune del hospedero por medio del cual, otras proteínas de superficie que podrían ser esenciales en la vida del patógeno,

son enmascaradas y, por lo tanto, tienen muy baja o ninguna capacidad inductora de anticuerpos o de linfocitos T reactivos, indispensables para su identificación por algún tipo de inmunoensayo [21]. Este hecho dificulta la búsqueda de antígenos alternativos a las MSPs. En este contexto, se consideró de gran importancia describir cómo se ha logrado la identificación de nuevos antígenos, específicamente los denominados antígenos subdominantes, los cuales representan una pequeña porción del proteoma de *A. marginale* y que han demostrado ser buenos candidatos vacunales.

Identificación de Antígenos Subdominantes de Anaplasma marginale

En vista de que la inmunodominancia de las MSPs genera un nivel de protección variable y en algunos casos no genera protección, muchos autores se han enfocado en la identificación de proteínas subdominantes, inmunogénicas y conservadas en la membrana externa de *A. marginale* [21, 22], incluyendo aquellas asociadas dentro de la membrana [23]. Hasta la fecha, solo se ha evaluado el potencial vacunal de las proteínas descritas a continuación (Cuadro 1 y 2).

1. Proteína de membrana interna Ana29

Han sido muchos los intentos para identificar nuevas proteínas en *A. marginale* usando varias preparaciones antigénicas, entre ellos está un estudio realizado por Riding *et al.* [24], en el cual identificaron los antígenos por un proceso de fraccionamiento del material del patógeno basado en el punto isoelectrico de sus proteínas, acoplado con ensayos de vacunación y desafíos con el patógeno, sin conocer la localización y abundancia de estos antígenos en la rickettsia. La fracción escogida estaba libre de las conocidas MSPs y contenía proteínas con un punto isoelectrico entre un intervalo de 7,7 a 9,6. En estas fracciones se identificaron cinco proteínas, las cuales han sido denominadas como Ana43, Ana37, Ana32, Ana29 y Ana17, basado en sus pesos moleculares en kDa. Estas proteínas representan una porción menor del proteoma de *A. marginale*, las cuales una vez purificadas, se emplearon de forma individual en ensayos de vacunación en ganado, generando una inmunidad protectora parcial contra desafíos homólogos. Esta protección fue demostrada por la disminución significativa de la bacteriemia ($7,2 \pm 1,7\%$) en comparación con el grupo

control (15,3%).

Debido a las dificultades asociadas con la obtención de estos antígenos nativos en suficientes cantidades para los experimentos de vacunación y como parte del desarrollo de vacunas, Hope *et al.* [25] consideraron necesario producirlos como proteínas recombinantes. De todos estos antígenos identificados, lograron clonar el gen que codifica para la proteína Ana29. El análisis de secuencia predijo que Ana29 es una proteína integral de membrana, similar a una proteína putativa de *A. centrale* (Cuadro 1), además de mostrar un 99% de homología entre las secuencias de dos aislados australianos y uno americano de *A. marginale*, al igual que con una cepa de *A. centrale* usada en la vacuna comercial australiana. El gen Ana29 fue expresado para obtener la proteína recombinante (Ana29r) y purificarla para su uso en ensayos de vacunación.

Hope *et al.* [25], inmunizaron al ganado con el antígeno recombinante purificado y dos tipos de adyuvantes: Quil A, el cual fue empleado en ensayos previos [24] y CSIRO, que es un complejo de adyuvantes empleados para llevar al sistema inmune a generar una respuesta IgG₂ [25], ya que se ha demostrado que esta inmunoglobulina es la encargada de opsonizar a la rickettsia para su posterior eliminación por los macrófagos [26]. La mejor respuesta se obtuvo con la vacunación de Ana29r en el adyuvante CSIRO, donde se observó una protección significativa del ganado después del desafío, en comparación con el grupo control, lo cual se determinó por la baja bacteriemia (ganado vacunado: $5,1 \pm 1,8\%$; grupo control: $12 \pm 2,7\%$) y la escasa hemólisis medida por el porcentaje máximo de reducción del hematocrito (ganado vacunado: $33,4 \pm 0,5\%$; grupo control: $42,2 \pm 1,3\%$). Además, se obtuvo una mayor producción de IgG total en el ganado vacunado con CSIRO (título >6000), obteniéndose cuantiosas cantidades de anticuerpos IgG₂ específicos (título >3500).

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la inmunidad protectora contra *A. marginale* es dependiente de la secreción del IFN- γ por los linfocitos T CD₄⁺, ya que esta citosina permite la activación de macrófagos y la producción de IgG₂ [20].

2. Proteínas VirB9-1, VirB9-2, VirB10 y EF-Tu

En vista de la reciente secuenciación del genoma de *A. marginale* [27], se empleó un enfoque

Cuadro 1. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las nuevas proteínas identificadas de *A. marginale* y sus homólogas en organismos relacionados

| Proteína | Ubicación predicha | Identidad y resultados del BLAST ¹ | Identidad del organismo ² |
|--|--------------------|---|---|
| Ana29 (AM1076) | AM | PH (1e-157) | <i>A. centrale</i> (WP_012880434.1) |
| PND (AM197) | OM | PH (1e-30) | <i>E. canis</i> (WP_011304783.1) |
| PND (AM366) | OM | PH (0,0) | <i>A. centrale</i> (WP_041651248.1) |
| PND (AM854) | OM | OmpA (2e-109) | <i>A. centrale</i> (ACZ49107.1) |
| PND (AM387) | AM | PH (4e-84) | <i>A. phagocytoohilum</i> (WP_021799721.1) |
| PND (AM127) | OM | Acetamidasa (0,0) | <i>A. centrale</i> (WP_041651301.1) |
| PND (AM529) | OM | Resultado no significativo | - |
| PND (AM072) | AM | PH (0,0) | <i>A. centrale</i> (WP_012880260.1) |
| OpAG2 (AM1142) | OM | OMP 2 (4e-155) | <i>A. ovis</i> (AAN08684.1) |
| OMP4 (AM1164) | OM | MSP 2 (9e-33) | <i>A. ovis</i> (AAG37871.1) |
| OMP7 (AM1220) | OM | Resultado no significativo | - |
| OMP10 (AM1223) | OM | Resultado no significativo | - |
| OMP14 (AM075) | OM | 0,0 | <i>A. centrale</i> (ACZ48776.1) |
| PTC (AM097) | AM | 6e-147 | <i>A. phagocytoohilum</i> (WP_011450238.1) |
| VirB9 (AM1315) | OM | 0,0 | <i>A. centrale</i> (WP_012880282.1) |
| VirB10 (AM1314) | OM | 4e-158 | <i>A. phagocytoohilum</i> (WP_021800101.1) |
| EF-Tu (AM254) | AM | 0,0 | <i>A. centrale</i> (WP_012880528.1) |
| OMA87 (AM1096) | OM | 0,0 | <i>A. centrale</i> (WP_012880419.1) |
| PepA citosol aminopeptidasa (AM956) | OM | Leucina aminopeptidasa (0.0) | <i>A. centrale</i> (ACZ49021.1) |
| PAAA (AM878) | AM | 8e-37 | <i>A. centrale</i> (WP_012880560.1) |
| PAAA (AM879) | AM | 6e-47 | <i>A. centrale</i> (WP_012880560.1) |
| PAAA (AM880) | AM | Resultado no significativo | - |
| PND (AM779) | OM | PH (0,0) | <i>A. centrale</i> (WP_012880632.1) |
| PND (AM936) | AM | PH (2e-83) | <i>A. centrale</i> (WP_012880509.1) |

¹ La búsqueda del BLAST fue realizada en proteínas con función desconocida para determinar el porcentaje de identidad de secuencia con proteínas de organismos relacionados cercanamente. Los valores E del BLAST < 1e-20 fueron considerados significativos y están señalados. ² El número de acceso del GenBank de las proteínas identificadas en los organismos relacionados están entre paréntesis. PND: Producto no definido; AM: Asociada a la membrana; OM: Membrana externa; PH: Proteína hipotética; OMP: Proteína de membrana externa; MSP: Proteína principal de superficie; PTC: Proteína de transferencia conjugal; EF-Tu: Factor de elongación Tu; PAAA: Proteína asociada al apéndice de *Anaplasma* [18]

proteómico y genómico para la identificación de nuevas proteínas de superficie en preparaciones de membrana externa del parásito [21], porque ya se había demostrado que la membrana externa protegía al ganado contra el desafío con cepas homólogas [16, 17].

López *et al.* [21] separaron las proteínas de la membrana externa empleando electroforesis bidimensional, seguida por la inmunodetección de proteínas unidas a la IgG total e IgG₂ contenidas en el suero del ganado inmunizado con membrana externa de *A. marginale*, lo que restringió la identificación

a solo antígenos relevantes para la inducción de la respuesta inmune humoral.

Como resultado, obtuvieron un total de 75 proteínas inmunoreactivas, las cuales fueron cortadas del gel, tripsinizadas y analizadas por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tandem (LC-MS-MS, del inglés *Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry*) para obtener la masa molecular de los fragmentos peptídicos. Estos datos fueron comparados con la base de datos del genoma de *A. marginale* cepa *St. Maries* y se identificaron 38 puntos, los cuales contenían un total de 24 proteínas antigénicas que fueron señaladas como posibles proteínas de membrana externa, membrana interna o asociadas a la membrana. Esto incluyó a las previamente caracterizadas MSP2, MSP3 y MSP5. Entre las nuevas proteínas antigénicas, 14 están anotadas en el genoma de *A. marginale* e incluyen un grupo de proteínas del sistema de secreción tipo IV (TFSS, del inglés *Type Four Secretion System*; VirB9-1, VirB9-2, VirB10), el factor de elongación Tu (EF-Tu, del inglés *Elongation Factor-Tu*), aminopeptidasa PepA citosólica, los miembros de la superfamilia MSP2 (OMP4, OMP7, OMP10, OMP14, OMA87 y OpAG2) y las proteínas asociadas al apéndice de *Anaplasma* (AM878, AM879, AM880) (Cuadro 1). Las otras 7 proteínas están anotadas en el genoma de la rickettsia como producto no definido e incluyen las proteínas AM072, AM127, AM197, AM366, AM387, AM529, AM854 (Cuadro 1).

A las proteínas de función conocida distintas a la MSP2, MSP3 y MSP5, al igual que a las proteínas de función no definida, se les realizó una búsqueda (BLASTp) en la base de datos de proteínas para determinar su identidad con microorganismos relacionados (Cuadro 1). Seis proteínas de función desconocida (AM072, AM197, AM366, AM387, AM854 y AM127) y 11 proteínas de función conocida (AM075, AM097, AM254, AM878, AM879, AM956, AM1096, AM1142, AM1164, AM1314 y AM1315) tuvieron un resultado significativo en el BLAST, relacionándolas con proteínas putativas en *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* o *Ehrlichia canis* (Cuadro 1, resaltadas en negritas). Las proteínas restantes (AM529, AM880, AM1220 y AM1223) no tuvieron una puntuación significativa en el BLAST con otras proteínas (Cuadro 1).

Estas 21 proteínas identificadas fueron reconocidas por las IgG (dilución 1:200) e IgG₂ (dilución 1:200),

contenidas en el suero del ganado inmunizado con membrana externa de *A. marginale*, siendo esta la primera evidencia sobre la antigenicidad de estas nuevas proteínas distintas a las MSPs [21]. Hasta la fecha, diversos autores se han dado a la tarea de explorar a las proteínas VirB9-1, VirB9-2, VirB10 [28], EF-Tu [29] y la AM854 [15] como candidatos vacunales, debido a su localización en la superficie, para ser conservadas y probablemente necesarias para la sobrevivencia intracelular en bacterias Gram-negativas [28, 30].

En un estudio realizado por López *et al.* [28], se demostró el reconocimiento de las proteínas recombinantes VirB9-1 (46 kDa), VirB9-2 (46 kDa) y VirB10 (65 kDa), por la IgG₂ presente en el suero de tres bovinos vacunados con membrana externa de la rickettsia (dilución 1:200). Los títulos de IgG₂ en el suero para estas proteínas recombinantes fueron de cinco a sesenta veces más bajos que aquellos para la MSP2, indicando la inmunodominancia de la MSP2 comparada con las proteínas del TFSS en estos animales. Resultados similares fueron obtenidos por Araújo *et al.* [29], quienes demostraron que VirB9-2, VirB10 y EF-Tu son antigénicas en el ganado infectado natural y experimentalmente, lo cual fue detectado por un ELISA con las proteínas recombinantes. Además, se ha demostrado que los epitopes de VirB9-1, VirB9-2, VirB10 y EF-Tu, tienen regiones altamente conservadas entre diferentes aislados geográficos de *A. marginale* y un alto promedio de similitud en la secuencia aminoacídica con las proteínas ortólogas de patógenos rickettsiales muy cercanos como *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* y *E. chaffeensis* [28, 29].

Adicionalmente, López *et al.* [28], demostraron que estas proteínas recombinantes del TFSS son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T CD₄⁺ y la secreción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear Cell*) con tres años o más de su última vacunación con membrana externa de *A. marginale*. Los resultados demostraron que al aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD₄⁺ antígenos específicos dentro de las PBMC (eliminaron los linfocitos T CD₈⁺ y $\gamma\delta$ ⁺), los animales identificados con los números 04B90 y 04B92, tuvieron una respuesta proliferativa significativa para las tres proteínas recombinantes a diferentes concentraciones de antígenos (0,1 a 10

$\mu\text{g/mL}$) y las líneas de células T del animal número 04B91 respondieron solo a las proteínas VirB9-2r y VirB10r. En cuanto a la secreción de IFN- γ por las PBMC, ésta fue significativa para las tres proteínas recombinantes en el bovino N° 04E90, y en el caso de los bovinos N° 04B91 y N° 04B92, solo hubo secreción significativa de IFN- γ para las proteínas VirB9-2r y VirB10r, no así para VirB9-1r.

Estos resultados demuestran que las tres proteínas del TFSS son reconocidas por mecanismos inmunes de bovinos vacunados con la membrana externa de la rickettsia, ya que son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T, la secreción de IFN- γ y la producción de IgG₂ [28, 31]. Adicionalmente, se ha observado que estas proteínas están naturalmente asociadas en la membrana externa de la rickettsia [22], por lo que existe la posibilidad de que un complejo de proteínas hecho con VirB9-1, VirB9-2 y VirB10, pudiera ser evaluado en un futuro como una vacuna para proteger al ganado contra la Anaplasmosis [32] y otros patógenos relacionados de animales y humanos [28].

3. Proteínas de Membrana Externa 7/8/9, AM854, AM936 y AM779.

Los análisis anteriores, empleados para la identificación de los candidatos vacunales, fueron basados en la protección inmune contra cepas homólogas, lo que limita el progreso para el desarrollo de una vacuna efectiva contra cepas antigénicamente diferentes [33]. Palmer *et al.* [4], emplearon la cepa viva de *A. marginale* subespecie *centrale* para la identificación de proteínas de membrana externa conservadas e inmunogénicas, debido a la ventaja que tiene esta cepa de inducir inmunidad protectora contra el desafío heterólogo [34].

Los autores inmunizaron al ganado con *A. centrale* y utilizaron el suero de estos animales para identificar las proteínas de membrana externa con epitopes conservados en la cepa heteróloga *A. marginale* [35]. Este análisis eliminó cinco (MSP1a, MSP2, MSP3, MSP4 y OpAG2) de los diez candidatos vacunales (AM779, AM854, MSP1a, MSP2, MSP3, MSP4, OMP7, OMP8, OMP9, OpAG2) identificados por Noh *et al.* [36] por espectrometría de masa, quienes emplearon un entrecruzador para aislar un complejo de proteínas de superficie entrecruzado (CSP, del inglés *Cross-linked Surface Protein Complex*). Estas cinco proteínas

fueron eliminadas, ya que tres de ellas (MSP1a, MSP4 y OpAG₂), las cuales son ortólogas entre la cepa vacunal (*A. centrale*) y la cepa del desafío (*A. marginale*), no fueron antigénicas en el ganado inmunizado con *A. centrale*. Además, las otras dos proteínas de membrana externa eliminadas son las ya conocidas MSP2 y MSP3, las cuales fueron identificadas por reactividad cruzada con la IgG₂ de los animales vacunados con *A. centrale* [37]. El resto de las cinco proteínas de membrana externa incluyen a la AM779, AM854 y un grupo de tres proteínas muy relacionadas, OMPs 7/8/9.

Las OMPs 7/8/9 son codificadas por tres genes en tándem dentro de *A. marginale*, con 70-75% de identidad entre las tres proteínas [27]. Sin embargo, en *A. centrale*, este locus está ocupado por una sola proteína de membrana externa, la cual tiene 64-70% de identidad con las OMPs 7/8/9. Por lo tanto, el número mínimo de candidatos vacunales identificados por Palmer *et al.* [4] son tres: AM779, AM854 y una de las OMP7/8/9, los cuales han sido clasificados por los autores como antígenos "subdominantes".

Se conoce que OMP9 estimuló la respuesta proliferativa de linfocitos T en los animales vacunados con membrana externa de la rickettsia, pero su capacidad protectora contra la anaplasmosis es desconocida [4].

En cuanto a la proteína AM854, ha sido anotada en el genoma de *A. marginale* como una proteína putativa sin función definida [21] y el BLAST demostró similitud con una proteína de membrana externa de *A. centrale* (Cuadro 1). Esta proteína fue identificada en la superficie de *A. marginale* localizados en eritrocitos y células de garrapatas [36]. Además, la secuencia de aminoácidos predicha para el gen am854 (de un aislado de Brasil), mostró 100% de homología con las secuencias de los aislados americanos. En el genoma de *A. centrale* existe una proteína similar a la AM854, anotada como una proteína de membrana externa, la cual muestra una conservación considerable que debe ser tomada en cuenta, ya que la inmunización con esta subespecie de *Anaplasma* es capaz de generar una respuesta inmune protectora en el ganado [34, 38].

Diversos autores han evaluado la antigenicidad de la proteína AM854. Tal es el caso de Lopez *et al.* [21], quienes señalan que esta proteína fue reconocida por las IgG de bovino, en por lo menos

un animal, resultado que fue confirmado por Ducken *et al.* [15], quienes evaluaron la antigenicidad y la capacidad inmunoprotectora de los anticuerpos producidos por la AM854 y otra proteína llamada AM936, la cual es similar a una proteína putativa de *A. centrale* (Cuadro 1). Al igual que la AM854, la AM936 tiene homólogos en *A. phagocytophilum*, en cuya especie ambas proteínas son conservadas, además de ser las encargadas de mediar la entrada de la rickettsia a la célula hospedera [39, 40]. Estos autores demostraron que ambas proteínas de membrana externa son antigénicas, ya que fueron reconocidas por el suero de bovinos vacunados con membrana externa, CSP o con un complejo de proteínas de membrana externa no entrecruzado de *A. marginale*, utilizando las proteínas AM854r y AM936r como antígenos individuales en ensayos de inmunotinción. Posteriormente, inocularon a los animales con ambas proteínas recombinantes y obtuvieron una respuesta de IgG total e IgG₂ similar a la obtenida en el ganado inoculado con membrana externa. Sin embargo, los bovinos inoculados con ambas proteínas recombinantes no fueron protegidos del desafío con *A. marginale*, ya que desarrollaron altos niveles de rickettsemia en comparación con los bovinos inoculados solo con adyuvante (control) o con aquellos inoculados con membrana externa de la rickettsia. Estos resultados indican que los anticuerpos generados por las proteínas AM854r y AM936r no fueron capaces de proteger al ganado contra la infección.

Con el objetivo de identificar un antígeno específico que tenga la habilidad de inducir protección en el ganado contra la infección por *A. marginale*, Albarrak *et al.* [41] seleccionaron a la proteína AM779, la cual se había demostrado que era una proteína de superficie [36] y había sido reportada por Palmer *et al.* [4] como un antígeno subdominante de *A. marginale*. Esta proteína es similar a una proteína putativa de *A. centrale* (Cuadro 1), está altamente conservada (99-100%) al compararla con cepas de *A. marginale* distintas genética y fenotípicamente [36], y tiene ortólogos presentes en especies relacionadas al género *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia*, sugiriendo que el resultado podría ser favorable e informativo para el desarrollo de una vacuna contra otros patógenos de animales y humanos [4].

Albarrak *et al.* [41] comprobaron que la proteína

AM779, en el contexto de inmunógeno de membrana externa y el CSP, es inmunológicamente subdominante utilizando sueros de animales inmunizados con ambos inmunógenos, los cuales reconocieron múltiples proteínas inmunodominantes en una preparación antigénica de toda la bacteria, entre ellas la MSP2, pero no reconocieron a la proteína AM779 nativa. Probablemente, la AM779 nativa se encuentra en menor proporción en la superficie de la rickettsia, por lo que quizás se requiera de una cantidad molar de antígeno mucho mayor para lograr su identificación, como se comprueba con la proteína AM779r, que sí fue reconocida por los sueros. Adicionalmente, los títulos de IgG₂ para AM779 fueron significativamente bajos (<1000) en comparación con los de la MSP2 (>2000) en los sueros de animales inmunizados con la membrana externa y con el CSP.

Sin embargo, esta subdominancia es superada, en el caso de los linfocitos T, cuando el bovino es inoculado con la proteína AM779r, pero no así para los linfocitos B. Los autores observaron mayor estimulación de las células T cuando el ganado vacunado con AM779r fue estimulado con el mismo antígeno, no así cuando los estimularon con la membrana externa de la rickettsia (datos no mostrados) [41]. Por el contrario, los autores no observaron una diferencia significativa en los títulos de IgG₂ para AM779 entre el grupo de animales vacunados con membrana externa y con AM779r, a las dos semanas después de la última vacunación o previo al desafío. Estos resultados sugieren que puede ser determinante la cantidad de proteína AM779 para la respuesta de células T en lugar de la estructura del epítipo, siendo los responsables de su relativa subdominancia los principales componentes de la membrana externa, tales como MSP2 y MSP3.

No obstante, a pesar de que la proteína AM779 se encuentra en menor proporción en la superficie bacteriana, esta proteína es capaz de generar una respuesta a la presentación de antígenos nativos durante la infección, lo cual fue demostrado al desafiar bovinos inoculados con membrana externa de *A. marginale* y con la proteína AM779r a través de la picadura de garrapatas infectadas con la rickettsia. Este resultado indicó que hay suficiente antígeno para estimular a los linfocitos B de memoria, los cuales, debido a la alta afinidad de los receptores de inmunoglobulinas inducidos por la primera inmunización, tienen un requerimiento menor para su reactivación [42].

Además, esta respuesta anamnésica apoya la idea de que el inmunógeno recombinante representa fielmente la estructura del epítipo nativo [41]. Sin embargo, la respuesta inmune para AM779, generada por la inmunización con AM779r, membrana externa o CSP, no generó protección contra la bacteriemia, ya que todos los animales vacunados que presentaron altos títulos de IgG₂ para la AM779 nativa o recombinante tenían más del 2 % de eritrocitos infectados con la rickettsia y los que presentaban bajo títulos de IgG₂ para AM779, nativa o recombinante, estaban protegidos o parcialmente protegidos de la rickettsemia [41].

A pesar de que diversos autores citados en esta revisión, han logrado identificar nuevas proteínas de membrana, distintas a las conocidas MSPs de *A. marginale* (Cuadro 2), en la actualidad no se ha logrado identificar alguno de estos antígenos subdominantes capaz de generar una protección completa en un alto porcentaje de animales contra la anaplasmosis. Estos resultados no deben ser desalentadores, ya que el

número de variables involucradas en los ensayos de inmunización (adyuvante, dosis del antígeno, ruta de entrega, número de inmunizaciones, etc.) hacen difícil concluir que un antígeno específico, no pueda ser considerado un candidato vacunal [43].

Basándose en lo descrito, faltaría evaluar el nivel de protección que podría generar la inmunización con la proteína OMP9, con las proteínas del TFSS, solas o en combinación, y con la proteína EF-Tu, en el ganado desafiado con la rickettsia, ya que se ha demostrado que estas proteínas son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T y la producción de IgG₂ en los animales vacunados con membrana externa de *A. marginale*, o infectados natural o experimentalmente con la rickettsia. Adicionalmente, se debería evaluar el nivel de protección del resto de las proteínas identificadas por Lopez *et al.* [21], las cuales fueron detectadas por la IgG₂ contenida en el suero de animales inmunizados con membrana externa de la rickettsia.

Cuadro 2. Resumen del análisis inmunogénico realizado a los Antígenos Subdominantes de *Anaplasma marginale*

| Proteína | Proliferación linfocitos T CD ₄ ⁺ | Secreción IFN-γ | Producción IgG ₂ | Bacteriemia | Nivel protección |
|----------|--|-----------------|-----------------------------|-------------|------------------|
| Ana17 | | | | | |
| Ana32 | | | | | |
| Ana37 | ¿? | ¿? | ¿? | ↓ | Parcial |
| Ana43 | | | | | |
| Ana29 | ¿? | ¿? | SI | ↓ | Parcial |
| VirB9-1 | | | | | |
| VirB9-2 | SI | SI | SI | ¿? | ¿? |
| VirB10 | | | | | |
| AM779 | Muy leve | ¿? | SI | ↑ | Ninguno |
| AM854 | ¿? | ¿? | SI | ↑ | Ninguno |
| AM936 | | | | | |
| OMP9 | SI | ¿? | ¿? | ¿? | ¿? |
| EF-Tu | | | | | |
| OpAG2 | | | | | |
| OMA87 | | | | | |
| OMP4 | | | | | |
| OMP7 | | | | | |
| OMP10 | | | | | |
| OMP14 | | | | | |
| PepA | ¿? | ¿? | SI | ¿? | ¿? |
| AAAP | | | | | |
| AM197 | | | | | |
| AM366 | | | | | |
| AM387 | | | | | |
| AM127 | | | | | |
| AM529 | | | | | |
| AM072 | | | | | |

¿?: No se han hecho estudios; ↓: Disminución; ↑: Aumento

CONCLUSIONES

En vista de la dificultad para la identificación de antígenos protectores, que constituye una de las principales limitaciones para el desarrollo de vacunas, particularmente en aquellas dirigidas a patógenos que causan infecciones persistentes como las rickettsiosis; diversos autores citados en esta revisión, han estudiado el potencial inmunológico de algunos antígenos subdominantes, basados en la proliferación de linfocitos T CD₄⁺, secreción de IFN- γ , producción de IgG₂, reducción de la bacteriemia y en el nivel de protección al momento del desafío. Los más destacados fueron las proteínas Ana17, Ana29, Ana32, Ana37 y Ana43, las cuales lograron reducir la bacteriemia protegiendo parcialmente al ganado contra el desafío infeccioso; y las proteínas VirB9-1, VirB9-2 y VirB10 del Sistema de Secreción tipo IV, las cuales generaron una fuerte respuesta inmune en el ganado, determinada por la proliferación de linfocitos T CD₄⁺, producción de IFN- γ y producción de IgG₂. Estos resultados son muy interesantes, ya que estas proteínas son similares a otras proteínas de membranas de patógenos relacionados, por lo tanto, podrían brindar protección al ganado contra *A. marginale* y otros patógenos relacionados. Faltaría evaluar el nivel de protección que podría generar la inmunización del ganado con otras proteínas cuando éste es desafiado con la rickettsia; por ejemplo, la inmunización con OMP9, con las proteínas del TFSS, con la proteína EF-Tu y con el resto de las proteínas identificadas por Lopez *et al.* [21], las cuales fueron capaces de estimular la producción de IgG₂ en el ganado.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos no poseer conflicto de intereses durante la realización del trabajo.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

JF: Revisión bibliográfica y redacción del manuscrito. JCM: Redacción del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Mestre Cecilia Ferreira (Escola Secundária Jaime Moniz, Funchal, Madeira, Portugal) por la traducción del resumen al idioma inglés; y al Dr. Rafael Medina (Fundación Instituto

de Estudios Avanzados, IDEA; Baruta, estado Miranda, Venezuela) por su colaboración en la lectura y revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Rogan D, Babiuck L. Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2005; 24: 159-174.
2. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine.* 2001; 19: 2688-2691.
3. Sette A, Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.* 2010; 33(4): 530-41.
4. Palmer GH, Brown WC, Noh SM, Brayton KA. Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64 (1):115-119.
5. Quiroz-Castañeda RE, Amaro-Estrada I, Rodríguez-Camarillo SD. *Anaplasma marginale*: Diversity, Virulence, and vaccine landscape through a genomics. *Biomed Res Int.* 2016; 1-18
6. Munang'andu HM, Siamudaala VM, Munyeme M, Nalubamba KS. Detection of parasites and parasitic infections of free-ranging wildlife on a game ranch in Zambia: A challenge for disease control. *J Parasitol Res.* 2012; 35 (11-12):1-8.
7. Silveira JAG, Rabelo EML, Ribeiro MFB. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transbound Emerg Dis.* 2012; 59:353-60.
8. Ashraf QU a, Khan AU, Khattak RM, Ali M, Shaikh RS, Ali M, Iqbal F. A report on the high prevalence of *Anaplasma* sp. in buffaloes from two provinces in Pakistan. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4:395-8.
9. Sudan V, Sharma RL, Borah MK. Subclinical anaplasmosis in camel (*Camelus dromedarius*) and its successful therapeutic management. *J Parasit Dis.* 2014; 38: 163-5.
10. Eygelaar D, Jori F, Mokopasetso M, Sibeko KP, Collins NE, Vorster I, Troskie M, Oosthuizen MC. Tick-borne haemoparasites in African buffalo (*Syncerus caffer*) from two wildlife areas in Northern Botswana. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 1-11.
11. Da Silva JB, da Fonseca AH, Barbosa JD. Molecular characterization of *Anaplasma marginale* in ticks naturally feeding on buffaloes. *Infect Genet Evol.* 2015; 35: 38-41.
12. Guillemi EC, de la Fourniere S, Orozco M, Peña Martínez J, Correa E, Fernandez J, Lopez Arias L,

- et al. Molecular identification of *Anaplasma marginale* in two autochthonous South American wild species revealed an identical new genotype and its phylogenetic relationship with those of bovines. *Parasit Vectors*. 2016; 9 (1): 305-314. Erratum in: *Parasit Vectors*. 2016; 9 (1): 358.
13. Pereira A, Parreira R, Nunes M, Casadinho A, Vieira ML, Campino L *et al*. Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasit Vectors*. 2016; 9(1):251-260.
 14. Richey EJ, Palmer GH. Bovine anaplasmosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 1990; 12(11):1661-1668.
 15. Ducken DR, Brown WC, Alperin DC, Brayton KA, Reif KE, Turse JE *et al*. Subdominant outer membrane antigens in *Anaplasma marginale*: Conservation, antigenicity and protective capacity using recombinant protein. *Plos One*. 2015; 10(6):1-21.
 16. Tebele N, McGuire TC, Palmer GH. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun*. 1991; 59:3199-3204.
 17. Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain FT *et al*. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun*. 1998; 66: 5406-5413.
 18. Palmer GH, Munodzana D, Tebele N, Ushe T, McElwain TF. Heterologous strain challenge of cattle immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994; 42: 265-273.
 19. Palmer GH, McElwain TF. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet Parasit*. 1995; 57:233-253.
 20. Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today*. 1999; 15:281-286.
 21. López JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J *et al*. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun*. 2005; 73: 8109-8118.
 22. Macmillan H, Norimine J, Brayton KA, Palmer GH, Brown WC. Physical linkage of naturally complexed bacterial outer membrane proteins enhances immunogenicity. *Infect Immun*. 2008; 76(3): 1223-1229.
 23. Morse K, Norimine J, Hope JC, Brown WC. Breadth of the CD4+ T cell response to *Anaplasma marginale* VirB9-1, VirB9-2 and VirB10 and MHC class II DR and DQ restriction elements. *Immunogenetics*. 2012; 64(7):507-523.
 24. Riding G, Hope M, Waltisbuhl D, Willadsen P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine*. 2003; 21:1874-1883.
 25. Hope M, Riding G, Menzies M, Willadsen P. A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. *Vaccine*. 2004; 22:407-415.
 26. Gale KR, Leatch G, Gartside M, Dimmock CM. *Anaplasma marginale*: Failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasit Research*. 1992; 78:410-415.
 27. Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH *et al*. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102:844-849.
 28. Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun*. 2007; 75(5):2333-2342.
 29. Araújo FR, Costa CM, Ramos CA, Farias TA, Souza II, Melo ES *et al*. IgG and IgG₂ antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(2):186-190.
 30. Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, Braun N, Connery S, Dujeancourt A *et al*. Structure of a type IV secretion system. *Nature*. 2014; 508 (7497):550-3.
 31. Zhao L, Mahony D, Cavallaro AS, Zhang B, Zhang J, Deringer JR, *et al*. Immunogenicity of outer membrane proteins VirB9-1 and VirB9-2, a novel nanovaccine against *Anaplasma marginale*. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0154295.
 32. Morse K, Norimine J, Palmer GH, Suttan EL, Baszler TV, Brown WC. Association and evidence for linked recognition of type IV secretion system proteins VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. *Infect Immun*. 2012; 80 (1):215-227.
 33. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD. Antigens and alternatives for Control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinic. Microbiol. Rev*. 2003; 16:698-712.
 34. Pipano E. Live vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with especial references to quality assurance. *Trop Anim Hlth Prod*. 1995; 29:865-905.
 35. Galletti MF, Ueti MW, Knowles DP Jr, Brayton KA, Palmer GH. 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.* 2009; 77(4):1459-1464.
36. Noh SM, Brayton KA, Brown WC, Norimine J, Munske GR, Davitt CM *et al.* Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infect Immun.* 2008 ; 76(5): 2219-2226.
37. Agnes JT, Brayton KA, LaFollett M, Norimine J, Brown WC, Palmer GH. Identification of *Anaplasma marginale* outer membrane protein antigens conserved between *A. marginale sensu stricto* strains and the live *A. marginale* subsp. *centrale* vaccine. *Infect Immun.* 2011; 79(3):1311-1318.
38. Dark MJ, Al-Khedery B, Barbet AF. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine.* 2011; 29 (31): 4923-32.
39. Ojogun N, Kahlon A, Ragland SA, Troese MJ, Mastronunzio JE, Walker NJ *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* outer membrane protein A interacts with sialylated glycoproteins to promote infection of mammalian host cells. *Infect Immun.* 2012; 80(11): 3748-60.
40. Kahlon A, Ojogun N, Ragland SA, Seidman D, Troese MJ, Ottens AK *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host cells via its C terminus to facilitate infection. *Infect Immun.* 2013; 81(1):65-79.
41. Albarrak SM, Brown WC, Noh SM, Reif KE, Scoles GA, Turse JE *et al.* Subdominant Antigens in Bacterial Vaccines: AM779 Is Subdominant in the *Anaplasma marginale* outer membrane vaccine but does not associate with protective immunity. *PLoS One.* 2012; 7 (9): 1-7.
42. Richards S, Watanabe C, Santos L, Craxton A, Clark EA. Regulation of B-cell entry into the cell cycle. *Immunol Rev.* 2008; 224:183–200.
43. Noh SM, Turse JE, Brown WC, Norimine J, Palmer GH. Linkage between *Anaplasma marginale* outer membrane proteins enhances immunogenicity but is not required for protection from challenge. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(5):651-6.