

MECANISMOS DE VARIACIÓN ANTIGÉNICA EN *Anaplasma marginale*

Mechanisms of Antigenic Variation in Anaplasma marginale

Mariana C. Eleizalde* y Armando Reyna-Bello**^{*,1}

*Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Grupo de Inmunobiología, Caracas, Venezuela. **Dirección actual: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador

Correo:areyna@inmunobiologia.net.ve

Recibido: 18/09/14 - Aprobado: 20/11/14

RESUMEN

Anaplasma marginale (*A. marginale*), es una bacteria del orden de las Rickettsias que ocasiona la anaplasmosis bovina en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta enfermedad, transmitida principalmente por tábanos y garrapatas, se desarrolla típicamente en una etapa inicial aguda con manifestaciones clínicas caracterizadas principalmente por anemia y fiebre. Después de un par de meses, los animales recuperan su condición física y se hacen asintomáticos, siendo incapaces de eliminar completamente la bacteria, convirtiéndose en animales persistentemente infectados. Esto se debe a la capacidad de *A. marginale* para evadir el sistema inmune. En este sentido, se ha demostrado la existencia de un mecanismo de variación antigénica en las proteínas MSP1, MSP2 y MSP3 de la bacteria. Al evaluar la familia multigénica que codifica para la MSP2, se determinó que está conformada por dos regiones conservadas que flanquean una región central hipervariable. De esta manera, al expresarse cada una de las 52 variables de la MSP2, se expresa un epítipo diferente. Cuando se describió el genoma completo de este hemotrópico, se encontró también la presencia de 16 pseudogenes *msp2*, los cuales pueden ser recombinados dentro del sitio de expresión del operón de la MSP2, constituyendo un segundo mecanismo de variación. Además de ello, los fragmentos hipervariables y

ABSTRACT

Anaplasma marginale (*A. marginale*) is a bacterium of the Rickettsiales order that causes bovine anaplasmosis in tropical and subtropical regions worldwide. This disease, mainly transmitted by ticks and horseflies, typically develops in an initial acute stage, with clinical signs characterized by anemia and fever. After two months, animals recover their original physical condition and become asymptomatic, being unable to completely eliminate the bacterium, turning into persistently infected animals. This is due to the ability of *A. marginale* to evade the immune system. In this regard, the existence of a mechanism for antigenic variation in proteins of the bacterium, such as MSP1, MSP2, and MSP3, has been demonstrated. When assessing the multigenic family which encodes for MSP2, it was determined that it consists of two conserved regions flanking a central hypervariable region. Thus, when expressing each of the 52 MSP2 variables, a different epitope is also expressed. When the entire genome of this parasite was decoded, the presence of 16 pseudogenes for MSP2 was also discovered. These pseudogenes can be recombined within the operon expression site of MSP2, providing a second mechanism of variation. Moreover, both the hypervariable fragments and pseudogenes can combine among them, in a process called gene conversion, creating new "recombinant" epitopes,

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

los pseudogenes se pueden combinar entre sí, en un proceso denominado conversión génica, creando nuevos epítopes “recombinantes”, confiriendo una capacidad de variabilidad antigénica casi infinita al *A. marginale* (tercer mecanismo). Un cuarto mecanismo de variación antigénica, lo constituye la dimerización de la MSP2 sobre la superficie del *A. marginale*, debido a que la expresión simultánea de variantes conforman epítopes únicos. En conclusión, la recombinación génica de la MSP2 y su dimerización en la membrana, constituye un mecanismo muy eficiente de variación antigénica para eludir el sistema inmunológico del hospedador.

(Palabras clave: *Anaplasma marginale*; transmisión de enfermedades; pseudogenes; conversión génica; ganado bovino; sistema inmunitario; morbosidad)

Anaplasmosis Bovina

La anaplasmosis es una enfermedad hemoparasitaria causada por la bacteria *A. marginale* caracterizada principalmente por anemia y fiebre. Este hemotrópico, perteneciente a la familia Anaplasmaticeae y orden de las Rickettsias, actúa como parásito obligatorio al requerir penetrar dentro de los eritrocitos de los bovinos y otros rumiantes para cumplir con su proceso de replicación y supervivencia [1-3].

Está ampliamente descrito que *A. marginale* es transmitida biológicamente por garrapatas; sin embargo, se ha señalado que en Venezuela y otros países del continente, pareciera tener mayor relevancia la transmisión mecánica debido a dípteros hematófagos tales como los tábanos [4]. En este sentido, debe destacarse también la importancia de la infección por vía iatrogénica debido a agujas contaminadas durante las jornadas de vacunación [5].

En la etapa aguda, cuando el 15% de los eritrocitos son parasitados, inician los síntomas de la enfermedad, destacándose entre los más importantes: fiebre, anemia, pérdida de peso, anorexia, debilidad muscular, disminución de la productividad, pérdida de la libido en toros, aborto en hembras y posible muerte del animal. Todo esto ocurre concomitantemente a ciclos de rickettsemias que pueden llegar a invadir a más del 60% de los eritrocitos circulantes. Si el animal logra recuperarse de la etapa aguda, entonces entra en un estado portador persistente, en el que la cantidad

confering the *A. marginale* with an almost infinite capacity for antigenic variability (third mechanism). A fourth mechanism of antigenic variation consists of the dimerization of MSP2 on the surface of *A. marginale*, because the simultaneous expression of variants creates unique epitopes. In conclusion, gene recombination of MSP2 along with the dimerization of MSP2 on the membrane provides a very efficient mechanism for antigenic variation for evading the host's immune system.

(Key words: *Anaplasma marginale*; disease transmission; pseudogenes; gene conversion; cattle; immune system; morbidity)

de bacterias es reducida y los síntomas clínicos de la enfermedad no se manifiestan. Curiosamente, el animal nunca logra eliminar completamente la bacteria de su torrente circulatorio [2, 6, 7].

Prevalencia de la Anaplasmosis y Relevancia

La anaplasmosis está ampliamente distribuida en América Latina, ocasionando pérdidas hasta de 800 millones de dólares anuales [8], siendo más sensibles a la enfermedad los animales importados (bovinos de alta producción), desprovistos de inmunidad para esta enfermedad. Justamente estos son los animales utilizados para la mejora del rebaño, constituyendo esto uno de los principales obstáculos para el desarrollo de la ganadería bovina en estos países [2].

En Venezuela, los trabajos pioneros encontraron en la región Centro Occidental, una prevalencia de anaplasmosis del 57,7% y 48,6%, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta y la técnica de aglutinación en látex, respectivamente [9]. Por otra parte, en un trabajo más amplio utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se reportó una seroprevalencia promedio de 47,6% en el estado Zulia, Los Andes y los Llanos [10]. En Carora, estado Lara, la seroprevalencia reportada por ensayo inmunoenzimático indirecto fue de 50% [11], y más reciente aún, en una finca del estado Guárico se encontró una seroprevalencia de 97% mediante

esta misma técnica y 47% mediante la técnica de tinción naranja de acridina-bromuro de etidio [12].

Proteínas de Superficie y Polimorfismo de *A. marginale*

La presencia de proteínas de superficie se evidenció inicialmente al purificar cuerpos iniciales de *A. marginale* a partir de eritrocitos infectados para crear un antisuero de conejo contra estas proteínas. Este suero de conejo hiperinmune, que reconocía selectivamente proteínas de la membrana de *A. marginale*, fue capaz de neutralizar la infección en bovinos esplenectomizados. Esta investigación permitió concluir que estas proteínas son antigénicas y podrían constituir blancos de respuesta inmune protectora [13].

En este primer trabajo sobre la membrana de *A. marginale*, en el cual los animales que se recuperan de la fase aguda permanecen con la infección [13], se hipotetizó que esto se debía a la inmunosupresión inducida por el parásito, a una posible variación antigénica o al enmascaramiento de los epítopes con componentes del hospedador. En consecuencia, desde este primer trabajo, las investigaciones se avocaron al estudio de esas proteínas [13-16], denominadas posteriormente como proteínas mayores de superficie (MSPs) MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Cuadro 1).

La proteína MSP5 es codificada por un gen de copia simple y a pesar que su función aún es desconocida, es reconocida por su inmunogenicidad y porque es altamente conservada en las especies de *Anaplasma*, por lo que se emplea como el principal antígeno en el diagnóstico de la anaplasmosis [11, 12,17]. La MSP4 también es una proteína

conservada y al igual que la MSP5 su función no es conocida. Sin embargo, el suero de animales inmunizados con membrana externa, reconoce a esta proteína, lo que sugiere que presenta epítopes para la generación de una respuesta inmune. No obstante, el potencial inmunogénico de esta proteína no ha sido estudiado a plenitud [18].

Por otra parte, en los años 90, se demostró mediante el uso de sondas de ácido nucleico [6] y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [7], que los niveles de ricketsemia varían marcadamente en animales con infección persistente. Esta variación puede reflejar multiplicación cíclica de *A. marginale* como un evento consistente con el surgimiento de las variantes antigénicas no reconocidas por el sistema inmune del hospedador.

Otros trabajos realizados para determinar la longitud del genoma de *A. marginale*, utilizando tres diferentes aislados, demostraron que se trata de un genoma circular de 1200 kbp y que al utilizar la enzima de restricción *SfiI* los patrones de restricción fueron similares mas no idénticos, lo que demuestra claramente un polimorfismo genético entre aislados, pudiéndose tratar de la presencia de familias multigénicas [19].

La presencia de polimorfismo en ciertas proteínas de la bacteria fue confirmada posteriormente al utilizar anticuerpos monoclonales que reconocen las proteínas de superficie frente a cuerpos iniciales de *A. marginale* pertenecientes a seis diferentes aislados. Al observar que no todos los anticuerpos monoclonales reaccionaron frente a los aislados heterólogos e incluso homólogos, se pensó que esto podría deberse a variación antigénica de la bacteria [20]. En consecuencia, estos hallazgos sentaron las

Cuadro 1. Caracterización de las proteínas de superficie de *A. marginale*

Proteína	Peso molecular (kDa)	Observación
MSP-1α	105	Protección [13, 25]
MSP-1β	100	Adhesión[16, 24]
MSP-2	36	Protección [13, 26] Variación antigénica [15, 22, 27, 29]
MSP-3	86	Variación antigénica [15, 22, 27, 29]
MSP-4	31	Conservada [18]
MSP-5	19	Inmunodominancia [17] Importancia en diagnóstico [7, 11, 12]

bases para la realización de estudios con técnicas de biología molecular, en los cuales se comprobó que en el genoma de la bacteria ciertas proteínas están codificadas por familias multigénicas, específicamente la MSP1 β , MSP2 y MSP3 [14, 21, 22].

La proteína MSP1 es un complejo constituido por dos polipéptidos denominados MSP1 α y MSP1 β [14]. La MSP1 α es codificada por un gen de copia simple polimórfico [22] y su función está relacionada con la adhesión de la bacteria a las glándulas salivales de la garrapata [23]. La subunidad MSP1 β , por su parte, es codificada por una familia multigénica y media la adhesión del Anaplasma al eritrocito bovino de manera selectiva [24]. Además, este polipéptido presenta variación en ciertas regiones de su secuencia aminoacídica [16, 21]. El complejo MSP1, se ha destacado por inducir inmunidad parcial protectora, por lo que ha sido estudiado como blanco potencial para el diseño de vacunas [25].

Otras proteínas como la MSP2 y MSP3 también son inmunogénicas e inducen por tanto la respuesta humoral y celular [26]. Estas proteínas codificadas por familias multigénicas, son responsables del mecanismo de variación antigénica que le permite a la bacteria perpetuarse en el organismo del hospedador bovino, evadiendo el sistema inmune [25, 27-29]. Por otra parte, el gen que codifica la proteína MSP2, se encuentra dentro de un operón que contiene además otros tres marcos abiertos de lectura que corresponden a posibles proteínas de superficie [28, 30].

Variación Antigénica de *A. marginale*

La existencia de familias multigénicas en el genoma de *A. marginale*, sentó la base para estudiar la relación existente entre las proteínas codificadas por estos genes de copias múltiples y la persistencia de esta rickettsia dentro del hospedador bovino. Así pues, tomando en cuenta trabajos anteriores, en los que se ha demostrado que los animales no son capaces de eliminar completamente la bacteria [32], se comprobó que los ciclos continuos de baja rickettsemia se deben a variantes antigénicas emergentes, en los cuales los genes *mSP2* codificados por una familia multigénica difieren por cambios de la secuencia aminoacídica, evidenciándose estos cambios en una misma población y no solamente entre aislados [31], emergiendo por lo menos cuatro tipos de variantes genéticas en cada ciclo [33]. Es por ello que la respuesta inmune en cada ciclo requeriría estar dirigida a una población de *A. marginale* antigénicamente diferente, comprobándose así que la variación antigénica juega un papel importante en la persistencia de la enfermedad. Estos trabajos [31, 33, 34] sugieren que la disminución de cada pico de rickettsemia presente en cada ciclo, podría deberse al reconocimiento de la mayoría más no de todas las variantes de MSP2 por parte de la respuesta inmune del hospedador (Figura 1), tal como ocurre con los tripanosomas africanos [15, 35].

Por otra parte, la conformación de la estructura dimérica de la MSP2 en la membrana de la bacteria [14] constituye también una fuente de variabilidad,

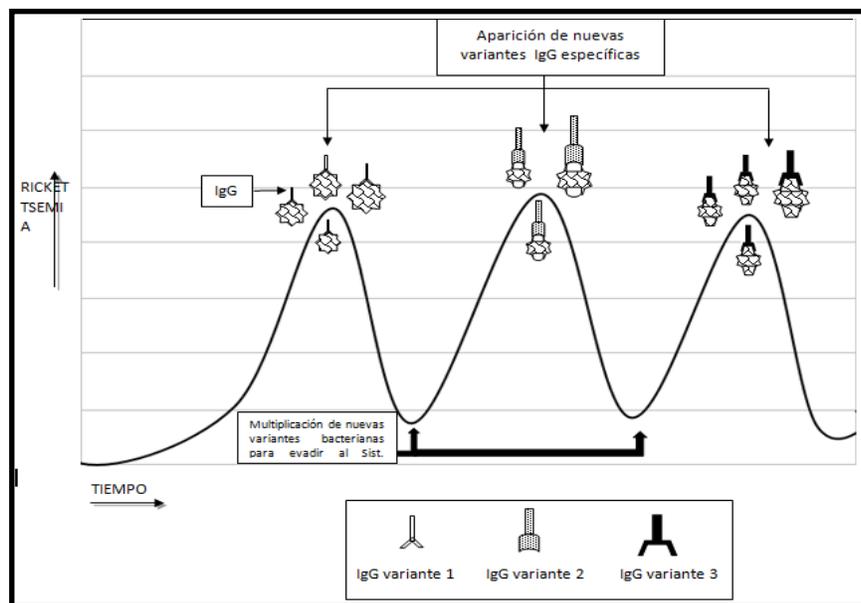


Figura 1. Representación de los picos de rickettsemia. Emergencia de nuevas variantes y evasión al sistema inmune

debido a que al confluir un epítoto recurrente con una nueva variante en esta dimerización, conlleva a la formación de un epítoto único como se observa en la Figura 2 [33].

En virtud a esto, la estructura de la MSP2 fue analizada, mediante el clonaje de genes transcritos *mSP2* por reacción en reversa de la PCR (RT-PCR), resultando que las variantes emergentes estaban conformadas por una región conservada hidrofóbica y una región central hipervariable hidrofílica [22, 33, 34, 36]. Además, los extremos son conservados entre todas las variantes de MSP2 analizadas y secuencias similares definen a una proteína homóloga de MSP2 en *A. phagocytophilum*, actualmente muy estudiada por su carácter zoonótico [33, 37, 38]. Otras bacterias cercanas a las anaplasmas, como son las ehrlichias también poseen mecanismos de variabilidad antigénica, como *E. canis* y *E. chaffeensis*, [37, 39].

La región hipervariable descrita en la MSP2 posee epítotos inmunogénicos capaces de inducir una respuesta inmune durante la infección persistente [26]. Sin embargo, se ha comprobado también que las regiones flanqueantes conservadas generan una respuesta de memoria por parte de los linfocitos T CD4+ contra la MSP2 [27].

En este sentido, mediante la técnica de *Western Blot*, se logró evidenciar como las variantes de la MSP2 que surgen durante cada ciclo de ricketsemia

no son reconocidas por el sistema inmune emergente. Sin embargo, el ciclo termina concomitantemente con una respuesta primaria para cada variante específica [34]. Este descubrimiento demostró que las variantes estructurales de la MSP2 que emergen durante cada ciclo son verdaderas variantes antigénicas, lo que soporta el mecanismo de variación que se ha sugerido para justificar la infección persistente [15, 34].

Mecanismo de Variación Antigénica

La transcripción de diferentes genes individuales de *mSP2* puede ser una fuente para la expresión de la variación. Sin embargo, la detección de múltiples transcritos en cada ciclo de la infección persistente, la cual ocurre cada seis a ocho semanas, sugiere que se requieren mecanismos adicionales de variación [33]. Por una parte, la estructura de los genes provee las bases para la recombinación homóloga y por otra parte, la presencia de pequeños bloques de homología dentro de las regiones hipervariables de los diferentes transcritos de la MSP2, supone la conversión de genes como segundo mecanismo de variación [34].

Las variantes de la MSP2 originadas por sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos en la región central hidrofílica, expresan unos únicos epítotos de células B que no son reconocidos al momento de la emergencia y una vez que se desarrolla una respuesta humoral contra ella, permite el control de la ricketsemia [26]. Es por esto que la estructura

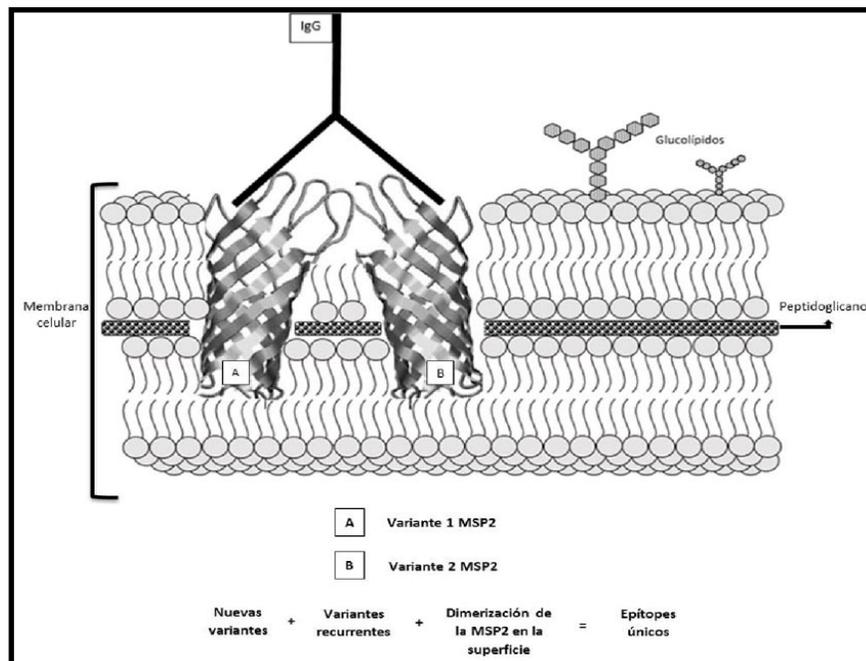


Figura 2. Expresión de variantes MSP2 y conformación de epítotos únicos

antigénica de las poblaciones de *A. marginale* cambia continuamente a través de la infección persistente y también dentro de las glándulas salivales de las garrapatas [23, 40].

Otras ehrlichias patógenas transmitidas por garrapatas también poseen mecanismos de variación antigénica para la evasión de la respuesta inmune en el hospedador. En tal sentido, un gran número de mecanismos ha sido reportado; como es el caso de *E. cannis*, *E. chaffeensis*, [39], *A. rumminatum* y *A. phagocytophilum* [38], las cuales presentan copias repetidas de la familia de genes *omp1/map* [22, 37], donde en el caso de *E. chaffeensis*, los productos de algunos de estos genes se expresan diferencialmente en los macrófagos del hospedador y en las células de garrapata, por lo que estas proteínas podrían ser necesarias para la colonización y supervivencia de *E. chaffeensis* tanto en el hospedador mamífero como en la garrapata [37]. Por otra parte, estos tándems repetidos en el genoma de ciertas ehrlichias, son copias de genes múltiples completos que pueden ser transcripcionalmente activos en un tiempo dado, resultando en la expresión de proteínas polimórficas [27], en contraste a un arreglo de genes o pseudogenes de las bacterias *A. marginale* y *A. phagocytophilum* que contienen unas familias de proteínas mayores de superficie inmunodominantes, que incluyen 10 o más genes variables ampliamente distribuidos a través del genoma [22, 35, 38].

El genoma completo de *A. marginale*, ha sido secuenciado, revelando la presencia de 940 secuencias codificantes (CDSs del inglés *coding sequences*) con una talla promedio de 1.077 pb. De estas CDSs, 163 contienen péptido señal y todas menos tres, contienen al menos un dominio transmembrana. Dentro de este grupo se han identificado 13 CDSs como proteínas externas de membrana (OMPs) y dos superfamilias de genes que codifican para OMPs. Estas superfamilias son: la superfamilia *msp2* que contiene 56 miembros incluyendo el gen *msp2*, *msp3*, *msp4* y 16 pseudogenes y la superfamilia *msp1β* que

contiene nueve miembros incluyendo el gen *msp1α*. Esto suma un número total de 62 OMPs sin incluir pseudogenes [22,29].

Por otra parte, no solo se ha demostrado la presencia de al menos nueve pseudogenes de la *msp2*, sino que además la proteína MSP2 está codificada dentro de un ARN policistrónico, confirmando así que se encuentra dentro de un operón [15, 22, 28,29, 30, 41]. Posteriormente, se reportó [22, 29] la identificación de cinco marcos de lectura (ORF, por sus siglas en Inglés) dentro de este operón, conteniendo un sitio de expresión que es funcional para los transcritos *msp2* en el extremo 3' (Figura 3). Los ORFs restantes del operón contienen una simple copia en el genoma de *A. marginale* y corresponden a la proteína externa de membrana 1 (OMP1) y a otras proteínas de superficie cuya función es desconocida y que han sido designadas como proteínas asociadas al operón 1, 2 y 3 (*opag1*, *opag2* y *opag3*). Estos genes tienen un patrón de expresión diferencial ya que, *opag1* no es transcrito o se expresa en muy pocas cantidades, mientras que *opag2* se transcribe junto con la *msp2* tanto en las glándulas salivales de la garrapata como en el eritrocito y *opag3* se expresa solamente en el eritrocito [15, 22, 30, 37]. Además, en el operón *msp2* se encuentran múltiples promotores junto con un regulador transcripcional [22, 41].

Se ha determinado la presencia de 14 proteínas externas de membrana (*omp*, *outer membrane proteins*), codificadas por los genes *omp1-14*, lo que representa una sustancial expansión en el número de integrantes de la superfamilia de proteínas de superficie (pfam01617), a la cual también pertenecen las proteínas MSP2, MSP3, MSP4, OPAG2 y OPAG3. Los productos de estos genes son expresados por *A. marginale* y son altamente conservados en los ciclos de infección, a pesar que los genes *omp7*, *omp8* y *omp9* poseen idénticas secuencias 3' y 5', sugiriendo la posibilidad de eventos de recombinación homóloga. Sin embargo, los cambios en estos genes durante un ciclo de infección son mínimos, por lo que estos eventos serían poco

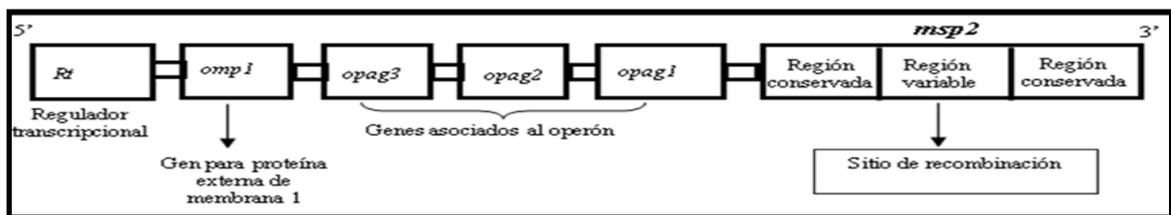


Figura 3. Representación esquemática del operón *msp2*

frecuentes [37].

Esta alta conservación no ocurre con los genes *msp2* y *msp3*, pues, este operón que contiene la *msp2* en el extremo 3' es solamente un sitio de expresión para los transcritos de este gen [22, 41]. Las copias restantes son pseudogenes truncados y la recombinación de éstos, genera diversidad en la zona hipervariable de la copia expresada [15, 22, 37]. Dos de las proteínas codificadas en este operón, además de la MSP2, tal y como se mencionó anteriormente, codifican para proteínas externas de membrana (función predicha mediante la aplicación del programa de algoritmos PSORT), las cuales son similares a la familia de proteínas de membrana externa OMP1 [39] y p28 [42] de *E. chaffeensis* y *E. canis*, respectivamente, y tomando en cuenta que se expresan junto con la MSP2 durante los ciclos de ricketsemia, estas proteínas podrían constituir también blancos del sistema inmune del bovino [28].

Este operón sirve como sitio de expresión en los estadios biológicamente importantes de la bacteria, ya que los transcritos del operón son detectados tanto en los estadios agudos en sangre como en las garrapatas infectadas. Sin embargo, aún se desconoce si las proteínas codificadas por este operón realmente son expresadas como proteínas externas de membrana [28].

Este mecanismo que involucra recombinación dentro de un sitio de expresión policistrónico, el cual a su vez

contiene otros genes de proteínas externas de membrana, es inusual y representa un eficiente uso del pequeño genoma para generar diversidad en la expresión de proteínas [27]. Por otra parte, es importante destacar que las proteínas externas de membrana que corresponden a los marcos abiertos de lectura 3 y 4 (*orf3* y *orf4*), aunque son miembros distantemente relacionados de la familia de la *msp2*, también pueden variar por recombinación con secuencias parcialmente homólogas en alguna parte del genoma. Las comparaciones entre los *orf3* y *orf4* de diferentes poblaciones de *A. marginale* presentan variaciones en estos genes, aunque a una menor tasa en comparación con la *msp2* [15].

De manera similar la proteína MSP3 es inmunodominante y pertenece a una familia multigénica, y al igual que la MSP2 posee una región conservada ubicada en los extremos 3' y 5' y una región central hipervariable [26, 36]. Es importante destacar que la posición cerrada de los pseudogenes de la *msp3* y *msp2* en un arreglo 3' con 3' fue encontrado en el genoma de la bacteria. La *msp3* posee una región de 600 pb conservada que flanquea en el extremo 5' que coincide con la región de 600 pb del extremo 5' de algunos pseudogenes del gen de la *msp2* como se observa en la Figura 4 [22, 29].

La aparición concertada de pseudogenes y la presencia de secuencias altamente conservadas aún

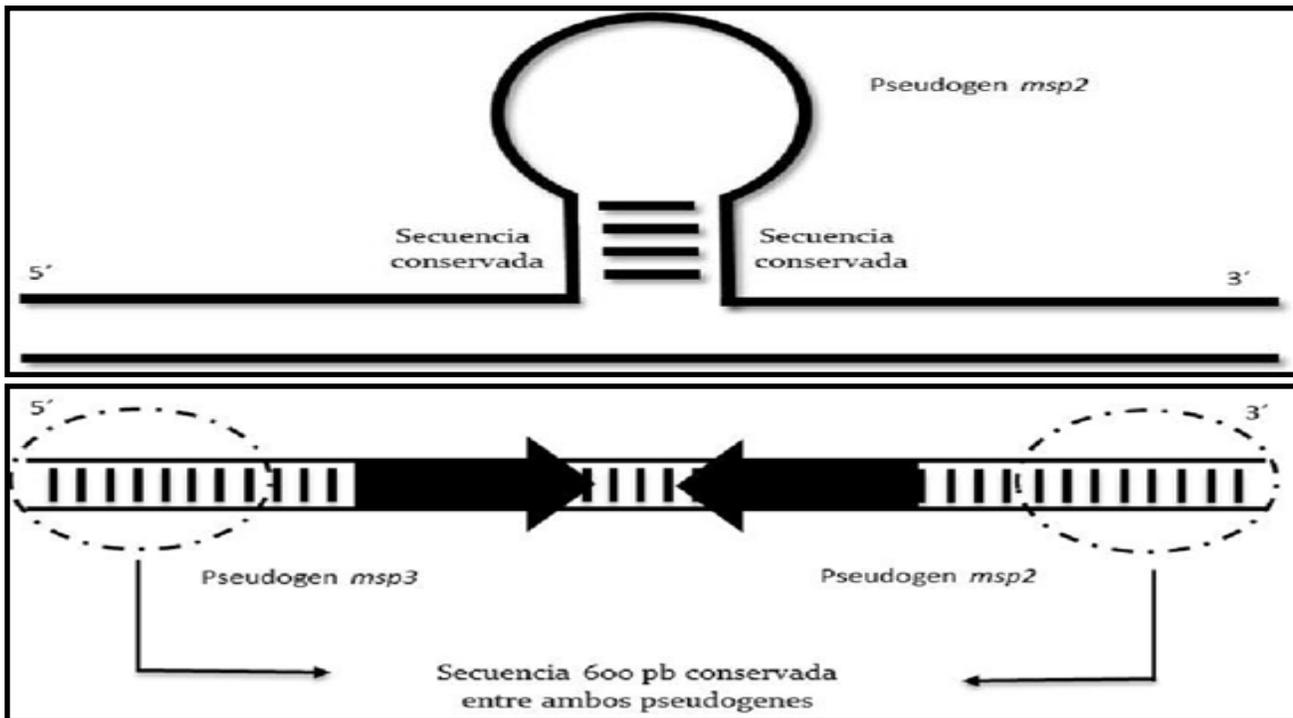


Figura 4. Representación esquemática del proceso de recombinación segmental entre pseudogenes funcionales de la *msp2* y *msp3*

cuando no codifican transcritos funcionales revelan que el contenido de esa secuencia es importante. Además, la yuxtaposición de la región de 600 pb próxima a ambos genes (*msp2* y *msp3*), las cuales presentan elevada tasa de recombinación, es importante como un mecanismo de recombinación, constituyendo un sistema que permite amplificar el potencial de variación en un genoma pequeño [22, 36].

En el caso de los pseudogenes de la *msp2*, se ha demostrado que monoclonales anti MSP2 no reconocen ninguna proteína de 18 kDa, que sería el tamaño especulado del producto del pseudogen si éstos fuesen expresados. Sin embargo, sí reconocen la proteína de 42 kDa, es decir, la MSP2, por lo que estos autores [27] concluyeron que la expresión de los pseudogenes podría requerir la recombinación dentro del sitio de expresión.

Para corroborar esta hipótesis, se ha estudiado el sitio de expresión en varios tiempos de infección. Mediante el aislamiento de la bacteria de dos animales infectados en cada ciclo de la infección y mediante el uso de cebadores que abarcan la región hipervariable [27], para ello se relacionaron los productos obtenidos con el operón de la *msp2*, obteniéndose que algunos de los pseudogenes clonados y secuenciados tenían relación con la secuencia del operón correspondiente, demostrando que estos genes no funcionales, los cuales están dispersos en el genoma de la bacteria, se recombinan dentro del sitio de expresión del operón durante la infección [27], actuando como templado para un proceso denominado como conversión génica que permite la recombinación de los pseudogenes en sitios de expresión [22, 35-37, 43, 44].

Una combinación de análisis de secuencia del genoma de *A. marginale* y la técnica de *Southern Blot* ha identificado la presencia de 10 a 20 pseudogenes en el genoma de la bacteria [27]. Sin embargo, 20 pseudogenes no son suficientes para generar el número de variantes necesarias para que se mantenga la infección persistente, ya que, tomando en cuenta que la infección persistente puede durar más de cinco años, se estima que se requerirían más de 500 variantes de la MSP2, por lo cual se necesitarían un mayor número de pseudogenes para generar tal número de variantes [43]. Sin embargo, poco menos de 50 secuencias de la región hipervariable han sido detectadas para la *msp2* [15, 31, 33, 34].

La presencia de pseudogenes y/o la familia

multigénica de las proteínas mayores de superficie (OMPs) no es suficiente para generar el gran número de variantes antigénicas necesarias, por lo que se ha determinado los cambios en el gen *msp2* usando poblaciones progenitoras y poblaciones progenie [43]. Para ello, la población progenitora fue obtenida tomando una muestra de un animal con rickettsia aguda, luego, la sangre de este animal durante el primer pico de rickettsia fue utilizada para la infección a otro bovino obteniendo así la población progenie. Posteriormente, se aisló el ADN genómico de las poblaciones y al realizar el análisis de la región hipervariable de la *msp2* de ambas poblaciones se obtuvieron muchos cambios, dados por sustituciones, inserciones y deleciones, demostrando la recombinación de genes y pseudogenes en el sitio de expresión de la región hipervariable de la MSP2 [43].

De hecho, el estudio de la región central hipervariable de los genes *msp2*, obtenidos de manera secuencial durante la infección, demostró que esta región hipervariable está compuesta de segmentos derivados de los diferentes pseudogenes, lo que puede deberse a un mecanismo de conversión de genes por transposición [22, 29, 41, 43], pudiendo encontrar hasta 1300 variantes *msp2* durante la infección [41].

En tal sentido, el proceso denominado conversión génica del gen *msp2* de *A. marginale* permite la constitución de un mosaico donde confluyen pseudogenes con segmentos de la familia multigénica de las MSP2 y MSP3, en los sitios de expresión policistrónicos que codifican la proteína variable de superficie MSP2 [15, 35, 44].

Este mecanismo de conversión génica, ha sido observado en otras bacterias que requieren también generar variabilidad antigénica, tales como *A. phagocytophilum* causante de la anaplasmosis en humanos anteriormente conocida como Ehrlichia Granulocítica Humana [38]. En otra amplia revisión del tema, se señala que la bacteria *Borrelia burgdorferi* así como *Treponema pallidum*, ambos patógenos causantes de enfermedades en humanos (enfermedad de Lyme y sífilis, respectivamente), desarrollan variabilidad antigénica a través de procesos similares al empleado por *A. marginale* [45].

Curiosamente, este proceso también es empleado por algunas células eucariotas. Por ejemplo, se señala que buena parte de la recombinación génica empleada

por los tripanosomas para generar la glicoproteína variable de superficie o VSG, es originada vía conversión génica [44]. Más curiosamente, este proceso también es el mismo empleado para lograr incrementar la afinidad o “maduración” de los anticuerpos en los linfocitos B, para así aumentar la avidéz de estas inmunoglobulinas durante el proceso de la respuesta inmune de los mamíferos [46].

CONCLUSIÓN

Una vez que un bovino sobrepasa la etapa aguda de la anaplasmosis, la ricketsemia disminuye y los ciclos se hacen crípticos, al presentar menos de un eritrocito infectado por cada 10.000. Entonces, este animal se transforma en un animal persistentemente infectado, quedando así por períodos que pueden superar los cinco años.

La bacteria *A. marginale* para escaparse del sistema inmune y permanecer de manera persistente en el hospedador, logra cambiar la secuencia aminoacídica de algunas proteínas de la membrana externa y realizar lo que se conoce como variabilidad antigénica, para lo cual, esta bacteria utiliza cuatro diferentes mecanismos, en los cuales maximiza la compleja estructura genética de su simple genoma.

Primeramente, existe un número de 52 copias de familias multigénicas que pueden ser recombinadas dentro del sitio de expresión del operón de la proteína, logrando una limitada cantidad de variantes, por otra parte, como segundo mecanismo, la bacteria posee 16 pseudogenes *mSP2* que igualmente pueden recombinarse en la región hipervariable de la MSP2. Como tercer mecanismo, los pseudogenes y la familia multigénicas MSP2 y MSP3 se recombinan, constituyendo un mosaico de genes que se expresan en el dominio hipervariable *mSP2*. Esto ocurre debido a un proceso denominado conversión génica, el cual permite la recombinación homóloga unidireccional para insertar material genético de alelos silentes (donador) en sitios de transcripción activa de alta homología (receptor). Como cuarto mecanismo, dos de las tres proteínas codificadas por los genes dentro del operón (*opag2* y 3), las cuales también son expresadas durante los ciclos de ricketsemia, también varían y tomando en cuenta que la MSP2 dimeriza sobre la superficie de la bacteria, se puede decir que la posibilidad de crear nuevos epítopes conformacionales o lineales es casi

infinita, aumentando exponencialmente la capacidad de la bacteria para evadir el sistema inmunológico del hospedador bovino, por lo que se garantiza la sobrevivencia de poblaciones de *A. marginale* al menos hasta por cinco años.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al proyecto G-98003462 del FONACIT, el cual hizo posible el financiamiento de la Lic. Mariana Eleizalde, mientras realizaba sus estudios doctorales. Por otra parte, los autores agradecen de manera especial al Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador por su patrocinio al Dr. Armando Reyna durante su año sabático en Ecuador. De igual manera, los autores agradecen la colaboración de la Srta. Beatriz Cajade por la revisión y discusión del presente trabajo y a la Srta. María Gabriela Gómez por su colaboración en el diseño gráfico de las figuras.

REFERENCIAS

1. Ristic M. Anaplasmosis. *Adv Vet Sci.* 1960; 6:111-192.
2. Rivera MA. Anaplasmosis. En: Hemoparasitosis Bovina. Editorial Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Ediciones Anauco. 1996; p. 169-222.
3. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, *et al.* Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HEG agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51(6):2145-2165.
4. Coronado A. Is a *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. *Rev Científ FCV-LUZ.* 2001; 9(5):408-411.
5. Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Riegel CM, Christopher JA, *et al.* Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *Am J Vet Res.* 2010; 71(10):1178-1188.
6. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. Cyclic ricketsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun.* 1990; 58 (4):1117-1119.

7. Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer GH, McGuire TC, Stiller D, McElwain TF. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J Clin Microbiol.* 1996; 34 (9):2225-2230.
8. Kocan KM, De la Fuente J, Guglielmono JA, Meléndez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection cattle. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(4):698-712.
9. James MA, Coronado A, Lopez W, Melendez R, Ristic M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop Anim Health Prod.* 1985; 17(1):9-18.
10. Toro Benitez M. Anaplasmosis: aspectos epizootiológicos y métodos de control. FONAIAP-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay. Instituto de Investigaciones Veterinarias. 1994. p. 50.
11. Reyna-Bello A, Cloeckart A, Vizcaíno N, Gonzatti MI, Aso PM, Dubrey G, *et al.* Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5(2):259-262.
12. Eleizalde MC, Reyna-Bello A, Caballero H, Vivas J. Evaluación y Mejoramiento del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para el Diagnóstico de la Anaplasmosis Bovina. *Rev Científ FCV-LUZ.* 2007; 17(4):349-356.
13. Palmer GH, McGuire TC. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol.* 1984; 133(2):1010-1015.
14. Vidotto MC, McGuire TC, McElwain TF, Palmer GH, Knowles DP Jr. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun.* 1994; 62(7):2940-2946.
15. Barbet AF, Lundgren A, Yi J, Rurangirwa FR, Palmer GH. Antigenic Variation of *Anaplasma marginale* by Expression of MSP2 Mosaics. *Infect Immun.* 2000; 68 (11):6133-6138.
16. De la Fuente J, García-García JC, Barbet AF, Blouin EF, Kocan KM. Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (Rickettsiales: Anaplasmataceae) to tick cells. *Vet. Microbiol.* 2004; 98(3-4):313-322.
17. Munodzana D, McElwain TF, Knowles DP, Palmer GH. Conformational Dependence of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 5 Surface-Exposes B-Cell Epitopes. *Infect Immun.* 1998; 66(6): 2619-2624.
18. Oberle SM, Barbet AF. Derivation of the complete *msp4* gene sequence of *Anaplasma marginale* without cloning. *Gene.* 1993; 136(1-2):291-294.
19. Alleman AR, Kamper SM, Viseshakul N, Barbet AF. Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *J Gen Microbiol.* 1992; 139 (10):2439-2444.
20. McGuire TC, Palmer GH, Goff WL, Johnson MI, Davis WC Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 1984; 45(3):697-700.
21. Camacho-Núñez M, De Lourdes Muñoz M, Suarez CE, McGuire TC, Brown WC, Palmer GH. Expression of polymorphic *msp1* beta genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect Immun.* 2000; 68(4):1946-1952.
22. 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 USA.* 2005; 102 (3):844-849.
23. Zivkovic Z, Esteves E, Almazán C, Daffre S, Nijhof AM, Kocan KM, *et al.* Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. *BMC Genomics.* 2010; 11(186):1-12.
24. García-García JC, De la Fuente J, Blouin EF, Johnson TJ, Halbur T, Onet VC, Saliki JT, Kocan KM. Differential expression of the *msp1a* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Vet. Microbiol.* 2004; 98(3-4):261-272.
25. Brown WC, McGuire TC, Mwangi W, Kegerreis KA, Macmillan H, Lewin HA, *et al.* Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4(+) T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infect Immun.* 2002; 70 (10): 5521-32.
26. Brown WC, Palmer GH, Brayton KA, Meeus PFM, Barbet AF, Kegerreis, KA, *et al.* CD4+ T Lymphocytes from *Anaplasma marginale* major surface protein (MSP2) vaccines recognize naturally processed epitopes conserved in MSP3. *Infect Immun.* 2004; 72(6):3688-3692.
27. Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH. Efficient use of a small genome antigenic diversity in tick borne ehrlichial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(7):4130-4135.
28. Lohr CV, Brayton KA, Shkap V, Molad T, Barbet AF, Brown WC, *et al.* Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon associated protein during mammalian and arthropod infection. *Infect Immun.* 2002; 70 (11):6005-6012.
29. Brayton KA, Palmer GH, Brown WC. Genomic

- and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Rev Vaccines*. 2006; 5(1):95-101.
30. Junior DSG, Araújo FR, Almeida JNF, Adi SS, Cheung LM, Fragoso SP, *et al.* Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(7): 843-849.
 31. Eid G, French DM, Lundgren AM, Barbet AF, McElwain TF, Palmer GH. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect Immun*. 1996; 64(3): 836-841.
 32. Tebele N, McGuire TC, Palmer GH. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun*. 1991; 59(9): 3199-3204.
 33. French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun*. 1998; 66(3):1200-1207.
 34. French DM, Brown WC, Palmer GH. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun*. 1999; 67(11):5834-5840.
 35. Futse JE1, Brayton KA, Nydam SD, Palmer GH. Generation of antigenic variants via gene conversion: Evidence for recombination fitness selection at the locus level in *Anaplasma marginale*. *Infect Immun*. 2009; 77(8):3181-3187.
 36. Meeus PF, Brayton KA, Palmer GH, Barbet AF. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Mol Microbiol*. 2003; 47(3):633-643.
 37. Noh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, *et al.* Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* *msp2* gene superfamily outer membrane proteins. *Infect Immun*. 2006; 74(6):3471-3479.
 38. Rejmanek D, Foley P, Barbet A, Foley J. Antigen variability in *Anaplasma phagocytophilum* during chronic infection of a reservoir host. *Microbiol*. 2012; 158(10):2632-2641.
 39. Lohr CV, Brayton KA, Barbet AF, Palmer GH. Characterization of the *Anaplasma marginale* *msp2* locus and its synteny with the *omp1/p30* loci of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. *Gene*. 2004; 325:115-121.
 40. Chávez O, Felsheim RF, Kurtti YJ, Ku P, Brayton KA, Munderloh UG. Expression Patterns of *Anaplasma marginale* *msp2* variants change in response to growth in cattle, and tick cells versus mammalian cells. *PlusOne*. 2012; 7(4):1-13.
 41. Palmer GH, Futse JE, Knowles Jr, Brayton KA. Insights into mechanisms of bacterial antigenic variation derived from the complete genome sequence of *Anaplasma marginale*. *Ann NY Acad Sci*. 2006; (1078): 15-25.
 42. Ohashi N, Zhi N, Zhang Y, Rikihisa Y. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infect Immun*. 1998; 66(1):132-139.
 43. Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* *msp2* occurs by combinatorial gene conversion. *Mol Microbiol*. 2002; 43 (5):1151-1159.
 44. Palmer GH, Brayton KA. Antigenic variation and transmission fitness as drivers of bacterial strain structure. *Cell Microbiol*. 2013; 15(12):1969-1975.
 45. Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA. Nothing is permanent but change – antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cel Microbiol*. 2009; 11(12): 1697-1705.
 46. Kato LI, Stanlie A, Begum NA, Kobayashi M, Aida M, Honjo T. An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity. *J Immunol*. 2012; 188(8):3559-3566.