

Ramos, Carlos A.N.; Araújo, Flávio R.; Osório, Ana L.A.R.; Madruga, Cláudio R.; Rosinha, Grácia M. S.; Soares, Cleber O.; Elisei, Carina

Transcrição de genes de proteínas de membrana de isolados brasileiros de *Anaplasma marginale*

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, vol. 16, núm. 3, julio-septiembre, 2007, pp. 152-155

Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária
Jaboticabal, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=397841463007>

TRANSCRIÇÃO DE GENES DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Anaplasma marginale*

CARLOS A.N. RAMOS¹; FLÁBIO R. ARAÚJO²; ANA L.A.R. OSÓRIO¹; CLÁUDIO R. MADRUGA²; GRÁCIA M. S. ROSINHA²; CLEBER O. SOARES²; CARINA ELISEI³

ABSTRACT:- RAMOS, C.A.N.; ARAÚJO, F.R.; OSÓRIO, A.L.A.R.; MADRUGA, C.R., ROSINHA, G.M.S.; SOARES, C.O.; ELISEI, C. [Transcription of genes of membrane proteins of Brazilians isolates of *Anaplasma marginale*]. Transcrição de genes de proteínas de membrana de isolados brasileiros de *Anaplasma marginale*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 152-155, 2007. Embrapa Gado de Corte, BR 262, Km 04, Caixa postal 154; Campo Grande, MS 79002-970. Brazil. E-mail: flabio@cnpq.embrapa.br

This work shows the transcription profile of membrane protein genes in three Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* (Rio Grande do Norte, Pernambuco-Zona da Mata, and Pernambuco-Sertão). RNA was purified from cattle blood experimentally-infected with the three isolates of *A. marginale*. After reverse transcription, genes *omp1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, and 14; *opag1-3*; *virB3*, 9, and 10; *am097*, 197, 254, 854, and 956 were amplified by PCR, with specific primers. Transcripts were detected for all genes, except *omp2*, 3 e *opag3* in all isolates and for *omp7* in one out of the three isolates analyzed. Absence of transcription for *opag3* and *omp7* diverge from the North American isolates of *A. marginale*. Reasons for such differences were discussed.

KEY WORDS: Transcription, OMPs, RT-PCR, *Anaplasma marginale*, Brazil.

RESUMO

Este trabalho demonstra o padrão de transcrição de genes de proteínas de membrana em três isolados brasileiros de *A. marginale* (Rio Grande do Norte, Pernambuco-Zona da Mata e Pernambuco-Sertão). O RNA foi purificado a partir de sangue de bovinos infectados experimentalmente com os três isolados de *A. marginale*. Após transcrição reversa, os genes *omp1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; *opag1-3*; *virB3*, 9, 10; *am097*, 197, 254, 854 e 956 foram amplificados por PCR, com oligonucleotídeos iniciadores específicos. Detectaram-se transcritos para todos os genes analisados, exceto *omp2*, 3 e *opag3* em todos os isolados e do gene *omp7* em um dos isolados estudados. A ausência de transcrito para os genes *opag3* e *omp7* diverge do observado em isolados americanos da riquetsia. Possíveis razões para essas diferenças são discutidas.

PALAVRAS-CHAVE: Transcrição, OMPs, RT-PCR, *Anaplasma marginale*, Brasil.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Caixa Postal 549, Campo Grande, MS 79070-900.

² Embrapa Gado de Corte, Setor de Sanidade Animal, BR 262, Km 04, Caixa Postal 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brasil. E-mail: flabio@cnpq.embrapa.br

³ Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do CNPq/Fundect.

INTRODUÇÃO

A anaplasmosse bovina, causada pela riquetsia *Anaplasma marginale*, é uma doença de grande importância econômica que é transmitida principalmente por carrapatos. A riquetsia infecta eritrócitos bovinos, causando severa anemia associada à anorexia, febre, diminuição no ganho de peso e produção de leite, e morte nos casos severos em animais não tratados (ZAUGG et al., 1985).

Estudos sobre resposta imune em animais protegidos contra anaplasmosse indicam que a proteção está associada ao aumento da atividade fagocítica dos macrófagos induzida por interferon-gama (INF-g), interleucina-2 (IL-2), IL-12 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-), produzidos por linfócitos T CD4+, que ainda estimulam a produção de imunoglobulinas da subclasse IgG2 contra antígenos de superfície da riquetsia (McGUIRE et al., 1979; BROWN et al., 1998a; PALMER et al., 1999).

O recente seqüenciamento do genoma do isolado *St. Maries* de *A. marginale* possibilitou a identificação de 62 genes de proteínas de membrana previamente não conhecidas. A maioria desses genes foram classificados nas superfamílias *msp1* ou *msp2*, e outros não foram associados a nenhuma superfamília (BRAYTON et al., 2005; BRAYTON et al., 2006). A superfamília *msp2* foi criada em torno da seqüência dos genes de *msp2*, 3 e 4, que formam a base de uma família de antígenos de superfície denominada *pfam* 01617 (VIDOTTO et al., 1994; BATEMAN et al., 2004). O gene *msp2* é transcrito como parte de um operon, no qual encontram-se

genes associados denominados *opags 1-3* (*operon associated genes*), os quais estão incluídos na família. Em *opags 1-3*, ocorre pequena variação durante o curso da infecção em mamíferos, ou entre diferentes isolados americanos da riquetsia (LÖHR et al., 2002). Ademais, 14 genes de proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* – OMPs) foram identificados com similaridades de seqüência com *msp2* e *msp4*. Esses genes estão arranjados isoladamente ou em operons. Três desses genes (*omp2*, 3 e 6), podem ser pseudogenes, uma vez que não foram detectados transcritos no isolado *St. Maries*, todos os outros genes foram transcritos em eritrócitos bovinos infectados com o isolado *St. Maries* de *A. marginale* (NOH et al., 2006). Como os genes da superfamília *msp2* são expressos na superfície bacteriana, o grau de conservação entre isolados de *A. marginale* emerge como uma importante questão. A imunização de bovinos com membrana externa induziu proteção contra a doença após desafio com *A. marginale* (TEBELE et al., 1991; BROWN et al., 1998a). Notavelmente, proteínas de membrana conservadas entre isolados são alvos para linfócitos T CD4+ provenientes de animais vacinados (BROWN et al., 1998b). Com isso, a identificação de proteínas de membrana altamente conservadas é uma prioridade para o desenvolvimento de vacinas contra anaplasmosse.

Em isolados brasileiros de *A. marginale* é desconhecido se esses genes são transcritos ou expressos durante a infecção em hospedeiros mamíferos. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o padrão de transcrição desses genes em três isolados brasileiros da riquetsia.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Anaplasma marginale*

Três bezerros Aberdeen Angus foram confirmados livres de *A. marginale* por PCR para *msp5* e ELISA indireto para MSP1a e MSP2, conforme ARAÚJO et al. (2005). Os bezerros foram inoculados por via subcutânea com estabilizado criopreservado de eritrócitos infectados com isolados de *A. marginale* provenientes do Estado do Rio Grande do Norte (RN), e de duas microrregiões do estado de Pernambuco, designados Pernambuco – Zona da Mata (PE-ZM) e Pernambuco – Sertão (PE-SE). Os animais foram examinados diariamente para detecção de *A. marginale* por distensões sanguíneas coradas com Giemsa, e o volume globular médio também foi determinado. Para obtenção de altos níveis de ricketsemia, os bezerros foram imunosuprimidos com dexametasona. Por volta do 21º dia pós-inoculação, os bezerros 0581 (isolado RN), 0583 (PE-ZM) e 0588 (PE-SE) apresentaram ricketsemias de 35, 87 e 20%, respectivamente, quando então procedeu-se a coleta de sangue em tubos heparinizados para posterior extração de RNA total.

Extração de RNA e reação da polimerase em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR)

A extração de RNA total foi realizada com Trizol Reagent (Invitrogen, EUA) conforme instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com RQ1 Rnase – Free Dnase (Promega, EUA) por 30 minutos a 37°C seguido da inativação da enzima conforme instruções do fabricante. A transcrição reversa foi

feita com sistema Impron II (Promega, EUA) utilizando como oligonucleotídeos iniciadores hexameros aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. A detecção de transcritos foi feita por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *omp1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; *opag1-3*; *virB3*, 9, 10; *am097*, 197, 254, 854 e 956 (Tabela 1). As seqüências desses iniciadores foram submetidas ao programa *Blastn* (NCBI) para identificar seqüências homólogas em outros organismos relacionados e em outros genes de *A. marginale*.

Os parâmetros de amplificação foram 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto para os genes *omps1-14*, *opag2*, 3 e *virB3*, e 55°C para *opag1*, *virB9-10*, *am097*, 197, 254, 854 e 956, e extensão a 72°C também por 1 minuto, seguida de uma etapa de extensão final a 72°C por 4 minutos. As reações de PCR foram realizadas a partir de DNA genômico, como controle positivo, cDNA para detecção de transrito, e RNA total como controle negativo, de cada isolado da riquetsia. Os produtos das PCRs foram separados eletroforeticamente em agarose 1% e corados com brometo de etídio para visualização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seqüências dos iniciadores, utilizados nos estudo, quando submetidas ao programa *Blastn* (NCBI), não revelou identidade com escore significativo com outros organismos, sugerindo que os mesmos eram específicos para *A. marginale*.

O padrão de transcrição de genes de proteínas de membrana nos três isolados brasileiros de *A. marginale* está demonstrado na Figura 1. Não se observou transrito para os genes *omp2*, 3 e *opag3* em nenhum dos isolados analisados. Para o gene *omp7*, apenas no isolado PE-ZM não foi observado transrito. Todos os outros genes apresentaram transcritos em todos os isolados analisados. As ausências de transrito para os genes *omp2* e 3 já havia sido descrita por NOH et al. (2006), sendo os dois, juntamente com o gene *omp6*, considerados como possíveis pseudogenes. Com relação ao gene *opag3*, sua transcrição e expressão já foram detectadas em eritrócitos infectados com diferentes isolados americanos de *A. marginale* (LÖHR et al., 2002) e em um isolado australiano (RIDING et al., 2003).

Alguns dos genes que apresentaram transrito nos isolados brasileiros analisados (*virb9* e 10, *am097*, 197, 254, 854 e 956) representam possivelmente uma importante fonte de抗ígenos para preparações vacinais, uma vez que, em estudo conduzido por LOPEZ et al. (2005), foram reconhecidos por IgG2 de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*. Ainda nesse estudo, duas dessas proteínas (Am197 e 854) descritas pela primeira vez em *A. marginale*, apresentaram identidade de seqüência com proteínas de *Ehrlichia canis*. Outras que se acreditava serem proteínas citoplasmáticas, como PepA (Am956) e EF-Tu (Am254), foram analisadas pelo programa TMHMM e reconhecidas como proteínas ancoradas à membrana externa e expostas no meio extracelular.

Possíveis explicações para ausência de transcritos em alguns genes de isolados brasileiros de *A. marginale* seria, con-

forme sugerido por NOH et al. (2006), que *omp2* e *3* são realmente pseudogenes. No caso de *opag3* (todos os isolados analisados) e *omp7* (no isolado PE-ZM), os níveis de transcrição poderiam ocorrer em níveis muito baixos, não sendo possível detectá-los com a técnica de RT-PCR. A transcrição desses genes poderia ocorrer também apenas em sítios específicos de multiplicação da bactéria, como nos tecidos dos hospedeiros invertebrados, o que não foi o objetivo desse estudo.

A evolução da bactéria com seus hospedeiros invertebrados poderia sugerir também uma possível explicação para as dife-

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação de transcritos de genes de membrana de isolados brasileiros de *Anaplasma marginale*.

Gene	Sentido do iniciador	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Gene	Sentido do iniciador	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
<i>omp1</i>	F	AAGGTC TACGGCTTGGTTACGGCTTGGCTTTGCCTTT	993	<i>omp14</i>	F	GCGTTAGCCCTCCCTG	1215
	R	AGTCTGATAACCGCACTCAACCCAAATAGTCCAG			R	ATCCGAACCTGATTCCCTA	
<i>omp2</i>	F	ATGATTGAGTCATGGGAACAAAAAGAGA	735	<i>opag1</i>	F	AGTTGCAAGGCAATTCCCTG	390
	R	CTGGGTGTGAGTGGTGA CGGTATGGATA			R	CTAAAAAAACCAAAAAACCGT	
<i>omp3</i>	F	CCTCATTTGTAACCTCTACCC	651	<i>opag2</i>	F	TGGTCGGTTGACACACTACC	909
	R	AACCTGATTCCCTAGTTCTACCC			R	TCAAAGTAACACCCCTTATGAGT	
<i>omp4</i>	F	CAGCATATCATGAAATACAGGAGGAAGTCGCTTAT	1218	<i>opag3</i>	F	TGTGGGTGACACACTACC	936
	R	GTGGCTAGCCGCTTGGAGATGTTACCG			R	CTAAAACCATCACCAAATGC	
<i>omp5</i>	F	CTGGTGTTGGAGAGTTGGCTTATG	1119	<i>virb3</i>	F	TGTCGGGTAGCGTAAAGAC	294
	R	AACTGAGGCTTACGGCCAGATTG			R	CTACATCACATCGTAAGATT	
<i>omp7</i>	F	TCTTTCTGTTGGGGGGTTGTA	1191	<i>virb10</i>	F	TTGAGTTAGGGATGTCAGACG	1338
	R	CGGGCTTGGACATCTTCTC			R	CTACCTACGGCACCGCCTC	
<i>omp8</i>	F	TTTCITGTTGAGCGGGTTGTAGTT	1200	<i>am097</i>	F	ATGAAAAGGCTTCTATGGTTT	813
	R	CGCGCTCTGATATTTCCTTCA			R	CTACCCACCGCCCTCTG	
<i>omp9</i>	F	TCTTTCTGTTGAGGGGGTTGTA	1212	<i>am197</i>	F	ATGAAAAGGCTTGGCTTGTAG	510
	R	GCGTGCCTTGACATCTCCCTCTC			R	CTACTGGCTTCTAGGGCC	
<i>omp10</i>	F	TTGCTGCGTTGGACGGTTTC	1263	<i>am254</i>	F	ATGACAGAAGGGGAAAGCC	1182
	R	GCGAGATTCAACACCCAAAGAG			R	CTACCAAAATCTAGTTGATAC	
<i>omp11</i>	F	ATGAGCTTTGTAAGGTTCTGCCGTATC	1059	<i>am854</i>	F	ATGCTGCATCGTTGGTTAGC	711
	R	AGCCGGAAGTAAGCTATGTCCAT			R	CTATTAGGGCGACCA	
<i>omp12</i>	F	GGATCTATGATGAGGGCAACAAA	858	<i>am956</i>	F	ATGTGCTATGGTACTCGCATC	1605
	R	CCAATTCCCTCAAAAGT GAGC			R	TCACTTTCTGTAATACCTGACACA	
<i>omp13</i>	F	ATGGTTAAAGCAGGGCAGCATGGTTGAG	1059				
	R	CCCTAGGTAGCTTATAGCAGTCAA					

F: iniciador "forward"; R: iniciador "reverse"

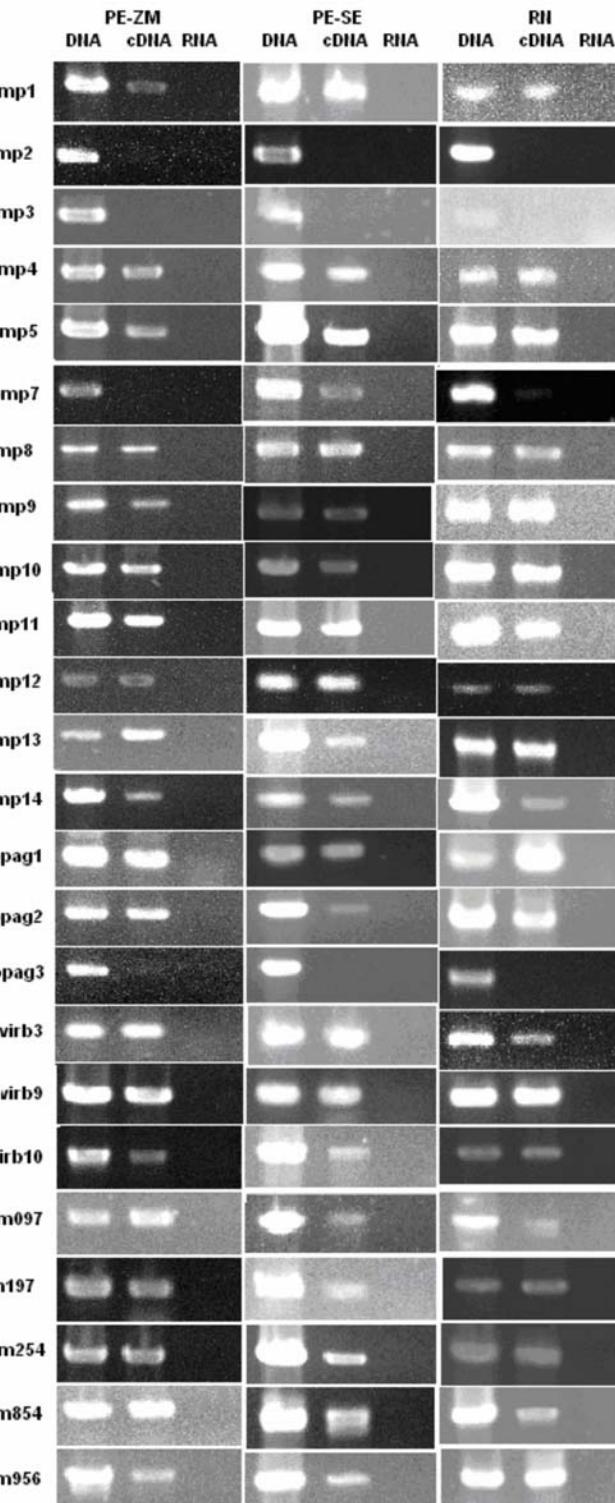


Figura 1. Detecção de transcritos de genes para proteínas de membrana de diferentes isolados brasileiros de *Anaplasma marginale*. PE-ZM= Pernambuco – Zona da Mata; PE-SE= Pernambuco – Sertão, RN = Rio Grande do Norte.

renças no padrão de transcrição entre os isolados americanos e os isolados brasileiros analisados, uma vez que, nos EUA, a transmissão biológica de *A. marginale* é realizada por carrapatos do gênero *Dermacentor* (KOCAN et al., 1981), enquanto

no Brasil o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o responsável por esse tipo de transmissão (ALONSO et al., 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M.; ARRELANO-SOTA, C.; CERESER, V.H.; CORDOVES, C.O.; GUGLIELMONE, A.A.; KESSLER, R.; MANGOLD, A.J.; NARI, A.; PATARROYO, J.H.S.; SOLARI, M.A.; VEJA, C.A.; VIZCAÍNO, O.; CAMUS, E. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and Caribbean. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 11, n. 3, p. 713-733, 1992.
- ARAÚJO, F.R.; MELO, V.S.P.; RAMOS, C.A.N.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H.; ALMEIDA, N.F.; ARAÚJO, G.S.; ALVES, L.C.; TORRES JUNIOR, R.A.A.; FRAGOSO, S.P.; ARAUCO, P.R.C.; BACA-NELLI, G.; OLIVEIRA, M.B.; SANTOS, L.R. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.
- BATEMAN, A.; CORIN, L.; DURBIN, R.; FINN, R.D.; HOLLICH, V.; GRIFFITHS-JONES, S.; KHANNA.A.; MARSHALL, M.; MOXON, S.; SONNHAMMER, E.L.; STUDHOLME, D.J.; YEATS, C.; EDDY, S.R. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, v. 32, supl. 1, p. 138-141, 2004.
- BRAYTON, K.A.; KAPPMAYER, L.S.; HERNDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; McGuIRE, T.C.; KNOWLES, D.P. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.
- BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Reviews Vaccines*, v. 5, n. 1, p. 95-101, 2006.
- BROWN, W. C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; McGuIRE, T. C.; TUO, W.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998a.
- BROWN, W. C.; ZHU, D.; SHKAP, V.; McGuIRE, T. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H. 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. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 11, p. 5414-5422, 1998b.
- KOCAN, K. M.; HAIR, J. A.; EWING, S. A.; STRATTON, L. G. Transmission the *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* Say. *American Journal of Veterinary Research*, v. 42, n. 1, p. 15-18, 1981.
- LÖHR, C. V.; BRAYTON, K. A.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; BARBET, A. F.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 11, p. 6005-6012, 2002.
- LOPEZ, J. E.; SIEMS, W. F.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; McGuIRE, T. C.; NORIMINE, J.; BROWN, W. C. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 12, p. 8109-8118, 2005.
- McGUIRE, T. C.; MUSOKE, A. J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG₁ and IgG₂: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*, v. 38, n. 2, p. 249-256, 1979.
- NOH, S. M.; BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; AGNES, J. T.; DARK, M. J.; BROWN, W. C.; BASZLER, T. V.; PALMER, G. H. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane protein. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 6, p. 3471-3479, 2006.
- PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K. M.; BROWN, W. C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today*, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.
- RIDING, G.; HOPE, M.; WALTISBUHL, D.; WILLADSEN, P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine*, v. 21, n. 17-18, p. 1874-1883, 2003.
- TEBELE, N.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.
- VIDOTTO, M.C.; McGuIRE, T.C.; McELWAIN, T.F.; PALMER, G.H.; KNOWLES, D.P. Jr. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.
- ZAUGG, J. L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, n. 3, p. 570-572, 1985.

Recebido em 01 de março de 2007.

Aceito para publicação em 09 de julho de 2007.