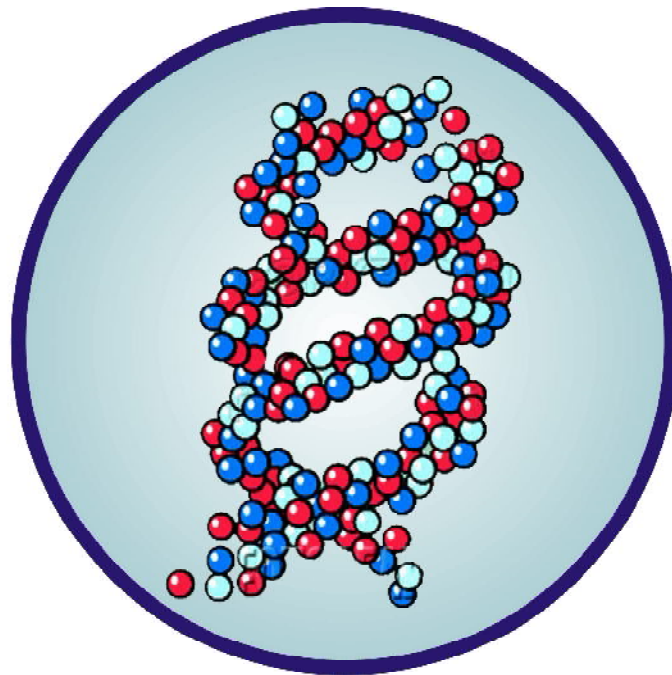


**Genômica e Proteômica de
Anaplasma marginale:
Contribuições para o
Controle da Riquetsia**



ISSN 1517-3747

Setembro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 161

Genômica e Proteômica de *Anaplasma marginale*: Contribuições para o Controle da Riquetsia

*Flávio Ribeiro de Araújo
Cleber Oliveira Soares
Gracia Maria Soares Rosinha
Carina Elisei
Cláudio Roberto Madruga
Stênio Perdigão Fragoso
Fernando Araripe Gonçalves Torres
Marcelo de Macedo Brígido
Maria Emilia Machado Telles Walter
Maria Sueli Soares Felipe
Nalvo Franco de Almeida Júnior
Saïd Sadique Adi
Célia Maria de Almeida Soares
Maristela Pereira
Spartaco Astolfi Filho
Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Thais de Andrade Farias
Ingrid Ieda Fernando de Souza
Rafael de Queiroz Prado*

Embrapa Gado de Corte

Campo Grande, MS

2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Capa: *Paulo Roberto Duarte Paes*

1ª edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte.

Genômica e proteômica de *Anaplasma marginale*: contribuições para o controle da riquetsia / Flávio Ribeiro de Araújo... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2006.

29 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 161).

Autores: Flávio Ribeiro de Araújo; Cleber Oliveira Soares; Gracia Maria Soares Rosinha; Carina Elisei; Cláudio Roberto Madruga; Stênio Perdigão Fragoso; Fernando Araripe Gonçalves Torres; Marcelo de Macedo Brígido; Maria Emília Machado Telles Walter; Maria Sueli Soares Felipe; Nalvo Franco de Almeida Júnior; Said Sadique Adi; Célia Maria de Almeida Soares; Maristela Pereira; Spartaco Astolfi Filho; Carlos Alberto do Nascimento Ramos; Thais de Andrade Farias; Ingrid Ieda Fernando de Souza; Rafael de Queiroz Prado.

1. Imunologia. 2. Bovino. 3. *Anaplasma marginale*. 4. Anaplasmoses. 5. Genoma. 6. Proteína. 7. Riquetsia - controle. I. Araújo, Flávio Ribeiro de. II. Soares, Cleber Oliveira. III. Rosinha, Gracia Maria Soares. IV. Elisei, Carina. V. Madruga, Cláudio Roberto. VI. Fragoso, Stênio Perdigão. VII. Torres, Fernando Araripe Gonçalves. VIII. Brígido, Marcelo de Macedo. IX. Walter, Maria Emília Machado Telles. X. Felipe, Maria Sueli Soares. XI. Almeida Júnior, Nalvo Franco. XII. Adi, Said Sadique. XIII. Soares, Célia Maria de Almeida. XIV. Pereira, Maristela. XV. Astolfi Filho, Spartaco. XVI. Ramos, Carlos Alberto do Nascimento. XVII. Farias, Thais de Andrade. XVIII. Souza, Ingrid Ieda Fernando de. XIX. Prado, Rafael de Queiroz. XX. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). XXI. Série.

CDD 636.0896079 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2006

Autores

Flávio Ribeiro de Araújo

Médico-Veterinário, Ph.D. em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flabio@cnpqg.embrapa.br

Cleber Oliveira Soares

Médico-Veterinário, Ph.D. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Bolsista do CNPq, cleber@cnpqg.embrapa.br

Gracia Maria Soares Rosinha

Engenheira-Agrônoma, Ph.D. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosinha@cnpqg.embrapa.br

Carina Elisei

Bióloga, Ph.D., Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional, Fundect-CNPq, elisei@cnpqg.embrapa.br

Cláudio Roberto Madruga

Médico-Veterinário, Ph.D. em Parasitologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Bolsista do CNPq, madruga@cnpqc.embrapa.br

Stênio Perdigão Fragoso

Biólogo, Ph.D., pesquisador do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, sfragoso@tecpa.br

Fernando Araripe Gonçalves Torres

Biólogo, Ph.D., professor da Universidade de Brasília, Brasília, DF, ftorres@unb.br

Marcelo de Macedo Brígido

Biólogo, Ph.D., professor da Universidade de Brasília, Brasília, DF, brigido@unb.br

Maria Emília Machado Telles Walter

Matemática, Ph.D., professora da Universidade de Brasília, Brasília, DF, mia@cic.unb.br

Maria Sueli Soares Felipe

Química, Ph.D., professora da Universidade de Brasília, Brasília, DF, msueli@unb.br

Nalvo Franco de Almeida Júnior

Matemático, Ph.D., professor da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, nalvo@pesquisador.cnpq.br

Said Sadique Adi

Cientista da Computação, Ph.D., professor da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, said@dct.ufms.br

Célia Maria de Almeida Soares

Bióloga, Ph.D., professora da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, celia@icb.ufg.br

Maristela Pereira

Farmacêutica-Bioquímica, Ph.D., professora da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, celia@mani@icb.ufg.br

Spartaco Astolfi Filho

Biólogo, professor da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, sastolfi@ufam.edu.br

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Médico-Veterinário, bolsista de Mestrado Fundect-CNPq

Thais de Andrade Farias

Bióloga, bolsista de Apoio Técnico Fundect-CNPq

Ingrid Ieda Fernando de Souza

Estudante de graduação em Biologia, bolsista de Iniciação Científica, Embrapa

Rafael de Queiroz Prado

Estudante de graduação em Biologia, bolsista de Iniciação Científica, Fundect-CNPq

Sumário

Resumo	9
Abstract.....	11
Introdução	12
Projetos genoma de <i>Anaplasma marginale</i>	14
Proteínas de membrana de <i>Anaplasma marginale</i>	16
Identificação de novas proteínas de membrana por análise proteômica	21
Outras contribuições da análise genômica para o controle da anaplasmosose	22
Genes com expressão diferencial nos hospedeiros de <i>Anaplasma marginale</i>	23
Referências Bibliográficas.....	24

Genômica e Proteômica de *Anaplasma marginale*: Contribuições para o Controle da Riquetsia

Resumo

A anaplasmoze bovina é causada pela riquetsia intra-eritrocítica *Anaplasma marginale*, responsável por importantes prejuízos econômicos, por causa da alta morbidade e mortalidade em rebanhos bovinos suscetíveis. A vacinação tem sido uma forma econômica e eficiente de controlar a enfermidade. No entanto, os métodos de imunização tradicionais apresentam efeitos adversos em algumas categorias de animais. Nas últimas décadas, os estudos sobre imunização contra *Anaplasma* concentraram-se nas proteínas de superfície MSP1a, 1b, 2, 3, 4 e 5. No entanto, até o momento, os resultados foram pouco promissores, apontando a necessidade de ampliar o conhecimento sobre o rol das proteínas de membrana da riquetsia e das relações estruturais entre elas. Nesse contexto, os estudos do genoma e do proteoma da riquetsia têm contribuído com essa finalidade. Pela análise genômica, 14 genes para novas proteínas de membrana externa foram identificados (*omp* 1-14), dentre os quais, *omp2*, *3* e *6* não são transcritos. Esses genes mostraram-se altamente conservados entre isolados da riquetsia. As proteínas OMP4, 7, 10 e 14 foram reconhecidas por soros de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*, mostrando potencial para desenvolvimento de imunógenos. Além disso, mediante análise proteômica, foi possível detectar novas proteínas de membrana, negligenciadas pela anotação genômica. Dentre

elas estão AM097 - *conjugal transfer protein*, AM956 - *PepA citosol* amino peptidase, AM254 - fator de alongação Tu e quatro proteínas de função desconhecida: AM127, 197, 387 e 854, as quais também foram reconhecidas por soros de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*.

Termos para indexação: *Anaplasma marginale*, bovino, genoma, proteoma, controle

Genomics and Proteomics of *Anaplasma marginale*: Contributions to the Control of the Rickettsia

Abstract

Bovine anaplasmosis is caused by the intraerithrocytic rickettsia Anaplasma marginale, which is responsible for important economic losses, due to morbidity and mortality in susceptible herds. Vaccination has been the most economical and efficient way to control anaplasmosis. Nevertheless, traditional methods of immunization show side effects in some animal categories. In the last decades, studies on immunization against Anaplasma has focused on the Major Surface Proteins 1a, 1b, 2, 3, 4, and 5. However, results have not been promising, pointing that a better understanding of the composition and the relationship of the protein set is necessary. In this context, a good contribution has come from the genomic and proteomic studies. The genomic sequencing revealed a set of 14 new genes for Outer Membrane Proteins (omp 1-14), from which omp2, 3, and 6 are not transcribed. These genes are highly conserved among isolates of the rickettsia. The proteins OMP4, 7, 10, and 14 are promising immunogens, as they were recognized by sera of cattle immunized with A. marginale membrane. Besides, the proteomic analysis of A. marginale revealed a set of membrane proteins that were negligenced by genome annotation. Among them AM097 - conjugal transfer protein, AM956 - PepA cytosol amine peptidase, AM254 – elongation factor Tu and four

unknown proteins AM127, 197, 387, and 854, were also recognized by sera of cattle immunized with A. marginale membrane.

Index terms: *Anaplasma marginale, bovine, genome, proteome, control*

Introdução

A anaplasmoze bovina é causada pela riquetsia intra-eritrocítica da família Anaplasmataceae, *Anaplasma marginale* (KOCAN et al., 2003). Essa espécie ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo (RIDING et al., 2003), sendo transmitida principalmente por carrapatos ixodídeos (KOCAN et al., 2003; RIKIHISA, 2003). No Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o único vetor biológico identificado (KESSLER; SCHENK, 1998).

A fase aguda da anaplasmoze bovina é caracterizada por altas riquetsemias ($> 10^9$ eritrócitos infectados por ml de sangue) (FRENCH et al., 1998). Os eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados por macrófagos, especialmente no baço, resultando em um quadro de anemia branda a severa e icterícia sem ocorrência de hemoglobinemia ou hemoglobinúria. Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia e morte, principalmente em animais acima de dois anos (AJAYI et al., 1978; KOCAN et al., 2003). Os animais que sobrevivem a essa fase permanecem persistentemente infectados, com baixas riquetsemias cíclicas, não detectáveis microscopicamente (10^4 a 10^6 eritrócitos infectados/ml de sangue), servindo como reservatórios para transmissão por carrapatos (KIESER et al., 1990; ERIKS et al., 1993).

A anaplasmoze bovina causa importantes prejuízos econômicos, principalmente por causa da alta morbidade e mortalidade em rebanhos bovinos suscetíveis. Essas perdas são avaliadas por diversos parâmetros, como redução de peso e de produção de leite, abortos, custos com tratamentos e mortalidade. No entanto, poucos estudos controlados foram conduzidos para determinar os prejuízos com anaplasmoze, destacando-se a estimativa de U\$ 875 milhões/ano na América Latina (BROWN, 1997). No Brasil, as perdas econômicas com a tristeza parasitária bovina (a qual inclui *A.*

marginale, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) são consideráveis, atingindo, segundo estimativas do Ministério da Agricultura, atualizadas por Grisi et al. (2002), 500 milhões de dólares anuais, nas quais *A. marginale* teria uma das principais participações. Em geral, esses estudos não contemplam um dos mais importantes impactos: a limitação do uso de raças européias (*Bos taurus*), sabidamente mais suscetíveis à anaplasmose, em programas de melhoramento genético nos países de clima tropical (KOCAN et al., 2003). Dessa forma, os esforços na busca de programas mais eficazes de controle dessa enfermidade são justificáveis.

A vacinação tem sido uma forma econômica e eficaz de controlar a anaplasmose bovina. No entanto, os métodos de imunização tradicionais, que utilizam *A. marginale* ou *A. centrale* provenientes de eritrócitos infectados, apresentam limitações de uso, como efeitos adversos em algumas categorias de animais (vacas prenhes, animais adultos), possibilidade de veiculação de agentes patogênicos (no caso da premunização), sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e conseqüente isoeritrólise neonatal em bezerros (BRIZUELA et al., 1998; KESSLER; SCHENK, 1998), razões pelas quais estudos para o desenvolvimento de novos imunógenos são necessários.

Nos últimos anos, os estudos sobre imunização contra *Anaplasma* concentraram-se na obtenção de frações antigênicas. Bovinos imunizados com corpúsculos iniciais ou membrana destes apresentaram significativa redução da anemia e da riquetsemia (MONTENEGRO-JAMES et al., 1991; TEBELE et al., 1991; RODRIGUÉZ et al., 2000). Nessa membrana, foram inicialmente identificadas seis proteínas principais de superfície (*Major Surface Proteins* - MSPs): MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER; McGUIRE, 1984; BARBET et al., 1987; OBERLE et al., 1988; TEBELE et al., 1991; OBERLE et al., 1993).

A despeito do fato de que a proteção contra anaplasmose pode ser adquirida pela imunização com organismos vivos ou pela membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*, os resultados da imunização com as MSPs individualmente, até o momento, foram pouco promissores.

Bovinos imunizados com MSP1 (heterodímero de MSP1a e MSP1b) ou MSP2 nativas foram parcialmente protegidos contra desafio homólogo ou heterólogo com *A. marginale* virulento (PALMER et al., 1986; PALMER et al., 1988; PALMER et al., 1989). No entanto, estudos com MSP1a nativa não conferiu proteção (PALMER; McELWAIN, 1995). Recentemente, demonstrou-se que a imunização com MSP2 nativa, associada com IL-12 ou CpG ODN 2006, adjuvantes que estimulam resposta Th1 em bovinos, também não estimulou resposta protetora contra desafio homólogo com *A. marginale* (ABBOTT et al., 2005).

Em experimentos realizados na Embrapa Gado de Corte com associação de MSP1a (região C-terminal) e MSP2 recombinantes e adjuvante CpG ODN 2006, não se verificou proteção contra desafio heterólogo, a despeito da significativa produção de IgG total contra as duas proteínas, e de IgG2 contra MSP1a (ARAÚJO, 2005).

Os resultados dos experimentos conduzidos até o momento sobre imunização contra anaplasiose com antígenos de subunidade apontam para a necessidade de ampliar o conhecimento sobre o rol das proteínas de membrana de *A. marginale*, bem como sobre as relações estruturais entre elas. Essa revisão abordará como os estudos do genoma e do proteoma da riquetsia têm contribuído com essa finalidade.

Projetos genoma de *Anaplasma marginale*

No Brasil, o genoma do isolado Pernambuco - Zona da Mata de *A. marginale* está sendo seqüenciado. Corpúsculos iniciais da riquetsia foram parcialmente purificados a partir de sangue de bovino com 87% de riquetsemia. Para tanto, o sangue foi centrifugado e a camada de leucócitos removida. Após sonicação para rompimento das hemácias e leucócitos restantes, realizou-se tratamento com DNase, para degradação de DNA bovino. Após sucessivas lavagens com Tris-EDTA por centrifugação para retirada da DNase, o DNA de *A. marginale* foi obtido, utilizando *kit* comercial. Para verificar possíveis contaminações com DNA bovino, o DNA extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase -

PCR para amplificação de um exon de 110 pb que codifica a cadeia beta do hormônio folículo estimulante - FSH de *Bos indicus*. Em seguida, o DNA foi nebulizado e sofreu modificação enzimática das extremidades dos fragmentos gerados para torná-los abruptos e serem clonados em vetor *pUC18* digerido com *SmaI* e desfosforilado. Realizou-se transformação de *Escherichia coli* XL1-blue por eletroporação e seleção em placas de LB ampicilina, com IPTG e X-gal. Os clones recombinantes estão sendo seqüenciados em ambas as direções no Instituto de Biologia Molecular do Paraná, na Universidade de Brasília, na Universidade Federal de Goiás e na Universidade Federal do Amazonas.

Até o momento, foram seqüenciados 3.754 *reads* que, após lidos pelo programa de *base-calling* PHRED (versão 0.020425, www.phrap.org) e terem sofrido a remoção das seqüências de vetores e contaminações pelo programa *cross-match* (versão 0.990319, www.phrap.org), foram agrupados com o uso do programa PHRAP (versão 0.090329, www.phrap.org), resultando em um total de 1.756 grupos, dos quais 811 são *contigs* (grupos contendo pelo menos dois *reads*) e 945 *singlets* (*reads* isolados que não se agruparam). Esse primeiro procedimento de montagem será repetido posteriormente, após cada aumento considerável de *reads* seqüenciados.

O genoma do isolado norte-americano Saint Maries de *A. marginale* foi clonado em cromossomo artificial bacteriano, seqüenciado e anotado (BRAYTON et al., 2005), apresentando 1.197.687 pares de bases (pb) e um conteúdo de C-G de 49,8%. O genoma possui uma alta densidade de genes codificantes (86%), típica de bactérias intracelulares que possuem um mínimo de genes necessários para manutenção da vida em nichos ambientais particulares. Foram encontradas 949 seqüências de DNA codificantes, com o tamanho médio de 1.077 pb, um único operon de genes de RNA ribossomais e 37 genes de RNA transportadores, representando todos os 20 aminoácidos.

Acredita-se que ocorreu evolução reduativa do genoma dessa riquetsia, a partir de um precursor maior. Essa evolução seria resultante de mutações

iniciais, levando à perda da função de genes não essenciais para a sobrevivência intracelular, seguida de progressivo acúmulo de mutações e eventual deleção gênica (ANDERSSON et al., 1998; PALMER, 2002).

Proteínas de membrana de *Anaplasma marginale*

Um dos aspectos mais relevantes da análise genômica de *A. marginale* foi a descoberta de novas proteínas de membrana da riquetsia. Pela anotação do genoma do isolado americano, poucas seqüências puderam ser classificadas como codificantes para proteínas de membrana externa (*outer membrane protein* - OMP). E a maioria delas estava inserida nas superfamílias *msp1* e *msp2* (BRAYTON et al., 2006), as quais serão enfocadas com maior ênfase nesta revisão.

Na superfamília *msp1* estão as proteínas com identidade com o complexo heterodimérico MSP1 (MSP1a e MSP1b). O gene *msp1a* está presente em cópia única, porém apresenta diferenças entre isolados, causadas pelo número variável e seqüências distintas de blocos repetitivos de nucleotídeos (86–89 pb) (PALMER et al., 2001). No genoma do isolado Saint Maries, foram identificadas também três seqüências codificantes associadas a *msp1*, tendo similaridade estrutural com a porção C-terminal de MSP1a, sendo designadas proteínas *MSP1a-like* (MLP 2, 3 e 4) (BRAYTON et al., 2005). MLP2 e MLP4 têm, respectivamente, 30% e 37% de identidade com a região C-terminal de MSP1a, respectivamente, enquanto MLP3 não tem identidade considerável.

A MSP1b é codificada por uma pequena família de cinco genes, sendo dois completos e três parciais (BRAYTON et al., 2005). Essa estrutura foi similar nos isolados Saint Maries e Flórida, porém as seqüências dos genes não foram idênticas entre isolados, sendo de 95% para *msp1b-1*, 77% para *msp1b-2* (genes completos) e 99% para *msp1b pg1*, 28% para *msp1b pg2* e 3,91% para *msp1b pg3* (*pg* = genes parciais). Não se sabe até o momento se os genes parciais são pseudogenes funcionais, que permitiriam uma variação antigênica em MSP1b (BRAYTON et al., 2005).

A superfamília *msp2* foi criada com base na identidade das seqüências com as proteínas de superfície MSP2, MSP3 e MSP4, previamente conhecidas, que formam a base para a família PFAM 01617. As duas proteínas mais imunodominantes da superfície de *A. marginale*, MSP2 e MSP3, possuem a capacidade de variar seu rol de epitopos, justamente pela recombinação de pseudogenes inteiros ou fragmentos desses no sítio de expressão único de cada proteína, por conversão gênica (BRAYTON et al., 2002).

A análise dos diversos transcritos que codificam a MSP2 mostrou uma região central hipervariável - RCH única, de aproximadamente 246 nucleotídeos no isolado Flórida de *A. marginale*, flanqueada por regiões N e C terminais altamente conservadas. A variação na região central resultou de inserções, deleções e substituições de nucleotídeos. Estrutura semelhante também foi identificada em *Anaplasma phagocytophilum*, com homologia nas regiões N e C terminais de 96% e 87%, respectivamente (FRENCH et al., 1999); e em *A. centrale*, com pelo menos quatro epitopos T CD4⁺ comuns entre essa espécie e *A. marginale* (SHKAP et al., 2002).

Durante cada ciclo de riquetsemia, a cada seis a oito semanas, ocorre a emergência de *A. marginale* expressando variantes distintas de MSP2, contendo epitopos imunogênicos que induzem a produção de anticorpos específicos durante a infecção persistente da riquetsia. Acredita-se que essa variação antigênica é um mecanismo de evasão da resposta imune (FRENCH et al., 1999). A variação antigênica de MSP2 também ocorre em *A. marginale* na glândula salivar de carrapatos *Dermacentor* (RURANGIRWA et al., 2000; FUENTE et al., 2001), demonstrando que ocorre pressão de seleção para variação sobre MSP2 no hospedeiro invertebrado, independentemente do sistema imune do bovino.

Os mecanismos de variação genética em *msp2* estão sendo intensamente estudados. BRAYTON et al. (2001) demonstraram que ocorre recombinação de pseudogenes inteiros de *msp2* em um sítio de expressão único para gerar novas variantes antigênicas. Essa recombinação constitui um segundo nível de variação, no qual pequenos segmentos de

pseudogenes se recombinam no sítio de expressão por conversão gênica (BRAYTON et al., 2002).

A despeito da semelhança estrutural entre *msp2* de *A. marginale* e de *A. phagocytophilum* (*p44*), o mecanismo de variação antigênica é distinto, uma vez que nessa última espécie apenas ocorre conversão de pseudogenes inteiros, incluindo regiões flanqueando a porção central hipervariável, no sítio único de expressão do gene (LIN et al., 2003). O número de variantes de *msp2* necessário para garantir evasão do sistema imune por *A. phagocytophilum* parece advir do grande número de parálogos de *msp2* no genoma dessa riquetsia (mais de 80) (LIN et al., 2003).

Os ortólogos de *msp2* nos membros do gênero *Ehrlichia*, *E. ruminantium*, *E. canis* e *E. chaffeensis* (OHASHI et al., 1998; van HEERDEN et al., 2004) são arrançados como genes completos em grupos repetitivos em um (*E. ruminantium*, *E. chaffeensis*) ou dois (*E. canis*) *loci*, contendo 16–25 parálogos. Ocorre sintenia entre o arranjo desses genes em *Ehrlichia* sp. e o operon de *msp2*, tanto em *A. marginale* como em *A. phagocytophilum* (LÖHR et al., 2004). No entanto, os mecanismos de geração de variação antigênica nessas proteínas de membrana são bem distintos, uma vez que as espécies de *Ehrlichia* utilizam múltiplos genes dos grupos repetitivos (OHASHI et al., 1998; van HEERDEN et al., 2004), enquanto *A. marginale* e *A. phagocytophilum* usam mecanismos de recombinação. Uma possível explicação para a evolução desses diferentes mecanismos pode ser o gene *mutL*, que codifica para uma enzima envolvida no reparo de *mismatch*. Em *A. marginale*, um número variável de trechos de resíduos G pode resultar algumas vezes em alterações estruturais no gene que codifica a enzima. Dessa forma, podem ocorrer altas taxas de mutação e recombinação (BRAYTON et al., 2005).

No genoma do isolado Saint Maries de *A. marginale*, foram detectados sete pseudogenes funcionais para *msp2*. Esse gene é transcrito como parte de um operon de quatro genes, sendo os três outros denominados OpAGs (*Operon Associated Genes*) 1 a 3 (LÖHR et al., 2002). OpAG2 e OpAG3 também pertencem à família PFAM01617 de antígenos de superfí-

cie (BRAYTON et al., 2005). Os membros desse operon possuem um padrão diferenciado de expressão, já que *opag1* parece não ser traduzido; *opag2* e *msp2* são expressos por *A. marginale* em eritrócitos de bovinos e nas células intestinais e da glândula salivar do ixodídeo; e *opag3* é expresso apenas em eritrócitos (LÖHR et al., 2002). Nas proteínas codificadas por esse operon, excetuando-se MSP2, há um mínimo polimorfismo, sendo identificada uma pressão de seleção de conservação apenas para a seqüência de OpAG3 (alta conservação na seqüência protéica e moderada variação de nucleotídeos), ao contrário da pressão para variação que ocorre com MSP2 (LÖHR et al., 2004).

No isolado Saint Maries, os genes *omp1* e *omp14* estão presentes em cópia única, enquanto o restante dos *omps* estão dispostos em três grupos, em diferentes *loci*: (1) *omp2-5* estão posicionados perto do operon *msp2*, com *omp4/ omp5* e *omp2/omp3* arranjados em seqüência; (2) *omp6-10*; e (3) *omp11-13* (BRAYTON et al., 2005).

Com exceção de *omp2*, *omp3* e *omp6*, os quais são provavelmente pseudogenes, os demais *omps* são transcritos em eritrócitos bovinos infectados com *A. marginale*, no intestino e glândula salivar de carrapato, e em linhagem celular IDE8 de carrapato. OMPs 1, 4, 7, 8, 9 e 11 são expressos como proteínas em eritrócitos bovinos infectados com *A. marginale*. No entanto, em células de carrapato, a expressão das proteínas OMPs 1, 4, 7, 8, 9 é reduzida e, no caso de OMP11, ausente (NÖH et al., 2006).

O restante dos membros da superfamília *msp2* corresponde a pequenos genes denominados *orfX* (12 cópias no isolado Saint Maries) e *orfY* (sete cópias no isolado Saint Maries) (MEEUS et al., 2003). Esses genes têm um peptídeo sinal que apresenta identidade com MSP3, porém, no restante da seqüência, não se assemelham aos membros da família PFAM01617. Foram incluídos na superfamília *msp2* em virtude de sua relação espacial com *msp2* e *msp3*: geralmente são encontrados flanqueando um pseudogene de *msp2* ou de *msp3*, e são parte do sítio de expressão de *msp3*, sendo transcritos como parte do operon *msp3* (MEEUS et al., 2003).

Um sistema de secreção tipo IV foi identificado no genoma do isolado Saint Maries, o qual está arranjado como em *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* (OHASHI et al., 2002) e em *E. ruminantium* (COLLINS et al., 2005), com um operon contendo *sodB*, *virB3*, *virB4*, e *virB6* e outro com *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* e *virD4*. O gene *virB6* é seguido por três parálogos, e há também uma cópia adicional de *virB8* e *virB4* não associada a outros genes do sistema de secreção tipo IV (BRAYTON et al., 2005).

Como esses genes estão possivelmente ligados a transporte de moléculas efetoras relacionadas com a virulência, uma linha que pode ser explorada no desenvolvimento de novos imunógenos é o *knockout* deles para possível atenuação de *A. marginale*.

Um dos pré-requisitos desejáveis para uma proteína candidata a imunógeno é a conservação do gene que a codifica. Dessa forma, a conservação dos genes de OMPs e de sistema de secreção tipo IV está sendo avaliada na Embrapa Gado de Corte, em diferentes isolados brasileiros da riquetsia. Até o momento, *omp1*, *omp4*, *omp6*, *virB3*, *virB8* e *sodB* foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico dos isolados Pernambuco - Agreste, Pernambuco - Sertão, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, obtidos durante a fase aguda da infecção. Em seguida, foram clonados em plasmídeo pGEM-T, seqüenciados, montados e alinhados. Foi possível observar um alto grau de conservação nos fragmentos seqüenciados dos genes, entre os isolados brasileiros, e também com relação ao isolado Saint Maries. A Fig. 1 mostra um trecho do alinhamento múltiplo obtido de *virB8*.

Confirmando os dados obtidos nos isolados brasileiros de *A. marginale*, a análise das seqüências de *omp1-14* nos isolados Saint Maries e Flórida também revelou alto grau de conservação, nas fases aguda e crônica da infecção em bovinos e durante a passagem por carrapatos (NÖH et al., 2006).

Não há dados de imunoproteção conferida pelas novas proteínas de membrana identificadas, no entanto, soros de bovinos imunizados com

membrana de *A. marginale* reconheceram OMP4, OMP7, OMP10, OMP14, OpAG2, VirB9, e VirB10 (LOPEZ et al., 2005).

```

VIRB8_RS      CGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
VIRB8_PR      GGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
VIRB8_SAINTE_MARIES  CGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
VIRB8_PE_SER  GGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
VIRB8_MS      GGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
VIRB8_RN      CGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
VIRB8_PE_AG   GGCCTGAGGGCTTCCTAGGACCTATCCAGTTCCGAACTGGCTATAAGTCTCCTGGGAGG 30C
*****

VIRB8_RS      AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
VIRB8_PR      AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
VIRB8_SAINTE_MARIES  AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
VIRB8_PE_SER  AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
VIRB8_MS      AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
VIRB8_RN      AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
VIRB8_PE_AG   AGAGTAACCTCACCTTAGTGTAAIAGTGTACTGGAAATGTTGGGATCATACAGCTCCC 36C
*****

VIRB8_RS      TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
VIRB8_PR      TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
VIRB8_SAINTE_MARIES  TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
VIRB8_PE_SER  TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
VIRB8_MS      TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
VIRB8_RN      TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
VIRB8_PE_AG   TCGCCCGCACATACTCAATTATGAAGTAATTACCCAAGACCTCATCAGCGGAGTACTGCT 42C
*****
    
```

Fig. 1. Trecho do alinhamento múltiplo de *virB8* de diferentes isolados brasileiro e americano (Saint Maries) de *Anaplasma marginale*.

Identificação de novas proteínas de membrana por análise proteômica

Mediante a separação eletroforética bidimensional da membrana da riquetsia e análise por espectrometria de massa das proteínas que reagiram com os soros (IgG e IgG2) de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*, foi possível detectar novas proteínas de membrana, negligenciadas pela anotação genômica. Dentre elas estão: AM097 - *conjugal transfer protein*, AM956 - *PepA citosol* aminopeptidase, AM254 - fator de alongação Tu e quatro proteínas de função desconhecida - AM197, AM854, AM127, AM387 (LOPEZ et al., 2005).

Outras contribuições da análise genômica para o controle da anaplasmoze

Uma outra linha de interesse, abordando genômica da riquetsia, é a identificação de genes específicos de *A. marginale* (isolado brasileiro), quando comparados com os genes do isolado de Saint Maries, e vice-versa. A descoberta de tais genes pode gerar informações para a identificação de proteínas de interesse. Essas comparações foram iniciadas, mas ainda não resultaram em informações significativas, dada a quantidade insuficiente de *reads* seqüenciados, que leva a uma montagem de difícil anotação.

Em comparações preliminares, feitas entre os 811 *contigs* obtidos na montagem inicial do isolado brasileiro de *A. marginale* e as proteínas preditas do isolado de Saint Maries, usando o pacote de ferramentas denominado EGG (ALMEIDA, 2002), foram encontrados 297 *Bidirectional Best Hits* (BBHs). Um BBH entre dois genes acontece quando um encontra o outro (reciprocamente) como *hit* de similaridade, dados os parâmetros de similaridade definidos pelo usuário. Nesse caso, usaram-se os programas Blastx e tBlastn (ALTSCHUL et al., 1997) para a determinação dos *hits*, com *e-value* e-5. Dentre os BBHs encontrados, foram detectadas seis OMPs:

- gi|56417133|ref|YP_154207.1| *outer membrane protein* [*Anaplasma arginale* str. St. Maries].
- gi|56417180|ref|YP_154254.1| *outer membrane protein 5* [*Anaplasma marginale* str. St. Maries].
- gi|56417246|ref|YP_154320.1| *outer membrane protein 13* [*Anaplasma marginale* str. St. Maries].
- gi|56417086|ref|YP_154160.1| *outer membrane protein* [*Anaplasma marginale* str. St. Maries].
- gi|56417221|ref|YP_154295.1| *outer membrane protein 9* [*Anaplasma marginale* str. St. Maries].
- gi|56417222|ref|YP_154296.1| *outer membrane protein 10* [*Anaplasma marginale* str. St. Maries].

A Fig. 2 mostra uma possível ancoragem dos *contigs* do isolado brasileiro no cromossomo completo do isolado de Saint Maries, baseada em alinhamentos locais, reportados pelo programa Blastn. A nebulosidade do gráfico evidencia a falta de uma cobertura adequada do genoma de isolado brasileiro, dado o pequeno número de *reads* já seqüenciados. Essa estratégia pode ser útil futuramente, na determinação de trechos importantes a serem seqüenciados do genoma do isolado brasileiro de *A. marginale*, ainda incompleto.

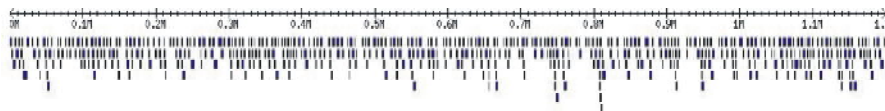


Fig. 2. Ancoragem prévia dos *contigs* do isolado brasileiro de *Anaplasma marginale* no cromossomo do isolado americano (Saint Maries) da riquetsia.

Genes com expressão diferencial nos hospedeiros de *Anaplasma marginale*

Um outra linha de interesse, abordando genômica da riquetsia, é a identificação de genes determinantes da transmissão. Com o sequenciamento dos genomas de outras riquetsias transmitidas por carrapato, das famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, é possível comparar genes e vias únicas de espécies transmitidas por carrapatos (ex. *A. marginale*, *Rickettsia conorii* e *E. ruminantium*), ausentes no genoma de espécies não transmitidas por carrapatos (ex. *Wolbachia pipientis*). Uma análise preliminar dessa natureza revelou genes de proteínas de membrana da família PFAM (BRAYTON et al., 2005), as quais, por serem de superfície, são alvos para o desenvolvimento de vacinas.

Referências Bibliográficas

- ABBOTT, J. R.; PALMER, G. H.; KEGERREIS, K. A.; HETRICK, P. F.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. Rapid and long-term disappearance of CD4+ T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 11, p. 6702-6715, 2005.
- AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 25, p. 76-81, 1978.
- ALMEIDA JUNIOR, N. F. **Tools for genome comparison**. 2002. Tese (Doutorado) - Instituto de Computação, Unicamp, Campinas, 2002.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSSON, S. G.; ZOMORODIPOUR, A.; ANDERSSON, J. O.; SICHERITZ-PONTEN, T.; ALSMARK, U. C.; PODOWSKI, R. M.; NASLUND, A. K.; ERIKSSON, A. S.; WINKLER, H. H.; KURLAND, C. G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. **Nature**, London, v. 396, n. 6707, p. 133-140, 1998.
- ARAÚJO, F. R. **Avaliação das proteínas recombinantes MSP1a e MSP2 de *Anaplasma marginale*, associadas a oligonucleotídeo CpG 2006 como adjuvante, como imunógenos contra a anaplasmoze bovina**. 2005. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.

BRAYTON, K. A.; KAPPEMEYER, L. S.; HERNDON, D.R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Jr. 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 of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 7, p. 4130-4135, 2001.

BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; BROWN, W. C. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 5, n. 1, p. 95-101, 2006.

BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; LUNDGREN, A.; YI, J.; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 1151-1159, 2002.

BRIZUELA, C. M.; ORTELLADO, C. A.; SANABRIA, E.; TORRES, O.; ORTIGOSA, D. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 76, p. 27-41, 1998.

BROWN, C. G. Dynamic and impact of tick-borne diseases of cattle. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 29, p. 1-3, 1997

COLLINS, N. E.; LIEBENBERG, J.; DE VILLIERS, E. P.; BRAYTON, K. A.; LOUW, E.; PRETORIUS, A.; FABER, F. E.; VAN HEERDEN, H.; JOSEMANS, A.; VAN KLEEF, M.; STEYN, H. C.; VAN STRIJP, M. F.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; MAILLARD, J. C.; BERTHIER, D.; BOTHA, M.; JOUBERT, F.; CORTON, C. H.; THOMSON, N. R.; ALLSOPP, M. T.; ALLSOPP, B. A. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 3, p. 838-843, 2005.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

FRENCH, D. M.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 11, p. 5834-5840, 1999.

FRENCH, D. M.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

FUENTE, J., GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 145-153, 2001.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 125, p. 8-10, 2002.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, 1998. 157p.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p. 698-712, 2003.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 9, p. 5324-5331, 2003.

LÖHR, C. V.; BRAYTON, K. A.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H. Characterization of the *Anaplasma marginale* *msp2* locus and its synteny with the *omp1/p30* loci of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. **Gene**, Amsterdam, v. 325, p. 115-121, 2004.

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**, Bethesda, 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**, Bethesda, v. 73, n. 12, p. 8109-8118, 2005.

MEEUS, P. F.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p.633-643, 2003.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M. A.; BENITEZ, M. T.; LEON, E.; BAEK, B. K.; GUILLEN, A. T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 77, n. 2, p. 93-101, 1991.

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 proteins. **Infection and Immunity**, Bethesda, 74, n. 6, p. 3471-3479, 2006.

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; MCGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.

OHASHI, N.; UNVER, A.; ZHI, N.; RIKIHISA, Y. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 9, p. 2671-2680, 1998.

OHASHI, N.; ZHI, N.; LIN, Q.; RIKIHISA, Y. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 4, p. 2128-2138, 2002.

PALMER, G. H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 1-8, 2002.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 57, n. 11, p. 3666-3669, 1989.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. **Science**, Washington, v. 231, p. 1299-1302, 1986.

PALMER, G. H.; McELWAIN, T. F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 57, p. 233-253, 1995.

PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 133, n. 2, p. 1010-1015, 1984.

PALMER, G. H.; OBERLE, S. M.; BARBET, A. F.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1526-1531, 1988.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 631-635, 2001.

RIDING, G.; HOPE, M.; WALTISBUHL, D.; WILLADSEN, P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, p. 1874-1883, 2003.

RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 990, p. 548-555, 2003.

RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA ORTIZ, M. A.; HERNANDEZ SALGADO, G.; SANTOS CERDA, N. A.; ABOYTES TORRE, R.; CANTO ALARCON, G. J. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 239-252, 2000.

RURANGIRWA, F. R.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Strain diversity in major surface protein 2 expression during tick transmission of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 68, n. 5, p. 3023-3027, 2000.

SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 642-648, 2002.

TEBELE, N., MCGUIRE, T. C., PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

VAN HEERDEN, H.; COLLINS, N. E.; BRAYTON, K. A.; RADEMEYER, C.; ALLSOPP, B. A. Characterization of a major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia ruminantium*. **Gene**, Amsterdam, v. 330, p. 159-168, 2004.

Embrapa

Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**