



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes PLD y CP40, factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* con potencial inmunogénico”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**P R E S E N T A**

**Lic. En Microbiología Maria Carla Rodríguez Domínguez**

**COMITÉ DE TUTORES**

Tutor Académico: Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez

Tutores Adjunto: Dr. en C. Jorge Antonio Varela Guerrero

Dr. en C. Efrén Díaz Aparicio



El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México. Octubre, 2020

*¡A mi familia, mi mayor tesoro!  
Gracias por todo su amor y apoyo incondicional*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que me ayudaron a construir este proyecto, no solo profesional si no de vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca y soporte económico.

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), por todo el apoyo brindado y disposición de las instalaciones.

Gracias a los siguientes proyectos de investigación se contó con el financiamiento económico para el desarrollo de la tesis y bajo la responsabilidad de los doctores Roberto Montes de Oca Jiménez y Jorge Varela Guerrero. Identificación de genes de patogenicidad de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y desarrollo de una bacterina multicomponente. Clave: UAEM 3806/2014/CIA y Obtención de proteínas recombinantes PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Clave: 4797/2019CIB.

Le ofrezco las gracias a mi comité tutorial, en especial a mis asesores el Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez y el Dr. Jorge Antonio Varela Guerrero, por su ayuda incondicional, su guía, y soporte brindado. De quienes he aprendido y adquirido nuevos conocimientos, muchas gracias por su paciencia y dedicación.

A todos los profesores del posgrado por su entrega y dedicación para con la enseñanza.

A mis amigos y compañeros del posgrado por sus consejos, platicas y buenos momentos compartidos.

A mi hermosa familia por ser mi guía e inspiración.

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIAS</b>	I
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	II
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VI
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	VIII
<b>RESUMEN</b>	IX
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
II. 1 PRODUCCIÓN DE PEQUEÑOS RUMIANTES	3
II. 2 LINFADENITIS CASEOSA: SITUACIÓN MUNDIAL	4
II.2.1 Asia	4
II.2.2 Australia	4
II.2.3 Europa	5
II.2.4 América	5
II.2.5 México	7
II.3 <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i>	7
II.3.1 Características generales	7
II.3.2 <i>C. pseudotuberculosis</i> y hospederos	9
II.3.3 Transmisión	10
II.3.4 Identificación y diversidad genética	11
II.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>C. pseudotuberculosis</i>	15
II.4.1 Exotoxina Fosfolipasa D (PLD)	20
II.4.2 Endoglicosidasa CP40	22
II.4.3 Proteínas Secretadas PLD y CP40	25
II.5 PATOGÉNESIS Y MECANISMOS DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE	25
II.5.1 Adhesión celular y multiplicación intracelular	28
II.5.2 Mecanismos de evasión del sistema inmune	29
II.5.3 Diseminación en tejidos y órganos	32
II.5.4 Respuesta del Sistema Inmune	34

---

II.6 TRATAMIENTO	38
II.7 VACUNAS LAC	39
II.7.1 Vacunas comerciales	39
II.7.2 Vacunas experimentales: Inactivadas y toxoides	42
II.7.3 Vacunas atenuadas	44
II.7.4 Vacunas de ADN	47
II.7.5 Vacunas de Subunidades proteicas recombinantes	48
II.8 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. coli</i>	54
II.9 VACUNOLOGÍA INVERSA, HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	58
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	64
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	66
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	67
<b>V.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	67
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	68
<b>VII. RESULTADOS: PUBLICACIONES</b>	79
<b>VII. RESULTADOS</b>	81
VII.1 Identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i> aislado de origen mexicano (2J-L)	81
VII.2 Amplificación por PCR de los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L)	82
VII.3 Clonaje de los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i> en el plásmido replicativo pGEM-T Easy	82
VII.4 Análisis de la secuencia de los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L)	84
VII.5 Análisis filogenético del aislado 2J-L basado en los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i>	86
VII.6 Análisis de la secuencia de PLDr y CP40r de <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L)	87
VII.7 Características físico-químicas de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	89
VII.8 Modelado de la estructura 3D de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	91
VII.9 Análisis de la estructura secundaria de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	94
VII.10 Obtención de cepas <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos recombinantes pET28a- <i>pld</i> y pET28a- <i>cp40</i>	97
VII.11 Expresión de las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	98

---

VII.12 Caracterización <i>in silico</i> de las propiedades inmunogénicas de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	99
VII.12.1 Predicción de Epítomos de células B	99
VII.12.2 Predicción de epítomos de células T, MHC I, para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	110
VII.12.3 Potencialidades de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como candidatos vacunales	111
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	113
VIII.1 Identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i> aislado 2J-L mediante PCR Multiplex	113
VIII.2-3 Amplificación de los genes y clonaje en el plásmido pGEM-T Easy	115
VIII.4-5 Análisis de la secuencia los genes <i>pld</i> - <i>cp40</i> y estudio filogenético de <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L)	115
VIII.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	117
VIII.6.1 Fosfolipasa D, PLD	117
VIII.6.2 Endoglicosidasa, CP40	120
VIII.7 Características físico-químicas de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	122
VIII.8-9 Predicción de la estructura de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	124
VIII.8-9.1 Predicción de la estructura de PLDr 2J-L	124
VIII.8-9.2 Predicción de la estructura de CP40r 2J-L	127
VIII.10-11. Obtención de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en células de <i>E. coli</i>	130
VIII.12 Caracterización <i>in silico</i> de las propiedades inmunogénicas de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L	132
VIII. 12.1 Epítomos de células B	132
VIII. 12.2 Epítomos de células T	134
VIII. 12.3 Potencialidades de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como candidatos vacunales	137
<b>IX.CONCLUSIONES</b>	140
<b>X.RECOMENDACIONES</b>	142
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	143

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Variedad de hospederos de <i>C. pseudotuberculosis</i> .	10
<b>Figura 2.</b> Descripción de residuos de aminoácidos involucrados en el sitio catalítico de enzimas SMDasa.	21
<b>Figura 3.</b> Reclasificación de CP40 como endoglicosidasa.	23
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la estructura cristalográfica de la endoglicosidasa EndoT de <i>Hypocrea jecorina</i> .	24
<b>Figura 5.</b> Manifestaciones de la Linfadenitis caseosa, formación de abscesos cutáneos y viscerales	26
<b>Figura 6.</b> Esquema del mecanismo de patogénesis de la infección natural por <i>C. pseudotuberculosis</i> en ovejas.	28
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la infección de los macrófagos por <i>C. pseudotuberculosis</i> .	32
<b>Figura 8.</b> Plásmidos empleados en el clonaje de los genes y la expresión de las proteínas.	71
<b>Figura 9.</b> Cultivo de <i>C. pseudotuberculosis</i> .	81
<b>Figura 10.</b> Identificación molecular de <i>C. pseudotuberculosis</i> 2J-L mediante la amplificación de los genes <i>16S rRNA</i> , <i>rpoB</i> y <i>pld</i> por PCR Multiplex. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v).	81
<b>Figura 11.</b> Amplificación de los genes <i>pld</i> (A) y <i>cp40</i> (B) mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v).	82
<b>Figura 12.</b> Cultivo en medio selectivo agar LBA-IPTG-Xgal de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con los reacciones de ligazón (plásmido pGEM-T Easy y genes de interés).	82
<b>Figura 13.</b> Purificación de plásmidos a partir de colonias blancas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con las reacciones de ligazón. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v).	83
<b>Figura 14.</b> Digestión enzimática de los plásmidos pGEM-T Easy modificados con los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v).	83
<b>Figura 15.</b> Alineamiento de las secuencias de los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i> del aislado 2J-L en comparación con las secuencias de las cepas mexicanas informadas en la base de datos del GenBank, mediante el empleo del programa BLAST.	84
<b>Figura 16.</b> Árboles filogenéticos construidos mediante el empleo del programa MEGAX con el método UPGMA, basado en las secuencias de (A) <i>pld</i> y (B) <i>cp40</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L), en comparación con secuencias relacionadas reportadas en la base de datos GenBank.	86

FIGURAS	PÁGINA
<b>Figura 17.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) de <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L), en comparación con las secuencias de las proteínas de las cepa mexicana MEX1 (CP017711.1), MEX2 (CP046644.1), MEX9 (CP014543.1), MEX25 (CP013697.1), MEX29 (CP016826.1) y secuencias tipo para ambas proteínas, mediante el empleo de ClustalW.	87-88
<b>Figura 18.</b> Predicción de la estructura 3D de PLDr 2J-L.	91-92
<b>Figura 19.</b> Predicción de la estructura 3D de CP40r 2J-L	93
<b>Figura 20.</b> Predicción de la estructura secundaria de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B)	95-96
<b>Figura 21.</b> (A) Cultivo de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con el plásmido pET28a, en medio de cultivo agar LBK. (B) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v). Purificación del plásmido de expresión pET28a.	97
<b>Figura 22.</b> Identificación de los plásmidos recombinantes pET28a- <i>pld</i> y pET28a- <i>cp40</i> mediante digestión con las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> . Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v).	98
<b>Figura 23.</b> Expresión de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a- <i>pld</i> y pET28a- <i>cp40</i> . El cultivo se realizó en 300mL de medio LBK, con IPTG 1mM como inductor de la expresión de las proteínas. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, para la resolución de las proteínas con tinción de azul de Coomassie.	99
<b>Figura 24.</b> Epítomos lineales de células B y estructura secundaria de los epítomos de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) predichos por Bepipred 2.0.	101
<b>Figura 25.</b> Epítomos de células B para PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) de <i>C. pseudotuberculosis</i> aislado 2J-L, mediante el empleo de IEDB.	102
<b>Figura 26.</b> Visualización esquemática de los epítomos lineales de células B de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) estimados por ElliPro, basado en la estructura 3D de las proteínas.	104
<b>Figura 27.</b> Visualización esquemática de los epítomos discontinuos de células B de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) estimados por ElliPro, basado en la estructura 3D de las proteínas.	106

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos para la identificación por PCR de las cepas <i>C. pseudotuberculosis</i> aislado 2J-L y 43926 (ATCC).	69
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes <i>cp40</i> y <i>pld</i> .	70
<b>Tabla 3.</b> Cepas empleadas para el estudio filogenético del aislado 2J-L, en base a las secuencias de los genes <i>pld</i> y <i>cp40</i> .	75
<b>Tabla 4.</b> Porcentajes de similitud de la secuencia de los genes <i>pld</i> (A) y <i>cp40</i> (B) de <i>C. pseudotuberculosis</i> (2J-L) en comparación con secuencias informadas en la base de datos GenBank (NCBI).	85
<b>Tabla 5.</b> Composición y características físico-químicas de las proteínas PLDr 2J-Ly CP40r 2J-L.	90
<b>Tabla 6.</b> Predicción de epítomos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L mediante Bepipred 2.0.	100
<b>Tabla 7.</b> Epítomos lineales de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L determinados por ElliPro.	103
<b>Tabla 8.</b> Epítomos discontinuos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L determinados por ElliPro.	105
<b>Tabla 9.</b> Epítomos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, haciendo énfasis en las secuencias que se superponen, con el empleo de diferentes programas de predicción.	107-109
<b>Tabla 10.</b> Epítomos de células T presentados en el contexto del MHC I de modelo murino, de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.	111

## RESUMEN

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*, bacteria intracelular que provoca la formación de abscesos cutáneos y/o viscerales, y ocasiona importantes pérdidas económicas en la producción de pequeños rumiantes. Existen vacunas comerciales; sin embargo, la protección conferida no ha sido eficaz para el control de la enfermedad. Actualmente el empleo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido obtener proteínas con potencialidades inmunogénicas que podrían ser una alternativa para el desarrollo de nuevas vacunas, debido a esto el objetivo del presente trabajo fue obtener y caracterizar las proteínas recombinantes PLD y CP40 de *C. pseudotuberculosis* de un aislado mexicano (2J-L), antígenos con potencial inmunogénico. Los genes *pld* y *cp40* se amplificaron mediante PCR, se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy y se secuenciaron, para el análisis bioinformático. Las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se expresaron en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*. El análisis filogenético en base a la secuencia de los genes *pld* y *cp40* permitió agrupar el aislado 2J-L junto a cepas del biovar *ovis*, presentando una mayor relación con la cepa de origen mexicano MEX29. La proteína PLDr 2J-L presentó un 100% de identidad con respecto a la secuencia de las proteínas de las cepas de origen mexicano incluidas en el estudio. La proteína CP40r 2J-L presentó un 100% de identidad con respecto a MEX1, MEX2, MEX9 y MEX29, mientras que un 99% con respecto a CP40 de MEX25 debido a una variación de (V/L) en la posición 247. La caracterización de ambas proteínas se realizó *in silico* con la determinación de las propiedades físico-químicas, composición y predicción de las estructuras secundarias y modelado en 3D. El potencial inmunogénico de las proteínas se determinó mediante la predicción de epítopos lineales y discontinuos de células B y epítopos de células T presentados en el contexto del MHC I. Por primera vez se presenta un mapeo *in silico* de epítopos de células B y T para PLD y CP40 a partir de un aislado mexicano. Todos los epítopos identificados fueron conservados en un 100%, por las proteínas PLD y CP40 de las cepas de origen mexicano MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29. El programa Vaxign identificó ambas proteínas como antigénicas con función de adhesión y VaxiJen clasificó ambas proteínas como antígenos inmunogénicos probables para un valor de corte de 0.4. Las proteínas PLD y CP40 de *C. pseudotuberculosis* aislado mexicano 2J-L, obtenidas por vía recombinante, constituyen una fuente de antígenos potencialmente inmunogénicos para el desarrollo de una vacuna o medios diagnósticos.

## I.INTRODUCCION

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad que afecta las unidades de producción ovinas y caprinas a nivel mundial, causando disminución de la producción de lana, carne y leche, así como desórdenes reproductivos (Odhah *et al.*, 2017; Odhah *et al.*, 2018; Faeza *et al.*, 2019). La enfermedad se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos subcutáneos, con inflamación, encapsulación fibrosa, pérdida de pelo sobrepuesto y ruptura eventual, dando como resultado la descarga de contenido purulento (Mahmood *et al.*, 2015; Othman *et al.*, 2016). En la manifestación de la enfermedad a nivel visceral, los abscesos tienen lugar en los nódulos linfáticos internos, así como en pulmones, hígado y riñones, con deterioro en la condición orgánica del animal hacia el desarrollo de un curso crónico (Odhah *et al.*, 2017; Odhah *et al.*, 2019).

El agente etiológico de esta enfermedad es *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*, bacteria Gram positiva cuyo estilo de vida intracelular se encuentra favorecido por la presencia de ácidos corynomicólicos y la producción de la exotoxina PLD. Los ácidos corynomicólicos presentes en la estructura de la pared celular forman una barrera de protección, que le permite a la bacteria resistir la digestión por enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas y dificulta el acceso de los fármacos antimicrobianos (Burkoski *et al.*, 2018). La exotoxina PLD cataliza la disociación de la esfingomielina componente importante de las membranas celulares, lo que contribuye a la supervivencia y multiplicación de la bacteria en el interior de los macrófagos. La acción de PLD incrementa la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edemas y diseminación del microorganismo en el hospedero (Oliveira *et al.*, 2017a). El sistema inmune intenta restringir y limitar la diseminación de la infección a través de la formación de piogranulomas, desarrollo de hipersensibilidad retardada, necrosis y fibrosis del granuloma. De esta manera, la respuesta del hospedero es la principal causa del daño tisular y los efectos sistémicos propios de la enfermedad (Paule *et al.*, 2003; Seyffert *et al.*, 2014). *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* es un microorganismo zoonótico que afecta principalmente al personal involucrado en la actividad de producción ganadera (Heggelund *et al.*, 2015; Fernández-Alonso *et al.*, 2018). Debido a su curso crónico y poca respuesta al tratamiento, la infección es difícil de erradicar una vez que se establece en una unidad de producción. Por tales motivos las estrategias para establecer los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad deben ser integrales. En este sentido aún son escasos los medios de diagnósticos confiables y específicos para detectar esta enfermedad, así como también las vacunas comerciales no han sido eficaces ya que

presentan niveles de protección variables. Por lo general estas vacunas están formuladas por una combinación de antígenos de varios agentes patógenos, incluyendo una suspensión de cultivos totales inactivados de *C. pseudotuberculosis ovis*, con abundante exotoxina PLD (Widson y Bush., 2016). Sin embargo, estos fármacos profilácticos no han logrado establecer un control eficaz de la enfermedad por lo que se han intensificado los estudios para la obtención de nuevos candidatos vacunales. Las investigaciones se han dirigido al análisis de las moléculas con potencialidades inmunogénicas para el desarrollo de nuevas vacunas y medios diagnósticos. Las proteínas PLD y CP40 constituyen antígenos conservados, que han sido evaluados *in vivo* en diferentes formulaciones vacunales contra la Linfadenitis caseosa (Silva *et al.*, 2018; Droppa–Almeida *et al.*, 2016). Estas proteínas son capaces de activar tanto la respuesta inmune humoral como la celular, por lo que el empleo de ambas en una misma formulación sería una estrategia para potenciar la eficacia de las vacunas.

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante y la optimización de los bioprocesos ha permitido la obtención de proteínas heterólogas en grandes cantidades y con características similares a las proteínas nativas (Guevara-Hernández *et al.*, 2013). Por otra parte las técnicas bioinformáticas permiten caracterizar las moléculas posibles candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas, evitando el uso de animales de experimentación en las primeras etapas del diseño, así como logrando un ahorro significativo en tiempo y gastos de la investigación (Zaharieva *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2019; Ong *et al.*, 2020).

En México varios estudios han demostrado la presencia de *C. pseudotuberculosis* en los rebaños ovinos y caprinos en diferentes regiones del país (Parise *et al.*, 2018; Varela *et al.*, 2018). A pesar de la existencia de numerosas empresas productoras y comercializadoras de fármacos veterinarios a nivel nacional, ninguna ofrece dentro de sus productos vacunas ni medios diagnósticos contra la LAC. Por tales motivos el presente trabajo tiene como objetivos la obtención de las proteínas recombinantes PLD y CP40 a partir de un aislado de *C. pseudotuberculosis* de origen mexicano, así como la caracterización *in silico* para demostrar el potencial inmunogénico de estas proteínas, posibles candidatos para el futuro desarrollo de vacunas y medios diagnósticos.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1. PRODUCCIÓN DE PEQUEÑOS RUMIANTES

La producción de pequeños rumiantes se encuentra centrada principalmente en Europa, África y Asia; los cuales presentan el 80% de la población mundial. América es el continente en el que se concentra la menor cantidad de ovinos, con 87 millones de cabezas, que representan un 7.2% de la población mundial (FAO, 2018). Entre los principales productores se encuentran Australia, Nueva Zelanda y China; para el caso de América, el mayor productor es Brasil, Estados Unidos y México. Se prevé que los inventarios mundiales de carne de ovino continúen aumentando lentamente en la próxima década (13% entre 2017- 2027), impulsado por la demanda de importaciones en los países en desarrollo del medio oriente, especialmente China. El comercio podría ser más elevado en caso de liberalización del acceso a los mercados, con el lanzamiento de negociaciones con Australia y Nueva Zelanda (SAGARPA, 2016; Behrendt y Weeks, 2019).

México ocupa el tercer lugar de América en la producción de ovinos, con una población que ha incrementado a 8.7 millones de cabezas (SIAP, 2019). Según el reporte anual de la SIAP en el 2019 la producción de canales ovinas fue de 64 031 Toneladas y de caprinos 39 937 Toneladas (SIAP, 2019). El Estado de México presenta la mayor población ovina con 1 371 356 cabezas registradas de un total nacional de 8, 683, 835 (SIAP., 2018a) y una población caprina de 118 058 para un total nacional de 8 749 589 (SIAP., 2018a). En México existen 3 uniones y 64 asociaciones especializadas de ovinocultores que se agrupan en la Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos, A.C. (AMCO), que a su vez forman parte de la Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas (CNOG). Con el propósito de lograr fortalecimiento gremial de la asociación se cambió el esquema de socios individuales por el de delegaciones estatales, sustentadas en asociaciones locales, integrando el Organismo de la Unión Nacional de Ovinocultores (UNO).

La ovinocultura en México es una actividad en aumento y aun así la producción no satisface la demanda por lo que se importa carne de otros países como Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (FAO, 2018). Las importaciones de carne de ovino se han mantenido elevadas en los últimos años y actualmente oscilan entre el 43.5 al 50% del consumo nacional (Arteaga, 2008; Mondragón *et al.*, 2010, Bobadilla-Soto *et al.*, 2017).

## II.2 LINFADENITIS CASEOSA: SITUACIÓN MUNDIAL

La Linfadenitis caseosa (LAC), también llamada pseudotuberculosis o enfermedad de Preisz-Nocard, fue descrita por el veterinario francés Edmond Isidore Etienne Nocard, quien aisló el agente causal de un caso de linfangitis bovina en 1888. Hugo von Preisz en 1891 también identificó la bacteria de un absceso renal de oveja y debido a estos descubrimientos, el microorganismo se nombró bacilo “Preizz-Nocard”. El nombre oficial de la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), quedó establecido en 1948 según la 6ta edición del Manual del Bergy's (Von-Graevenitz y Bernard, 2006). Esta enfermedad afecta las producciones ovinas y caprinas causando deterioro en las condiciones físicas de los animales, disminución de la producción de lana, carne y leche, así como desórdenes reproductivos (Odhah *et al.*, 2017; Odhah *et al.*, 2018; Faeza *et al.*, 2019). La LAC ha sido reportada en diversos países que se ocupan de la producción de pequeños rumiantes como China, Australia, Brasil, México, Paraguay, Canadá, Turquía, Chile, Argentina y Reino Unido, mostrando evidencias de afectaciones en la producción (Gao *et al.*, 2018; Windsor., 2014; de Farais *et al.*, 2019; Varela *et al.*, 2018; Szwako *et al.*, 2014; Debien *et al.*, 2013; Ilhan, 2013; Rios, 2010; Estavao *et al.*, 2007; Connor *et al.*, 2007). La frecuencia de presentación de la enfermedad en cada región o país depende principalmente del tipo de explotación, siendo la enfermedad en la mayoría de los casos muy extendida pero poco notificada.

### II.2.1 Asia

En China se han realizado aislamientos y secuenciación del genoma completo de nuevas cepas de *C. pseudotuberculosis* (Zhou *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018). También se realizó un estudio de aislamiento y caracterización molecular de cepas de *C. pseudotuberculosis* obtenidas de abscesos externos de cabras de la región Suroeste de China. En este trabajo el 39.22 % (40/102) de los aislamientos fueron identificados como *C. pseudotuberculosis*, así como se amplificaron genes de virulencia y de diferenciación entre el biovar *ovis* y *equi* (Li *et al.*, 2018a).

### II.2.2 Australia

Australia es uno de los principales productores ovinos a nivel mundial, siendo en el 2011 su población de 74.7 Millones, con 43 760 granjas productoras en el país (Widson y Bush, 2016). Aunque en el 2018 disminuyó su población a 67.7 millones de cabezas, con una producción de 267 000 toneladas de carne, se estima que para el 2022 pueda recuperar su producción y la población alcance un valor de 73.8

Millones (Behrendt y Weeks, 2018). Encuestas realizadas en 1995 identificaron que la LAC estaba muy extendida y presente en el 97% de las granjas en Nueva Gales del Sur, 91% en la región de Victoria y el 88% en Australia occidental. La prevalencia estimada promedio de LAC en la población ovina adulta disminuyó de un 26% en 1995 a 5.2% en el 2009, debido principalmente a la aplicación de programas de control a través de la vacunación (Windsor, 2014). Las estimaciones de prevalencia derivadas del sacrificio de 1, 604,659 ovejas en 2009 fueron de un 12.9% en Victoria, 12.8% en Tasmania, 9.5% en Australia del Sur, 5.3% en Nueva Gales del Sur, 4.8% en Queensland y 1.0% en Australia Occidental (Bush *et al.*, 2012; Widson y Bush, 2016).

### II.2.3 Europa

En Europa se ha reportado también la LAC; entre el 2010-2013 se realizó un trabajo para la conservación de la cabra montés en el Noreste de España, donde se capturaron 18 animales y se mantuvieron en cautiverio. En este grupo de animales se desarrolló un brote de LAC, donde el 85.7% presentó la enfermedad. Se sugiere que el cautiverio jugó un papel importante en la tasa de contagio, por el aumento en los niveles de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis* y la aparición de signos clínicos. Este fue el primer informe de un brote de LAC con alta morbilidad y mortalidad en estos animales salvajes (Colom-Cadena *et al* 2014).

En el Reino Unido se ha realizado la caracterización de la bacteria con técnicas de electroforesis de campos pulsados, así como también en Irlanda se ha identificado el microorganismo en rebaños ovinos mediante técnicas serológicas (Connor *et al.*, 2000).

Turquía presenta evidencias de la circulación de este microorganismo, ya que el diagnóstico mediante PCR basado en la amplificación del gen *pld*, en aislados bacterianos de 147 muestras de diferentes tipos de abscesos, permitió la identificación de *C. pseudotuberculosis* en 85 de las muestras evaluadas (Ilhan *et al.*, 2013). Otro análisis de 100 muestras provenientes de abscesos de cabras fue realizado a partir de la amplificación por PCR del gen que codifica para la prolil endopeptidasa, con el cual se identificó el 100% de las muestras como *C. pseudotuberculosis* (Parin *et al.*, 2018).

### II.2.4 América

En Estados Unidos y Canadá también es considerada una enfermedad causante de importantes pérdidas económicas en la industria ovina (Williamson *et al.*, 2001; Promed, 2007). En Canadá de un total de

157 muestras analizadas, el 24.3% fue identificado como *C. pseudotuberculosis*, con formación de abscesos en el 54.1% de los casos (Debien *et al.*, 2013).

En Brasil la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todo el país, en la región de Minas Gerais se realizó el diagnóstico por ELISA a partir de muestras de suero de 642 ovejas provenientes de 97 granjas. La prevalencia de infección por *C. pseudotuberculosis* fue de (64.7–77.0%) un 70.9% y la prevalencia de granjas infectadas fue de un 95.9% (89.8–98.9%) ambos con un intervalo de confianza de un 95%. La edad de los animales influyó significativamente en el porcentaje de seropositividad, siendo la frecuencia más elevada en animales adultos, más de 12 meses, en comparación con los de 5 a 12 meses. En este trabajo se concluyó que la infección se encontraba ampliamente distribuida en esta región y que era necesaria la implementación de programas de control y erradicación de la enfermedad (Guimarães *et al.*, 2009). En el 2011 nuevamente se evaluó esta región mediante ensayos de ELISA a partir del análisis de sueros de 805 ovejas provenientes de 23 granjas. La frecuencia de infección por *C. pseudotuberculosis* fue de 43.7% y de granjas infectadas fue del 100%. Además, este estudio permitió relacionar la incidencia de la enfermedad con la deficiencia de técnicas adecuadas de manejo y control, lo que favorece la prevalencia de la enfermedad en las granjas (Guimarães *et al.*, 2011). En Río de Janeiro de un total de 202 muestras evaluadas por PCR, el 54% fueron positivas a *C. pseudotuberculosis* (Nassan *et al.*, 2015). En la región Noreste del país también se realizó un estudio donde se recolectaron un total de 2744 muestras de suero de cabra de 230 granjas entre los años 2010 y 2012. El diagnóstico de infección por *C. pseudotuberculosis* se realizó mediante la técnica indirecta de ELISA. La sero-prevalencia a nivel de granja y animal se estimó con valores de 87.8% y 30.3%, respectivamente, lo que sugiere que este microorganismo está muy extendido en los rebaños de cabras de esta región (de Farais *et al.*, 2019).

En Argentina la LAC está muy difundida en la Patagonia, donde constituye un serio riesgo sanitario para la producción ovina. En un estudio realizado a partir del análisis de 600 canales ovinas, 180 (30%) presentaron nódulos linfoides y vísceras de consistencia y tamaño anormal. Un total de 123 aislados fueron evaluados por PCR y secuenciación del gen *I6S rRNA*, lo que permitió la identificación de *C. pseudotuberculosis* en el 99% de las muestras evaluadas (Estavao *et al.*, 2007).

En Chile la enfermedad se ha reportado con una prevalencia en animales adultos de un 11.6% a partir del análisis de lesiones en 1397 canales de ovinos en la Planta Faenadora de Carnes Inducar de Coyhaique, XI Región, Chile (Tadich *et al.*, 2005). Otro estudio evaluó la capacidad de las pruebas de

diagnóstico bioquímicas y moleculares utilizando PCR y la secuenciación de un fragmento del gen *rpoB*, para un total de 20 aislados de *C. pseudotuberculosis* (Ríos, 2010).

En Paraguay de un total de 147 caprinos adultos evaluados se registró una prevalencia de 4.1% (Szwako *et al.*, 2014). En Venezuela, Península Paraguaná se realizó un trabajo que incluyó 3520 animales distribuidos entre 11 fincas, ubicadas en diferentes municipios. Durante la fase de campo se detectaron 71 animales con abscesos en nódulos linfoides superficiales, de los cuales 45 (63.38%) correspondieron a LAC. Estos individuos representan el 1.28% del total de animales evaluados, de manera tal que la media para cada finca incluida en el estudio fue de 5 a 6 animales con LAC (Delgado *et al.*, 2015).

### **II.2.5 México**

En México diversos estudios han demostrado la presencia de la LAC en los rebaños ovinos y caprinos en diferentes regiones del país. En el municipio de Xalatlaco, hallaron que el 5.4% de los exudados nasales de ovejas analizadas presentaron *Corynebacterium spp.* (Ochoa *et al.*, 1996). Otro análisis realizado por Barrientos permitió el aislamiento de *Corynebacterium spp.* en el 65% de los casos que estudiaron con lesiones en nódulos linfáticos (Barrientos., *et al* 1996). También se ha reportado una prevalencia del 1.75% en el municipio de Mapimí y 4.69% en el municipio de Tlahualilo, en cabras con LAC en el estado de Durango (Carrillo *et al.*, 2005). En el 2015 se realizó la identificación de 57 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de un total de 160 muestras procedentes del Estado de Jalisco. Las cepas se identificaron mediante bacteriología miniaturizada API Coryne, pruebas bioquímicas y PCR, obteniéndose una frecuencia del 33% (Varela *et al.*, 2018). Estudios recientes han permitido la secuenciación del genoma completo de seis cepas de origen mexicano, de diferentes biovars, aisladas de diferentes hospederos, cuyas secuencias se encuentran reportadas en la base de datos del GenBank (Muñoz-Bucio *et al.*, 2016; Parise *et al.*, 2018). La LAC se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial afectando en gran medida la producción ovina y caprina, por lo que se han intensificado las investigaciones para la identificación y caracterización del microorganismo agente causal de la enfermedad.

## **II.3 CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS**

### **II.3.1 Características generales**

El género *Corynebacterium* incluye numerosas especies de gran importancia para la industria médica, biotecnológica y veterinaria (Bernard, 2012; Soares *et al.*, 2013; Yang y Yang, 2017). La base de datos

PATRIC Database, en el 2017 contaba con el reporte de 466 genomas y 83 especies de *Corynebacterias* (Wattam *et al.*, 2017). Un estudio realizado mediante el análisis de secuencias del gen *16S rRNA*, permitió establecer que el género *Corynebacterium* se encuentra estrechamente relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Gordona*, *Rhodococcus* y *Nocardia* (Pascual *et al.*, 1995). Posteriormente el análisis basado en una secuencia parcial del gen *rpoB*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, resultó ser el método más eficiente para la identificación de *Corynebacterias* (Khamis *et al.*, 2005).

*C. pseudotuberculosis* pertenece al phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Corynebacteriaceae*, género *Corynebacterium* (Von graevenitz y Bernard, 2006; Bernard y Funke, 2012). Presenta una morfología cocobacilar con amplitud de 0.5-0.6  $\mu\text{m}$  y 1.0-3.0  $\mu\text{m}$  de longitud. Este microorganismo es un patógeno intracelular, no flagelado, no formador de esporas ni capsula, con un contenido G+C de aproximadamente 51 a 68%. Tienen la capacidad de crecer en anaerobiosis, degradan la galactosa, lactosa, maltosa, L-y D-arabinosa y glucosa sin producción de gases (Dorella *et al.*, 2006a; Ruiz *et al.*, 2011). En medio agar sangre forman colonias opacas convexas, de color blanco grisáceo, con tamaño de 1mm a las 24 horas. En un tiempo de incubación de 48 a 72h a 37°C las colonias alcanzan un diámetro de 3 mm y se caracterizan por ser blancas, secas y rodeadas por una zona de beta hemólisis (Bastos *et al.*, 2012). En medio de cultivo líquido, caldo simple, presentan un escaso crecimiento y no provocan turbidez general, sin embargo, en caldo de Infusión Cerebro-Corazón, BHI (por sus siglas en inglés, *Brain Heart Infusion*) se obtiene un crecimiento abundante con sedimento de color blanco amarillento (Batey *et al.*, 1986). El cultivo de esta bacteria se favorece cuando el medio BHI se suplementa con extracto de levadura, triptona o lactoalbumina, así como con fosfatos di-básicos, vitaminas y aminoácidos, lo que ha permitido estudiar la expresión y secreción de proteínas de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2011). La estructura y composición de la pared celular es compleja ya que presentan ácidos micólicos (ácidos corynomicólicos) de aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono que se unen a una red de heteropolisacaridos formados por arabinogalactanos, glicolípidos y proteínas (Burkovski *et al.*, 2013). La exotoxina Fosfolipasa D (PLD) es considerada el principal factor de virulencia y se determina mediante ensayos de hemólisis sinérgica frente a *Rhodococcus equi* o por inhibición de la  $\beta$ -hemolisina del *Staphylococcus aureus*, ambas pruebas ponen en evidencia la producción de la toxina PLD (Songer *et al.*, 1988). Las cepas de *C. pseudotuberculosis* son clasificadas en biovars, *equi* para los

aislamientos que presentan actividad enzimática nitrato reductasa y son capaces de reducir nitrato a nitrito (nitrato-positivo) y *ovis* para aquellas cepas que no presentan dicha capacidad (nitrato-negativo) (Songer *et al.*, 1988). Otros estudios han permitido establecer otra clasificación para las cepas de *C. pseudotuberculosis*, denotándolas como biotipo I y biotipo II. Los criterios de clasificación están dados por la capacidad de reducir nitratos y de hidrolizar el almidón. Las cepas biotipo I generalmente son aisladas de ovejas y cabras, son incapaces de reducir nitratos e hidrolizar el almidón. Además, se clasifican como biotipo I - no toxigénica ya que no presentan la toxina Diftérica (DT). Mientras que las cepas biotipo II son nitrato positivo, hidrolizan el almidón y presentan la Toxina Diftérica, siendo aisladas principalmente en búfalos (Moussa *et al.*, 2016a).

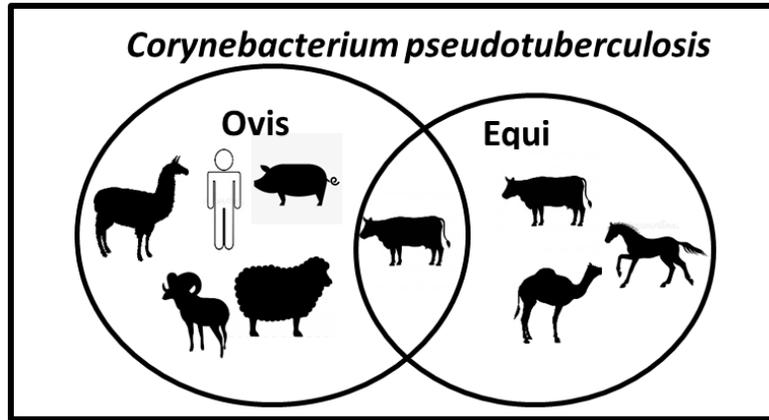
### II.3.2 *C. pseudotuberculosis* y hospederos

*C. pseudotuberculosis* es un microorganismo que presenta un amplio rango de hospederos (Figura 1). El biovar *ovis* es el agente causal de la enfermedad Linfadenitis caseosa y ha sido aislado de ovejas, cabras (Ruiz *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2018), antílopes (Muller *et al.*, 2011), vacas (Silva *et al.*, 2011), alpacas (Sprake y Gold, 2012), llamas (Lopes *et al.*, 2012), cabra montés (Colom-Cadena *et al.* 2014), y cerdos (Oliveira *et al.*, 2014).

El biovar *equi* ha sido aislado de abscesos en tejido muscular del área pectoral de equinos (Gädicke *et al.*, 2008; Hepworth-Warren *et al.*, 2014, Muñoz *et al.*, 2016), así como en camellos (Hassan *et al.*, 2012; Wernery y Kinne, 2016; Borham *et al.*, 2017). En equinos son menos comunes los abscesos internos, aunque en algunos casos se han descrito pericarditis y pleuritis (Perkins *et al.*, 2004). También se ha reportado la presencia del biovar *equi* en búfalos causando la enfermedad Edematosa de la piel. En el ganado vacuno la infección se presenta con una incidencia esporádica, con formación de abscesos cutáneos, linfangitis ulcerativas, mastitis y bronconeumonía necrótico-purulenta (Silva *et al.*, 2012; Viana *et al.*, 2017).

*C. pseudotuberculosis* es un microorganismo zoonótico por lo que también afecta al hombre siendo considerada una enfermedad ocupacional. Los casos de infecciones en humanos se han reportado en países como Australia (Peel *et al.*, 1997; Bernard, 2012), Nueva Zelanda (House *et al.*, 1986; Lester *et al.*, 1997), Francia (Trost *et al.*, 2010), España (Romero-Pérez *et al.*, 2004), Estados Unidos (Goldberger *et al.*, 1981) y China (Liu *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2012). Los síntomas clínicos incluyen

adenopatías axilares, inguinales o cervicales, fiebre y mialgias, con evolución crónica o subaguda, en algunos casos neumonía (Heggelund *et al.*, 2015; Fernández-Alonso *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Variedad de hospederos de *C. pseudotuberculosis*. Fuente Original.

### II.3.3 Transmisión

La transmisión horizontal se favorece mediante contacto directo con alimento o inhalación de polvo contaminado con el microorganismo, así como por heridas abiertas. A través de un modelo matemático basado en la localización de los abscesos, se postularon tres vías de transmisión: vía cutánea abierta a abierta, vía respiratoria a cutánea abierta y de vía respiratoria a respiratoria. En la comparación de cuatro granjas infectadas, el modelo estimó que la vía de transmisión número uno es la más frecuente, ya que presentó el coeficiente de transmisión más alto, en comparación con las otras dos vías propuestas (O'Reilly *et al.*, 2008). En rebaños con una alta prevalencia se ha descrito la transmisión de la infección a través de los trabajadores y sus equipos de esquila, ya que están expuestos a las descargas purulentas de las lesiones superficiales. El material procedente de los abscesos contiene concentraciones muy elevadas del microorganismo, contaminando no solo las herramientas de esquila, sino también el suelo. Las bacterias presentes en el pus se organizan formando agregados que facilitan su resistencia a condiciones ambientales adversas como cambios de acidez, cambios osmóticos y estrés térmico, manteniendo su capacidad de infección y expresando proteínas factores de virulencia que facilitan su adaptación (Pinto *et al.*, 2014). La evaluación de la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en 5 muestras de suelos de distintas zonas de la provincia del Chubut (Patagonia) con características físico-químicas diferentes en lo que respecta a contenido de materia orgánica, pH, conductividad eléctrica y

textura, permitió determinar que el 60% de la población de *C. pseudotuberculosis* sobrevivió durante un periodo de 80 a 210 días. La supervivencia de la bacteria por largos períodos se vio favorecida por el mayor contenido de materia orgánica sumado a la textura franco-limosa y no se observó la influencia de variables como el pH y la salinidad (Alvarez *et al.*, 2017).

### II.3.4 Identificación y diversidad genética

La identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante PCR (por sus siglas del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) se ha ido modificando incluyendo diferentes genes (Adderson *et al.*, 2008) que permiten la clasificación hasta biovar (Almeida *et al.*, 2017). El empleo de la secuencia del gen *16S rRNA* permite diferenciar *Corynebacterium diphtheriae* de *C. pseudotuberculosis* con una similitud de un 97.8%, lo que indica que estas especies están estrechamente relacionadas, pero son diferentes. Sin embargo, entre *C. pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ulcerans* la similitud entre especies es de 99.7% por lo que este gen no permite la diferenciación entre ambas (Pascual *et al.*, 1995). Debido al elevado grado de similitud entre estas especies se realiza de manera simultánea la amplificación de otros genes más específicos como *pld* y *rpoB* (Pacheco *et al.*, 2007). El gen *rpoB* codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (Khamis *et al.*, 2004), y la amplificación de un fragmento de 434 a 452 pb permite la identificación a nivel de especie ya que presenta un elevado polimorfismo. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies ha sido de 95.9%, lo que posibilita una identificación certera a diferencia del 99.7% de semejanza que presentan las secuencias completas del *16S rRNA* (1.500 pb) (Khamis *et al.*, 2005).

El gen *pld* codifica para la fosfolipasa D, factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis*, es un blanco de amplificación por PCR para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* (Pacheco *et al.*, 2007). Recientemente quedo establecido el PCR Quadruplex que incluye la amplificación de los genes anteriormente citados, así como el gen *narG*, que codifica para la cadena  $\alpha$  de la enzima Nitrato reductasa. La presencia de este gen es indicativo de las cepas biovar *equi* y la ausencia del mismo permite identificar a la cepa como biovar *ovis*. Este nuevo sistema de diagnóstico por PCR permite establecer la identificación de especie y biovar (Almeida *et al.*, 2017). El diagnóstico de la enfermedad mediante sistemas tipo ELISA (por sus siglas del inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se ha establecido en ensayos experimentales mediante el uso de proteínas obtenidas por vía recombinante. El desarrollo de un ELISA indirecto empleando una combinación de PLDr y CP40r como antígenos en una proporción 1:1, presentó un 96.9% de sensibilidad y 98.4% de

especificidad para muestras procedentes de cabras. Mientras que para ovejas los mejores resultados los obtuvieron con el ELISA en base a PLD recombinante con una sensibilidad de 91% y 98.7% de especificidad (Barral *et al.*, 2019).

Diferentes técnicas se han utilizado para el análisis y genotipificación de las cepas de *C. pseudotuberculosis*. El análisis del ADN con endonucleasas de restricción (REAC) y mediante polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), fueron empleados para establecer variaciones genéticas entre cepas aisladas de animales provenientes de Norteamérica y de diferentes regiones de Australia. Los resultados indicaron que tanto los aislamientos de Norteamérica como los de Australia tenían propiedades bioquímicas, patrones de endonucleasas de restricción y ribotipos similares. Estos hallazgos fueron inesperados considerando las diferencias en la presentación clínica de la enfermedad, patología y distribución geográfica de los aislamientos (Sutherland *et al.*, 1993).

El empleo de la técnica de Electroforesis de campos pulsados, PFGE, (por sus siglas en inglés, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) permitió establecer 6 pulsotipos en el estudio de 50 aislados de *C. pseudotuberculosis* del Reino Unido. Estas diferencias pueden ser causadas por una mutación puntual o por una inserción o eliminación, lo que resulta en tres o dos diferencias de fragmentos respectivamente. Se han visto estas variaciones en los patrones de bandas en otras bacterias lo que podría ocurrir después del cultivo *in vitro* o después del paso a través de diferentes hospederos. Este trabajo mostró que las cepas de *C. pseudotuberculosis* presentan un arreglo clonal conservado, que permite diferenciar los aislados biovar *ovis* y biovar *equi*, sin embargo no se observaron variaciones entre las cepas biovar *ovis* (Connor *et al.*, 2000). Este mismo grupo de investigadores realizó la caracterización de 42 aislados de *C. pseudotuberculosis* de ovejas y cabras provenientes de Australia, Canadá, Irlanda y los Países Bajos mediante PFGE. Este análisis permitió identificar 4 pulsotipos distintos entre 36 cepas ovinas y 6 caprinas que mostraron una notable homogeneidad. Con base en estos resultados, se plantea que el genoma de *C. pseudotuberculosis* está altamente conservado, independientemente del país de origen de la cepa (Connor *et al.*, 2007).

Por otra parte, otro estudio estableció una comparación entre tres técnicas de Fingerprinting basados en PCR (BOX-PCR, RAPD y ADSRRS-fingerprinting) para evaluar la diversidad del genoma entre 61 cepas de *C. pseudotuberculosis* de cabras en Polonia. Las técnicas RAPD (por sus siglas en inglés, *Random Amplified Polymorphic DNA*) con 8 patrones diferentes y ADSRRS-fingerprinting (por sus siglas en inglés, *Fingerprinting Amplification of DNA Surrounding Rare Restriction Sites*) con 10

patrones diferentes, fueron las más eficientes para establecer diferentes genotipos con un índice discriminatorio de 0.539 y 0.604 respectivamente. En este estudio se demostró que las cepas de *C. pseudotuberculosis* que causan infecciones en el ganado caprino en Polonia son genéticamente diversas; ya que se observaron patrones de genoma idénticos en cepas aisladas de animales de rebaños de diferentes regiones y por otra parte hubo cepas que mostraron perfiles diferentes aun siendo aisladas de un mismo rebaño (Stefanska *et al.*, 2008).

La genotipificación de 42 cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas de cabras provenientes de 16 rebaños diferentes de Polonia, se realizó mediante RAPD y AFLP (por sus siglas en inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism*). El nivel de diferenciación obtenido en el estudio después de considerar los niveles de identidad fue más alto para RAPD, como una mejor técnica discriminativa en comparación con AFLP (Nowicki *et al.*, 2011).

El análisis del Pan-genoma de 15 cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas de diferentes hospederos, 9 biovar *ovis* y 6 biovar *equi* proporcionó información sobre los genes variables, genes conservados y genoma completo de ambos biovares. Se emplearon las secuencias de cepas de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* aisladas de diversos hospederos como cabras, ovejas, llamas, antílopes, bovinos y humanos, mientras que las cepas biovar *equi* provenían de caballos, camellos y búfalos. Se correlacionó la plasticidad de las secuencias de 16 Islas de Patogenicidad, PAI, (por sus siglas del inglés, *Pathogenicity Islands*), regiones del genoma que contienen principalmente genes involucrados en la virulencia. Se mostró que el biovar *ovis* contiene 314 genes ortólogos que comparten todas las cepas de este biovar pero están ausentes de una o más cepas del biovar *equi*. Además, las cepas biovar *equi* tienen 95 genes centrales que están ausentes de una o más cepas de biovar *ovis*. La mayoría de los genes variables de las cepas biovar *ovis* se adquirieron en un bloque a través de transferencia horizontal de genes y están altamente conservados, mientras que las cepas biovar *equi* contienen una gran variabilidad, tanto intra como inter-biovar, en las 16 islas de patogenicidad. También existe una elevada similitud en las secuencias de los genes que codifican para la estructura del *pilis* en las cepas biovar *ovis* en comparación con la gran variabilidad de estos genes en las cepas biovar *equi*. Esto podría ser responsable de la notable capacidad de las cepas biovar *ovis* para propagarse por los tejidos del hospedero y penetrar en las células, viviendo intracelularmente y ocasionando manifestaciones de la enfermedad a nivel visceral, en contraste con el biovar *equi*, que rara vez infecta órganos internos (Soares *et al.*, 2013).

La evaluación de la técnica ERIC-PCR (por sus siglas en inglés, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) como herramienta para la tipificación de *C. pseudotuberculosis* fue realizada a partir de 101 cepas aisladas de 8 tipos de hospederos diferentes provenientes de 12 países. El árbol de expansión mínimo reveló tres complejos clonales alrededor de las cepas nitrato positivo (biovar *equi*) y nitrato negativo (biovar *ovis*). Las diferencias en el patrón de agrupación del biovar *ovis* y las cepas biovar *equi* reflejan la gran cantidad de genes no compartidos por ambos biovares. Asociar las cepas según el origen geográfico u hospedero, solo fue posible con los aislamientos del biovar *equi* provenientes de equinos. Este patrón de segregación también se observó para aislamientos de búfalos de agua, todos de Egipto, agrupados en el mismo grupo. De manera general los aislamientos biovar *equi* se agruparon en el mismo grupo (F), mientras que los aislamientos biovar *ovis* se organizaron en los grupos A, E, I, independientemente del tipo de hospedero o región geográfica (Dorneles *et al.*, 2014).

*C. pseudotuberculosis* presenta eventos que sugieren una etapa de especiación biológica. Lo que significa que la especie se encuentra bajo un proceso de anagénesis, donde la evolución progresiva de los caracteres que aparecen o se modifican pueden alterar la frecuencia genética. La evidencia de este proceso, se encuentran en la presencia de biovares *equi* u *ovis*, divergencias evolutivas, número de transición, sustituciones y mutaciones puntuales conservadas (Oliveira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017a).

En México también se han estudiado algunas cepas de *C. pseudotuberculosis*. La cepa MEX1 (NZ\_CP017711.1) fue aislada de absceso retrofaríngeo de cabra, en la región de Tlaxcala y la cepa MEX29 (NZ\_CP016826.1) de absceso retrofaríngeo de oveja, en la región de Río Frío de Juárez, con una distancia de 50 Km entre ambos aislamientos. Por otra parte, la cepa MEX25 (NZ\_CP013697.1) fue identificada de absceso parotídeo en oveja y MEX9 (NZ\_CP014543.1) de absceso pre-escapular en cabra, ambas aisladas en la región de Guanajuato, con una distancia de 450 Km con respecto a los aislados anteriores (Parise *et al.*, 2018).

Las cepas MEX30 (NZ\_CP017291.1) y MEX31 (NZ\_CP017292.1) fueron obtenidas de abscesos de músculo pectoral de equinos de la región de Valparaiso, siendo el primer reporte en México de cepas biovar *equi* (Muñoz-Bucio *et al.*, 2016). El análisis filogenético de las cepas de origen mexicano, agrupó cada una en función del tipo de biovar, y en el caso de las cepas biovar *ovis* no se agruparon en función de su cercanía geográfica. Las cepas biovar *ovis* también se relacionaron con otras reportadas

en la base de datos del GenBank provenientes de hospederos diferentes. Las cepas biovar *ovis* contienen un elevado grado de clonalidad, pero no presentan el mismo grado de agrupación filogenética en los clados que las cepas biovar *equi*. Además, en este trabajo la comparación del genoma de 46 cepas permitió identificar dos clusters de genes que podrían ser empleados para la diferenciación de las cepas biovar *equi* (cluster: CRISPR-Cas) y biovar *ovis* (cluster: proteínas de tipo III de Restricción-modificación) (Parise *et al.*, 2018).

En México también se identificaron 57 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes del Estado de Jalisco, mediante pruebas bacteriológicas y la amplificación de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *pld*, así como los genes implicados en la virulencia y patogenicidad: *fag A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60*. El análisis filogenético de los aislamientos se realizó en base a la secuencia parcial del gen *rpoB* con porcentajes de similitud entre 98, 99 y 100% con respecto a las secuencias reportadas a nivel mundial. El árbol filogenético permitió agrupar los 57 aislamientos con cepas de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Los genes involucrados en la virulencia y patogenicidad se identificaron en el 98.2% de los aislamientos (Varela *et al.*, 2018). Los estudios realizados con cepas de *C. pseudotuberculosis* han evidenciado que es más fácil determinar las diferencias genéticas entre diferentes biovares que dentro del mismo. Las secuencias de las cepas biovar *ovis* se encuentran conservadas y se agrupan de manera independiente de la región geográfica o el tipo de hospedero. A pesar de la variabilidad genética demostrada en las cepas biovar *equi* en los análisis filogenéticos, estas se agrupan en el mismo clado en función de los hospederos, a diferencia de las cepas biovar *ovis* las cuales pueden agrupar cepas aisladas de ovinos o caprinos y de diferentes regiones indistintamente en un mismo grupo.

#### **II.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE *C. pseudotuberculosis***

El estudio de los factores de virulencia permite entender cuáles son las estructuras y moléculas que le confieren la capacidad a la bacteria para ser más patógena. La adquisición de genes por transferencia horizontal ha sido trascendental en la evolución de la patogenicidad de las bacterias; ya que las funciones de los genes adquiridos le han permitido adaptarse a las distintas condiciones ambientales, incluyendo la supervivencia en diferentes nichos durante la infección a los hospederos. La mayoría de los genes de virulencia de *C. pseudotuberculosis* están agrupados en el genoma en regiones denominadas islas de patogenicidad. En *C. pseudotuberculosis* 16 PAI se han identificados, denominadas PiCp, donde la presencia de un gen de transposasa en la PiCp1, posiblemente permitió la incorporación de esas islas de patogenicidad en el genoma. Estas regiones contienen varios genes

implicados en la adhesión, invasión, colonización, propagación dentro del hospedero, supervivencia en el interior de las células infectadas y la evasión del sistema inmune (Ruiz *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2017). Las secuencias de las PiCp presentan un alto nivel de similitud (82–100%) intra-biovar en las cepas *ovis*, así como un menor nivel de similitud (78–91%), con respecto al biovar *equi*, con un patrón de delección conservado en las mismas islas de patogenicidad, independientemente de la cepa. Las cepas de biovar *equi* contienen grandes delecciones y un menor nivel de similitud intra-biovar (77–88%) y también en comparación con las PiCp de biovar *ovis* (62–74%) (Soares *et al.*, 2013).

Dentro de los factores de virulencia más estudiados se encuentran los ácidos corynomicólicos, moléculas que forman parte de la estructura de la pared celular. La membrana plasmática de la bacteria está cubierta por una capa de peptidoglicano compuesto por ácido meso-diaminopimelico (meso-DAP), arabinosa y galactosa como azúcares principales. En las reacciones de la vía de biosíntesis II de peptidoglicano; el ácido meso-DAP es el producto de la reacción catalizada por UDP-N-acetilmuramyl-tripéptido sintetasa, enzima que ha sido identificada en cepas de *C. pseudotuberculosis* (Ruiz *et al.*, 2011). El peptidoglicano a su vez está unido covalentemente con arabinogalactanos, heteropolisacáridos que forman un enrejado, que se encuentra unido a una capa externa de ácidos corynomicólicos. Estos ácidos micólicos se encuentran unido a trehalosa en sus extremos más expuestos al exterior, y en *Mycobacterium tuberculosis* (Forrellad *et al.*, 2013) forman una estructura llamada factor cordón, que se ha relacionado con la inhibición de la fusión dentro de los macrófagos y con la activación de estas células. En la superficie más externa de la pared celular se encuentran polisacáridos libres, glicolípidos y proteínas (incluidas las proteínas de capa S, *pili* y otras proteínas de superficie). La estructura lipídica formada por los ácidos corynomicólicos actúa como una barrera, con permeabilidad selectiva, mediada por proteínas integrales de membranas llamadas porinas (Schiffler *et al.*, 2007). La infección de macrófagos ovinos con extractos lipídicos de *C. pseudotuberculosis* tuvo efectos negativos sobre la actividad glicolítica, viabilidad e integridad de la membrana. También brinda protección a la bacteria ante la acción de las lisozimas, ocasionando impedimento estérico ya que las enzimas no pueden acceder a los enlaces del peptidoglicano (Burskoski *et al.*, 2013; Burkovski *et al.*, 2018). La inoculación de ácidos corynomicólicos purificados de una cepa virulenta, demostró en ovinos que la concentración de haptoglobina (Hp) aumento 3 veces su concentración, así como también 2 veces los niveles de amiloide sérico A (SAA). Estas son proteínas sanguíneas, sintetizadas

principalmente por células hepáticas como parte de la respuesta ante infecciones en fase aguda. Estos resultados indican el potencial virulento de los ácidos corynomicólicos, ya que por sí solos fueron capaces de inducir en el hospedero el aumento de estas proteínas indicadoras de inflamación e infecciones agudas (Odhah *et al.*, 2018). Recientemente se realizó un estudio histopatológico en ovejas infectadas con ácidos corynomicólicos, donde se observó la formación de lesiones como congestión, degeneración y necrosis en los órganos reproductivos (Jesse *et al.*, 2020). Los ácidos corynomicólicos son uno de los factores de virulencia externos más estudiados y constituyen la primera barrera de protección que presenta la bacteria.

Otros factores de virulencia también han sido estudiados en la PiCp1, donde se encuentra el operón (fag ABCD) cuyos genes codifican para proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, proceso importante que permite la supervivencia de las bacterias en el hospedero (Schultz *et al.*, 2010; Sheldon y Heinrichs, 2015). El operón Fag ABCD está compuesto por cuatro genes *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD* (Billington *et al.*, 2002), que codifican respectivamente para una proteína integral de membrana, una enterobactina transportadora de hierro, una proteína de membrana citoplasmática de unión a ATP y una proteína siderófora de unión a hierro, consideradas de gran importancia contribuyendo a la virulencia de *C. pseudotuberculosis* (Sá *et al.*, 2013). La FagA fue identificada como proteína de asociación a membrana con potencialidades patogénicas, mediante el análisis por espectrometría de masas de las proteínas expresadas en una cepa de *C. pseudotuberculosis* cultivada con suero animal. Este estudio dio a conocer parte del repertorio de proteínas que se expresan durante una infección real, las cuales podrían ser utilizadas como antígenos para el desarrollo de vacunas (Raynal, 2018). El cultivo de *C. pseudotuberculosis* en medios con quelantes de hierro (Dipiridilo), provocó la disminución en un orden de logaritmo, en el conteo de unidades formadoras de colonias, en comparación con las bacterias crecidas en medios enriquecidos con hierro. Por otra parte, en el mismo trabajo la evaluación de la respuesta transcripcional de *C. pseudotuberculosis*, con restricción de hierro, permitió identificar la regulación negativa de genes que participan en el metabolismo energético del ciclo de Krebs (*sdhC*, *sdhB*, *lpd*), producción de ATP (*atpF*, *atpH*), metabolismo del piruvato (*lpd*), fosforilación oxidativa (*qcrC*, *qcrA*, *qcrB*, *ctaC*, *ctaF*, *ctaE*, *ctaD*), procesos del ribosoma, transporte (*rplJ*, *rplL*, *rplM*, *rpmA*, *rpsC*, *rpsI*, *rpsL*, *rpsM*) y factores de alargamiento EF-G y EF-Ts asociados a la traducción del RNAm (*fusA*, *tsf*). Por el contrario, aumento la expresión de los genes *glxR*, *ripA* y *hrrA*, que participan en la regulación transcripcional de procesos metabólicos (*glxR*) y genes

dependientes de hierro (*ripA* y *hrrA*). También aumento la expresión de genes que codifican para proteínas de membrana, que juegan un papel en la adquisición y transporte de grupo hemo, (*htaA*, *htaC*, *htaF*, *htaG*, *Cp\_3070* y *Cp\_3075*), para favorecer la adquisición de hierro cuando este se encuentra a bajas concentraciones (Ibraim *et al.*, 2019).

Las islas de patogenicidad presentan genes que participan en la adaptación de las cepas a diferentes ambientes. En PiCP1 se identificaron genes con funciones asociadas con la absorción de carbono (*mall*) y  $Mg^{2+}$ , lo que favorece la supervivencia en condiciones de estrés. En procariontes el  $Mg^{2+}$  ha sido identificado como una importante señal reguladora que es esencial para la virulencia, ya que es involucrado en la adaptación térmica, protegiendo a las bacterias contra la fiebre del hospedero. La traducción del gen *mgtE* está regulada por cambios en la concentración de  $Mg^{2+}$  citosólico y la pérdida de este gen reduce la formación de biopelículas y motilidad en las bacterias patógenas (O'Connor *et al.*, 2009).

En PiCP2 el gen *tetA* codifica una proteína transportadora de eflujo de tetraciclina que protege ante la acción de este antibiótico y confiere resistencia a las células que forman biopelículas. El gen *tetA* a menudo es transportado por elementos transmisibles como plásmidos, transposones e integrones (May *et al.*, 2009). En esta isla de patogenicidad se han identificado genes asociados con la infección de macrófagos como *potG*, *sigK* y *dipZ*, que responden a los mecanismos responsables del estilo de vida intramacrofágico de este microorganismo (Ruiz *et al.*, 2011). El gen *dipZ* está regulado por *sigK* y participa durante la infección de macrófagos por *Mycobacterium tuberculosis*, aunque su función aún no está bien dilucidada. *DipZ* se encuentra como dos proteínas separadas en la mayoría de las bacterias: CcdA y TlpA-like. El gen *dipZ* se ha identificado en el filum Actinobacteria, en bacterias patógenas como *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. tuberculosis* (Veyrier *et al.*, 2008). El gen *potG* codifica para una proteína de membrana de unión a ATP que proporciona energía para absorción de putrescina (poliamina) desde el espacio periplásmico, funciona como sistema transportador de putresinas (Vassilyev *et al.*, 1998).

En PiCp4 la presencia del gen que codifica para el factor Sigma, confiere capacidad de proteger ante estrés oxidativo, específicamente ante la acción de los productos intermediarios del nitrógeno (Pacheco *et al.*, 2012). Las bacterias durante el proceso de infección se enfrentan ante el estrés térmico, debido a que es uno de los mecanismos del sistema inmune del hospedero para contener al patógeno (Caruso *et al.*, 2018). Las proteínas chaperonas (HSP) son altamente conservadas y se expresan ante el estrés

térmico, así como también ante la disminución de nutrientes, hipotaxia, disrupción del metabolismo, infecciones virales y otros procesos celulares. Estas se clasifican en seis grupos: Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, y Hsp100. En células procariotas las más caracterizadas son la Hsp10 (*groES*), Hsp60 (*groEL*) y Hsp70 (*dnaK*) (Costa *et al.*, 2011; Pinto-Gomide *et al.*, 2018). Las proteínas Hsp fueron estudiadas en *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* cepa 1002, donde se demostró la resistencia a diversos tipos de estrés abióticos, tales como acidez, altas temperaturas y estrés osmótico. La presencia de los genes y regulación de la expresión de las proteínas Hsp, también se han estudiado en cepas de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi*, sometidas a cambios de temperatura de hasta 50°C (Pinto-Gomide *et al.*, 2018).

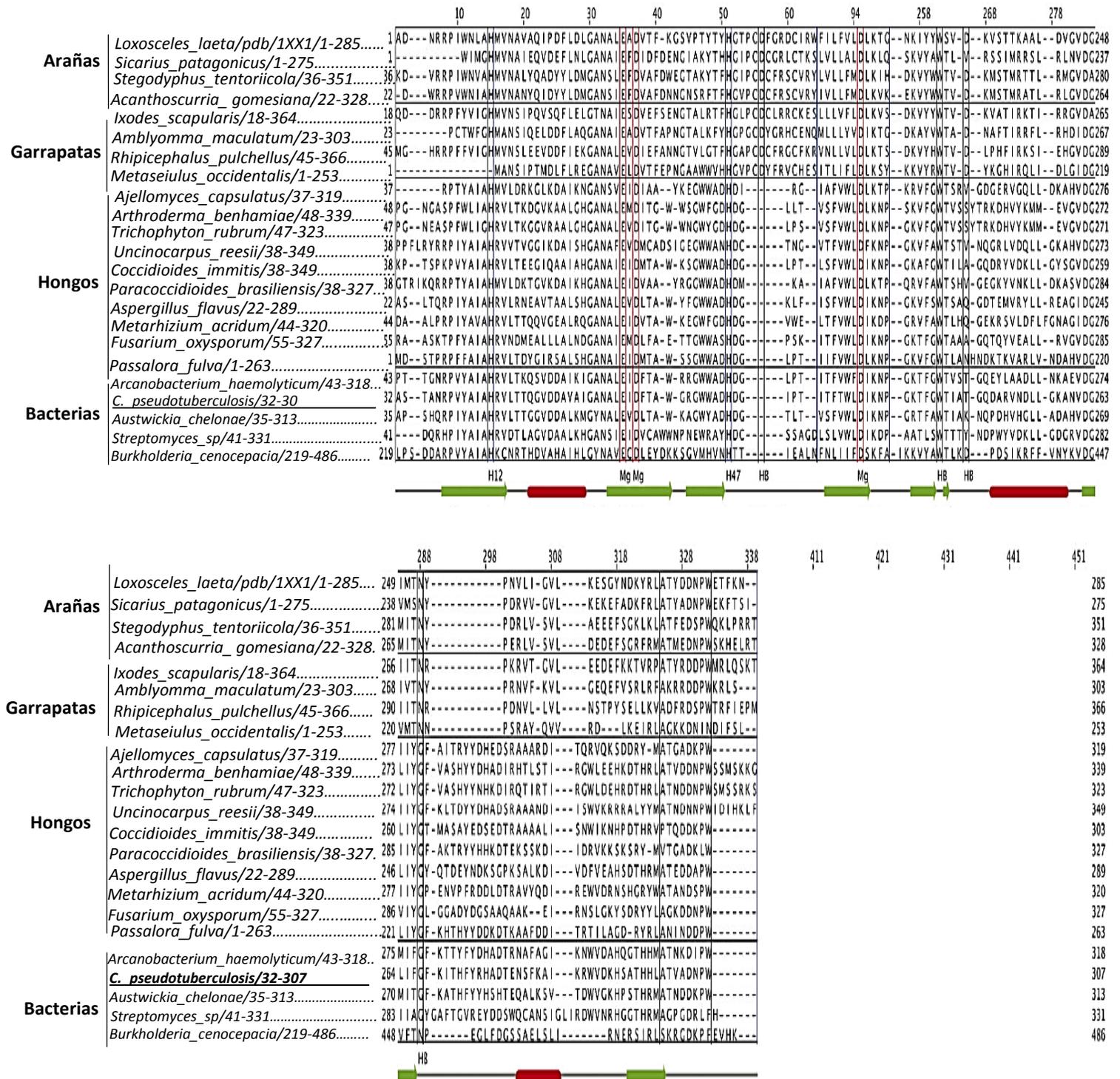
En *C. pseudotuberculosis* cepa FCR41 se identificó el gen *spaC*, que codifica para una proteína responsable del anclaje del *pili* a la pared celular, que puede permitir el contacto inicial con los receptores de la célula, para luego facilitar la invasión intracelular. Las estructuras del *pili* están compuestas por el *pili* mayor SpaA y SpaD; el *pili* menor SpaB y SpaE; y el *pili* tipo, SpaC, SpaF. Una estructura completa de *pili* o incluso el *pili* menor pueden realizar un contacto inicial con receptores de las células hospederas, para facilitar la entrada del microorganismo. También se detectó el gen *namH*, que codifica para una neuroaminidasa extracelular. Las neuraminidasas o sialidasas pertenecen a una clase de glicosil hidrolasas que catalizan la eliminación de los grupos de ácido siálico presentes en una gran variedad de glicoconjugados de la matriz extracelular de la célula del hospedero. En esta cepa también se identificó el gen *sodC*, que codifica para una superóxido dismutasa, enzima que reduce los efectos del estrés provocado por el estallido respiratorio dentro de los macrófagos, facilitando la eliminación de radicales libres del oxígeno. Esta proteína se encuentra localizada anclada a la membrana con dominio extracelular, lo que confiere protección ante el estrés del entorno en que se encuentre la bacteria y favorece su permanencia intracelular (Trost *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2011). El empleo de técnicas de proteómica aumentó el número de proteínas extracelulares identificadas de 93 a 104. De las nuevas proteínas, 3 tienen funciones desconocidas y 8 han sido relacionadas con diversas funciones fisiológicas y factores de virulencia como el factor de alargamiento Tu, GroEL (HSP60), enolasa, deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato y superóxido dismutasa (SodA), los cuales dependen de un método de secreción no clásico vía SecA. Ambos genes SecA (SecA1 y SecA2), se identificaron en las cepas estudiadas, posiblemente involucradas en el sistema de secreción de *C. pseudotuberculosis* (Silva *et al.*, 2013).

#### II.4.1 Exotoxina Fosfolipasa D (PLD)

La exotoxina Fosfolipasa D es considerada el factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis* (Sá *et al.*, 2013). El gen *pld* fue identificado y secuenciado en 1990, forma parte de la isla de patogenicidad PiCp1 y codifica para una proteína de 31.4KDa (Hodgson *et al.*, 1990). Las fosfolipasas son un grupo variado de enzimas capaces de hidrolizar uno o más enlaces éster en glicerofosfolípidos. Las letras A-D se usan para distinguir las fosfolipasas y denotar el fosfolípido específico en el que escinden el enlace éster. La comparación de la secuencia de la proteína PLD reveló que presenta mayor similitud con Fosfolipasa A2 (Hodgson *et al.*, 1990); sin embargo, PLD no pertenece a la familia de las Fosfolipasa debido a que carece del motivo HKD conservado en esta familia (Kolesnikov *et al.*, 2012; Mahankali *et al.*, 2015). La PLD es clasificada como una Esfingomielinasa D (SMasa D; EC 3.1.4.41), también conocidas como esfingomielina fosfodiesterasas D o fosfolipasa D (PLD), que cataliza la escisión hidrolítica de la esfingomielina para producir colina y ceramida 1-fosfato o colina y ácido lisofosfatídico (LPA)(van Meeteren *et al.*, 2004; Stock *et al.*, 2012). Estas enzimas que comparten el dominio GDPD (glicerofosforil diéster fosfodiesterasas), se han identificado en diferentes organismos como arañas, bacterias, garrapatas, ácaros y hongos (Figura 2).

El estudio en base a la similitud de secuencias fue capaz de identificar SMasa D en 24 géneros distintos, 59 especies y 105 subespecies en una extensión de búsqueda en diferentes bases de datos (Dias-Lopes *et al.*, 2013).

La PLD de *C. pseudotuberculosis* presenta una elevada homología en comparación con las SMDasa de *Loxosceles spp.* con un 30% de similitud en la secuencia y efectos fisiopatológicos similares incluida la agregación plaquetaria, hiperpermeabilidad endotelial, hemólisis y necrosis cutánea dependiente de neutrófilos (van Meeteren *et al.*, 2004; Cordes y Binford, 2006). Estas enzimas presentan una estructura conservada en forma de barril TIM ( $\beta\alpha$ ), formado por hojas  $\beta$  y hélices- $\alpha$  intercaladas, así como una cola-SMD en el extremo C-terminal compuesta por el motivo de residuos conservados ATXXDNPW. La PLD es una exotoxina con actividad enzimática dependiente de magnesio, que cataliza la disociación de la esfingomielina en las membranas celulares endoteliales, lo que aumenta la permeabilidad vascular, contribuye a la diseminación y persistencia de la bacteria en los fagocitos, que la transportan a nódulos linfáticos donde se desarrollan los abscesos (Hodgson *et al. al.*, 1994; Baird y Fontaine, 2007; Li *et al.*, 2018b). Aunque su acción no se ha considerada directamente hemolítica, se ha informado que es capaz de producir hemólisis sinérgica (Jost y y Billington, 2004).



**Figura 2.** Descripción de residuos de aminoácidos involucrados en el sitio catalítico de enzimas SMDasa. En azul residuos de Histidina, rojo residuos de unión a Mg<sup>2+</sup>, en negro residuos que forman puentes de hidrogeno (HB). Las flechas verdes indican estructura secundaria de hojas β y los cilindros rojos estructura hélice-α. Fuente: Figura modificada de Dias-Lopes *et al.*, (2013).

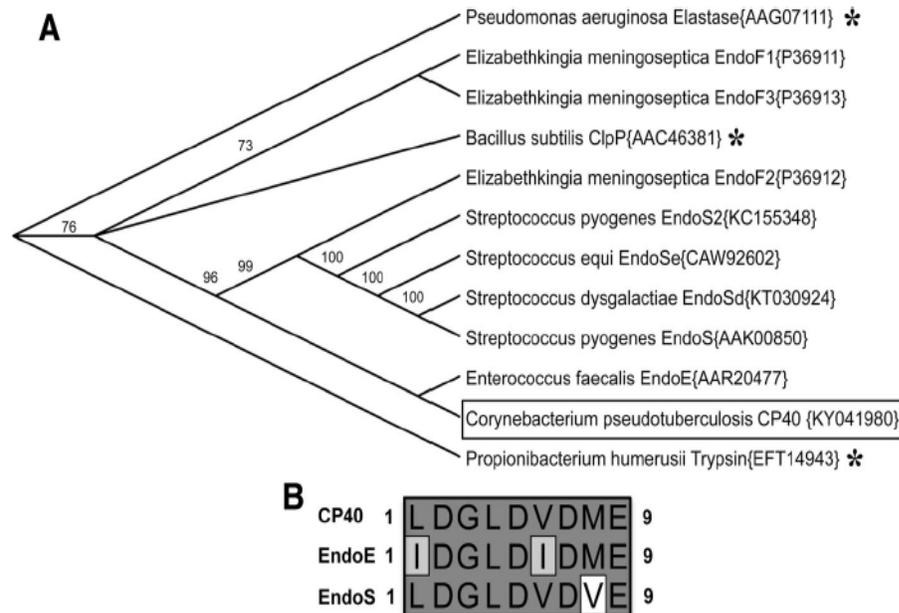
El mecanismo catalítico propuesto para SMasa D se ha estudiado mediante el análisis de la estructura de esta enzima en *Loxosceles laeta*. Este se basa en una reacción ácido-base donde los residuos del sitio catalítico involucran dos histidinas, H (12) y H (47), residuos de unión a  $Mg^{2+}$  y una red de enlaces de hidrógeno formada entre D (52), D (233) y N (252), este último mediante un enlace corto a G (48) (Figura 2) (Murakami *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006; Dias-Lopes *et al.*, 2013).

PLD presenta una secuencia ampliamente conservada en todas las cepas, y cuando esta se encuentra modificada se dificulta la capacidad de producir la enfermedad. A través del análisis del pan-genoma de 15 muestras de *C. pseudotuberculosis* se detectó la presencia del gen *pld* en todas las cepas analizadas. Solo una de estas cepas presentó una mutación en el extremo 3' del gen *pld*, lo que se relacionó con el hecho de que tuviera una menor capacidad de diseminación en el hospedero (Soares *et al.*, 2013).

#### II.4.2 Endoglicosidasa, CP40

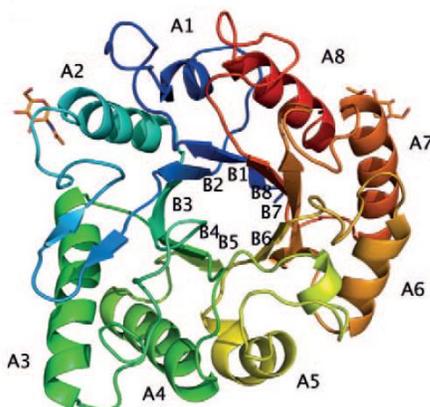
La proteína CP40 fue identificada en 1994 como antígeno con capacidad protectora contra la LAC (Walker *et al.*, 1994). El gen presenta un marco abierto de lectura de 1,137 pb y se encuentra ubicado corriente abajo del gen *pld* en la PiCp1. La proteína CP40 fue detectada en el sobrenadante del medio de cultivo de *C. pseudotuberculosis* mediante inmunoensayo, por lo que se caracterizó como proteína extracelular secretada por la bacteria (Walker *et al.*, 1994). Inicialmente fue descrita como enzima con actividad proteasa serina (Walker *et al.*, 1995), pero en el 2016 se realizó un estudio donde no se obtuvieron los mismos resultados, a lo que los investigadores asociaron la actividad proteasa inicial detectada, a restos de trombina empleada en la obtención de CP40 por vía recombinante. El árbol filogenético construido a partir de la secuencia de aminoácidos de CP40 permitió su agrupación más cercana junto a otras endoglicosidasas y más lejos de las secuencias de proteasas de serina (Shadnezhad *et al.*, 2016) (Figura 3). La actividad enzimática desarrollada por esta proteína es de endoglicosidasa mediadoras de la hidrólisis de enlaces glicosídicos, proteínas de la familia GH18, similar al dominio a- Endo E perteneciente a *Enterococcus faecalis* (Garbe *et al.*, 2012; Henrissat *et al.*, 1997). Las enzimas GH18 contienen una secuencia consenso conservada motivo (LIVMFY) - (DN) -G- (LIVMF) - (DN) - (LIVMF) - (DN) -X-E, donde el ácido glutámico terminal es esencial para la actividad enzimática (Henrissat *et al.*, 1997; Karlsson y Stenlid, 2008). Al alinear el sitio activo GH18 en CP40, quedo

establecida su similitud con las enzimas Endo S y Endo E, solo con cambios en uno o dos aminoácidos respectivamente (Figura 3B).



**Figura 3.** Reclasificación de CP40 como endoglicosidasa. **A.** Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de CP40 en comparación con secuencias de proteasas de serina y enzimas endoglicosidasas de diferentes especies de bacterias reportadas en el GenBank. El árbol se construyó basado en el método de Neighbor-joining, con 10 000 réplicas (bootstrap), generando un árbol consenso. Los asteriscos representan las secuencias de Serinas. **B.** Sitio activo de la familia 18 glicosil hidrolasa (GH18) de CP40 alineado con los sitios activos verificados de Endo E de *Enterococcus faecalis* y Endo S de *Streptococcus pyogenes*. Fuente: Figura tomada de Shadnezhad *et al.*, (2016).

Actualmente existen 49 estructuras de proteínas de la familia GH18 depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB), entre las que se encuentran algunas endoglicosidasas bacterianas como: Endo H [código de acceso PDB 1EDT] de *Streptomyces plicatus* (Rao *et al.*, 1999; Freeze y Kranz, 2010), Endo F1 [2EBN] y Endo F3 [1EOM] de *Flavobacterium meningosepticum* (Trimble *et al.*, 1991; Tarentino *et al.*, 1992, Giddens *et al.*, 2016), Endo BT [3POH] de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Genomics JCFS, 2010) y Endo S [6E58] de *Streptococcus pyogenes* (Trastoy *et al.*, 2014; Trastoy *et al.*, 2018). Las endoglicosidasas presentan una estructura en forma de  $(\beta\alpha)_8$  barril TIM, donde la secuencia de proteínas adopta una topología de hélices- $\alpha$  y hojas  $\beta$  en sucesiones alternas (Figura 4) (Stals *et al.*, 2012, Trastoy *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura cristalográfica de la endoglicosidasa EndoT de *Hypocrea jecorina*. El extremo N-terminal se representa en azul y el extremo C-terminal en rojo. En la figura se indica la nomenclatura de las hélices  $\alpha$  1 a  $\alpha$  8 y las hebras  $\beta$  1 a  $\beta$  8 que forman el barril ( $\beta/\alpha$ ) 8-TIM. Fuente: Figura tomada de Stals *et al.* (2012).

El sitio activo contiene dos residuos de aminoácidos conservados D (129) y E (131), identificados en el extremo de la cadena  $\beta$ 4 en EndoT [4AC1] de *Hypocrea jecorina*, siendo el ácido glutámico el donante de protones y el ácido aspártico un estabilizador secundario (Stals *et al.*, 2012). La Endo S de *Streptococcus pyogenes*, es una proteína de 108 kDa con cinco dominios, uno con actividad endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa que hidroliza los glicanos de la IgG humana, cortando entre dos residuos de N-acetilglucosamina centrales (Collin y Olsen, 2008). La función de CP40 como factor de virulencia se ha asociado a la capacidad demostrada *in vitro* de degradar la región Fc de anticuerpos IgG. La endoglicosidasa CP40 no hidroliza los glicanos en las IgG bovinas y caprinas, mientras que si hidroliza la IgG ovina y la IgG equina. También se realizó el análisis con todas las subclases de IgG humano, presentando actividad en todas y de manera parcial en IgG4. Se plantea que esto se debe a que el contenido total de los carbohidratos en la IgG caprina, tales como grupos fucosilados, terminales galactosidados y oligosacáridos bisectantes, es mucho más bajos que en los IgG humanos e IgG ovina (Raju *et al.*, 2000). CP40 no es una quitina general y como otros miembros de GH18 presenta preferencias por determinadas moléculas, ya que no hubo actividad enzimática detectable en otras glicoproteínas, incluidas otros isotipos de inmunoglobulina (IgA, IgD y IgA). A diferencia de la endoglicosidasa Endo S, CP40 es una enzima mucho más pequeña y carece de un sitio de unión a dominios de carbohidratos lo que podría explicar la falta de actividad contra los glicanos IgG con GlcNAc bisectante. La comparación de los cromatogramas de las moléculas hidrolizasas, resultado de

la actividad de CP40 y Endo S, indican que el sitio de escisión de glicanos por parte de CP40 es idéntico al de Endo S (Shadnezhad *et al.*, 2016). Esta proteína también ha sido ampliamente estudiada en los últimos años para su utilización como candidato en el desarrollo de vacunas y medios diagnósticos.

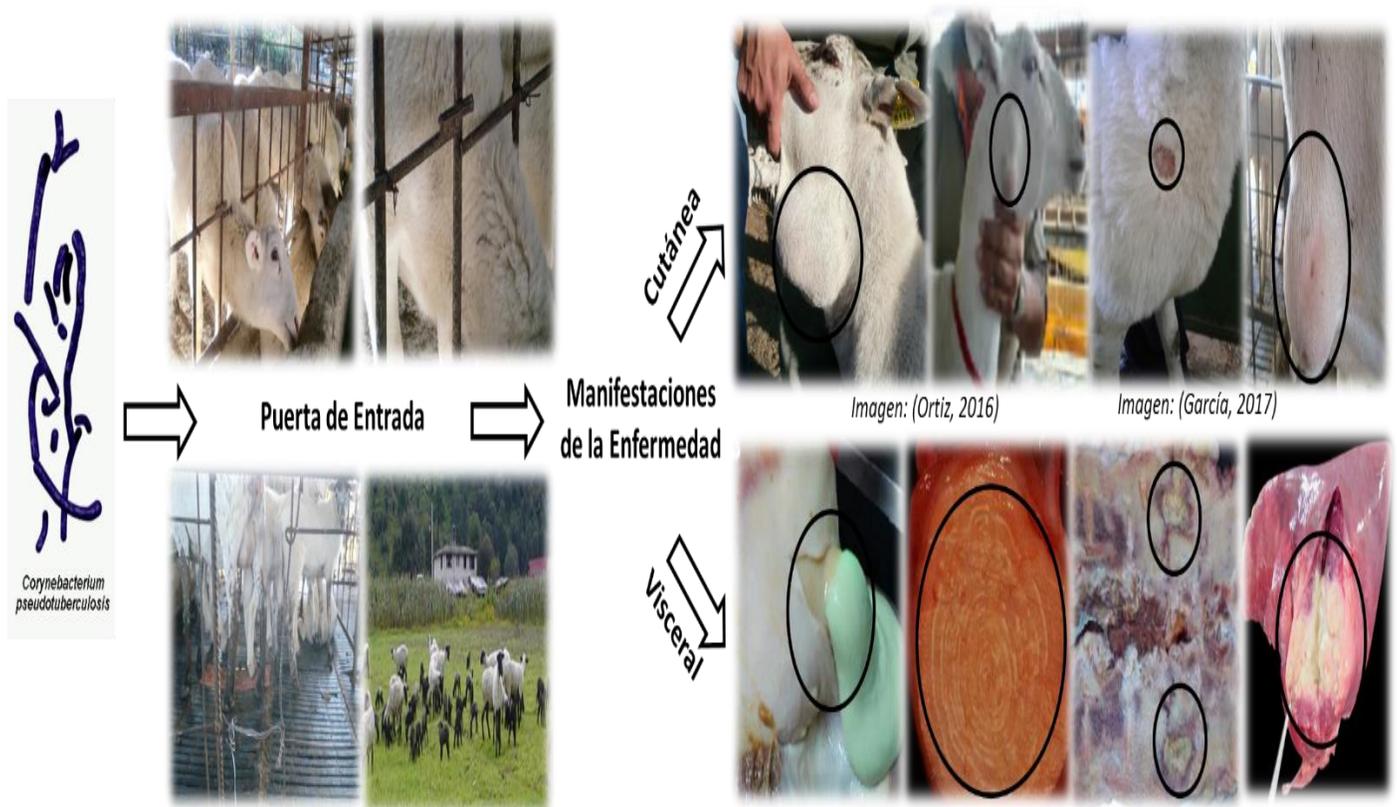
#### II.4.3 Proteínas Secretadas PLD y CP40

Según varios informes las proteínas exportadas o secretadas por la bacteria favorecen la infección ya sea involucradas en la adhesión e invasión de las células del hospedero, en la adquisición de nutrientes, toxicidad y en la evasión del sistema inmune (Pacheco *et al.*, 2011; Seyffert *et al.*, 2014). La expresión y secreción de las proteínas PLD y CP40 han sido sumamente estudiadas. El desarrollo de una infección experimental demostró mediante ensayos de inmunoblot que la producción de anticuerpos estuvo dirigida en un 88% al reconocimiento de proteínas de 30-31KDa (PLD) y en un 75%-88% hacia proteínas de 38-41KDa (CP40), rango en el que se encuentran ambas proteínas (Paule *et al.*, 2004). El análisis del exoproteoma de la cepa 1002 de origen brasileño, antes y después de la reactivación de la virulencia tras 2 pases en ratones BALB/c, mostró dos perfiles proteicos diferentes. Un total de 118 proteínas se expresaron de manera diferente, de estas 48 solo se detectaron en la cepa no virulenta y 32 en la cepa tras 2 pases en el modelo animal. El análisis por espectrometría de masas permitió la identificación de las proteínas PLD y CP40 únicamente en la cepa cuya virulencia fue reactivada. La cepa 1002 se había mantenido en el laboratorio y tras varios pases en medio de cultivo el perfil de expresión cambio, especialmente no mostrando proteínas efectoras relacionadas a la virulencia bacteriana. Sin embargo, en este estudio se demostró que tras 2 pases en ratones fue capaz de reactivar su virulencia (Silva *et al.*, 2017). Por otra parte, a través de PCR en tiempo real se identificaron *in vitro* e *in vivo* la expresión de varios genes involucrados en la virulencia entre ellos *pld* y *cp40*. Este análisis permitió constatar que en las cepas aisladas de nódulos linfáticos la expresión de estos genes fue superior en comparación con la cepa obtenida de cultivo *in vitro* (Correa *et al.*, 2018). Aún se continúa con el estudio de los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, para la obtención de moléculas con potencialidades para el desarrollo de vacunas potentes y eficaces.

#### II.5 PATOGÉNESIS Y MECANISMOS DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta principalmente a ovejas y cabras. Es causada por *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. La enfermedad por lo general se presenta de forma cutánea y/o

visceral (Mahmood *et al.*, 2015), y de manera atípica como toxemia neonatal o icterohemoglobinuria de recién nacidos, artrosinovitis, endometritis, mastitis y orquitis, coexistiendo varias manifestaciones de la enfermedad en el mismo animal (Othman *et al.*, 2016). La manifestación cutánea se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos subcutáneos, los cuales son visibles y palpables a través de la piel y su localización depende del punto de entrada del microorganismo. Las lesiones pueden aparecer como abscesos organizados, con inflamación, encapsulación fibrosa, pérdida de pelo sobrepuesto y ruptura eventual, dando como resultado la descarga de contenido purulento (Radostis *et al.*, 2000). En la forma visceral, los abscesos tienen lugar en los nódulos linfáticos internos, así como en pulmones, hígado y riñones, causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia el desarrollo de un curso crónico. Puede ocurrir que los nódulos necróticos internos bien encapsulados sean compatibles con un desarrollo vital aparentemente normal (Figura 5) (Odhah *et al.*, 2017; Odhah *et al.*, 2019).



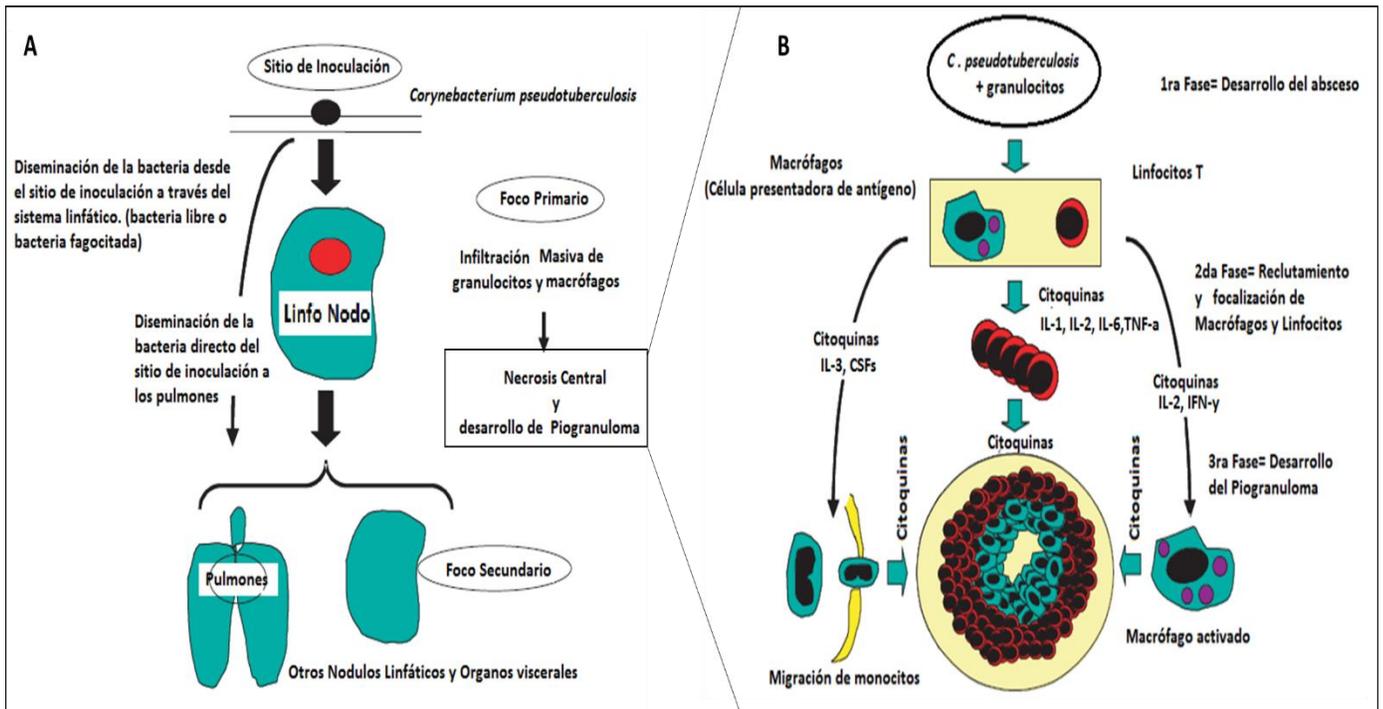
**Figura 5.** Manifestaciones de la Linfadenitis caseosa, formación de abscesos cutáneos y viscerales. Fuente Original.

La infección primaria ocurre en la herida puerta de entrada, con diseminación hematogena y linfática formando abscesos en los nódulos linfáticos más cercanos al sitio de entrada del microorganismo (parótidos, submandibulares, prefemorales, preescapulares, poplíteos o mamarios). Luego ocurre una infección secundaria con la formación de abscesos en nódulos linfáticos (torácicos, bronquiales y mediastínicos) y diversos órganos viscerales.

La enfermedad se instaura de modo insidioso y adopta un curso crónico, evolucionando hacia la recuperación cuando el contenido purulento escapa al exterior, al contrario de lo que ocurre en las formas viscerales graves donde se causa el deterioro de la condición orgánica del animal (Figura 6A). La prevalencia es mayor en cabras y ovejas adultas mayores de 1 año, existiendo correlación directa entre la edad y la prevalencia de la enfermedad (Chirino-Zarraga *et al.*, 2005; Al-Gaabary *et al.*, 2009).

La infección se inicia con el ingreso de la bacteria a través de lesiones en la piel generadas durante el manejo de los ovinos, como cortes de cola, marcaje de orejas, castración, esquila o en algunos casos lesiones generadas durante la alimentación con forraje espinoso que daña la mucosa oral. Los baños sanitarios también contribuyen a la infección, favoreciendo la entrada del microorganismo a través de pequeñas heridas de la piel contaminadas por abscesos abiertos (Dorella *et al.*, 2006a). El periodo de incubación es muy variable y prolongado, tanto en ovejas como en cabras se han observado periodos de incubación de 2 semanas o de meses (Al-Gaabary *et al.*, 2009; Odhah *et al.* 2017; Odhah *et al.*, 2009). Los nódulos mandibulares o parotidos y preescapulares son los más afectados de forma general (Al-Gaabary *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2015).

En ovinos la apariencia morfológica de los nódulos abscedados es la característica de capa de cebolla al presentar una distribución en láminas concéntricas fibrosas separadas por material caseoso. Por el contrario, en cabras los nódulos no presentan esta configuración, sino que el exudado es usualmente una pasta uniforme más bien seca. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza de las enzimas fagocíticas, siendo en las cabras de mayor actividad lítica que en las ovejas (Aleman y Spier, 2001). En el análisis histopatológico de los abscesos se observa en general un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una delgada capa de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epitelioides y neutrófilos, rodeado por una red de fibroblastos (Baird y Fontaine, 2007). Las características clínicas incluyen, anemia, leucocitosis con neutrofilia y altos valores de fibrinógeno, aumento de inmunoglobulinas (IgG) y aumento de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Paule *et al.*, 2003; Rebouças *et al.*, 2011; Odhah *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de patogénesis de la infección natural por *C. pseudotuberculosis* en ovejas: **A.** Diseminación **B.** Desarrollo de piogranuloma. Fuente: Figura modificada de Pepin y Paton, (2020).

En cabras los cambios histopatológicos observados en el tracto reproductivo y ganglios linfáticos después de la inoculación experimental con *C. pseudotuberculosis*, reveló infiltración leucocítica, así como congestión generalizada, degeneración, infiltración de células del estroma y necrosis en los ovarios. También se visualizaron lesiones leves, moderadas y degenerativas en las trompas de Falopio en los animales inoculados con ácidos corynomicólicos y con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* (Jesse *et al.*, 2020).

### II.5.1 Adhesión celular y multiplicación intracelular

En el establecimiento de la infección se requiere de la adhesión a las células del hospedero, multiplicación intracelular, diseminación a otros tejidos y persistencia. Los mecanismos involucrados en la adherencia y supervivencia intracelular de *C. pseudotuberculosis* en células no fagocíticas aún siguen siendo objeto de estudio por diversos investigadores. En estudios *in vitro* *C. pseudotuberculosis* fue capaz de adherirse e invadir la línea fibroblástica de células embrionarias de riñón ovino FLK-BLV-044, con replicación celular durante 24 horas después de la infección y viabilidad bacteriana

hasta 120 horas, con una correlación positiva entre la tasa de adherencia e invasión (Valdivia, 2015). Estos resultados sugieren que la instauración de la infección, así como, la persistencia puede estar favorecidas por la infección intracelular en tejido de la puerta de entrada y no solo por la infección de células fagocíticas. También se evidenció que la invasión celular de *C. pseudotuberculosis* depende de la concentración bacteriana, sugiriéndose la saturación de los receptores celulares a partir de una multiplicidad de infección (MOI) superior a 100 (Valdivia, 2015). La pre-incubación de *C. pseudotuberculosis* con azúcares y suero anti-*C. pseudotuberculosis* inactivado y completo, sugiere que se produce el bloqueo de receptores bacterianos específicos y/o ligandos celulares al observarse un drástico descenso en la tasa de internalización bacteriana. La invasión celular detectada mediante inmunofluorescencia, también demostró que las bacterias inactivadas por calor o radiación ultravioleta, no se localizaron en el interior celular, lo que sugiere que la internalización de *C. pseudotuberculosis* en células de la línea celular FLK-BLV-044 requiere de bacterias viables o que presenten los componentes de la superficie bacteriana intactos para interactuar con la superficie celular (Valdivia, 2015). En la puerta de entrada, la capacidad de persistencia en células no fagocíticas, así como el factor piógeno (ácidos corynomicólicos de la pared celular) y la exotoxina Fosfolipasa D (Mckean *et al.*, 2007), facultan al microorganismo para resistir las defensas antimicrobianas inespecíficas que se interponen a la infección, facilitando el acúmulo de fagocitos en el foco de multiplicación bacteriana. La bacteria es fagocitada por los macrófagos que son reclutados al sitio de infección y se ha demostrado mediante infección *in vitro* de la línea de macrófagos J774, que tienen la capacidad de permanecer viable dentro de estos hasta 72 horas, evadiendo los mecanismos de eliminación de patógenos que presentan los macrófagos (Mckean *et al.*, 2005; Valdivia, 2015; Stefanska *et al.*, 2010).

### **II.5.2 Mecanismos de evasión del sistema inmune**

Los macrófagos proveen protección al organismo al poner en marcha mecanismos inmunes innatos e iniciar el desarrollo de respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación de antígenos, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas (Duque y Rojas., 2007). Los productos reactivos de oxígeno (ROI) son muy tóxicos y participan en la eliminación de los patógenos provocando daños a nivel de ADN. La unión de partículas bacterianas a los receptores de la membrana del fagosoma del macrófago provoca el denominado “estallido respiratorio” que favorece la producción de NADH. Antes de que el lisosoma se fusione con el fagosoma, en éste último, tiene

lugar una reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) catalizada por la NADPH-oxidasa presente en la membrana del fagosoma. El anión superóxido resultante ( $O_2^-$ ) es tóxico por sí mismo, pero a su vez da lugar a otros radicales tóxicos de vida corta, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo (OH) y el oxígeno singlete ( $O^1_2$ ). Cuando el lisosoma se fusiona con el fagosoma, se libera la enzima mieloperoxidasa, que actúa sobre los peróxidos en presencia de haluros ( $I^-$  y  $Cl^-$ ), para producir compuestos halogenados (hipohaluros) muy tóxicos y de vida larga: ácido hipocloroso (ClOH), e hipoiódoso (IOH) (Abbas *et al.*, 2018a) (Figura 7A).

Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia para protegerse ante la acción del sistema inmune. Las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasas (SODs) y las Catalasas, intervienen en la eliminación de algunas moléculas generadas en la cascada de reacciones iniciada por NADPH oxidasa fagocítica. Las SODs constituyen una familia de tres metaloenzimas (FeSOD, MnSOD y CuZnSOD) con diferente localización intracelular y distribución que catalizan la conversión de los radicales superóxido en  $H_2O$  y  $O_2$ . En la mayoría de los casos, las SODs son producidas de forma constitutiva por los microorganismos. Se ha comprobado la presencia de Mn/FeSODs en *C. pseudotuberculosis* y se han realizado estudios de co-evolución basados en la secuencia de aminoácidos de esta enzima, para establecer la conservación y correlación que presenta, con enzimas SODs de diferentes hospederos y especies de Corynebacterias. El análisis filogenético permitió establecer las diferencias y similitudes evolutivas de las secuencias de esta enzima en hospederos como ovino, caprino, bovino, equino y el humano, así como con diferentes especies de Corynebacterias. También fue posible observar patrones de aminoácidos específicos para cada tipo de organismo y, por el contrario, algunos aminoácidos que se conservaron en todos los organismos, que se supone que participan en funciones cruciales de la actividad enzimática. Esto explicaría la capacidad que presenta una misma cepa de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* de permanecer en macrófagos de diferentes tipos de hospederos como ovinos y caprinos (Oliveira *et al.*, 2017b).

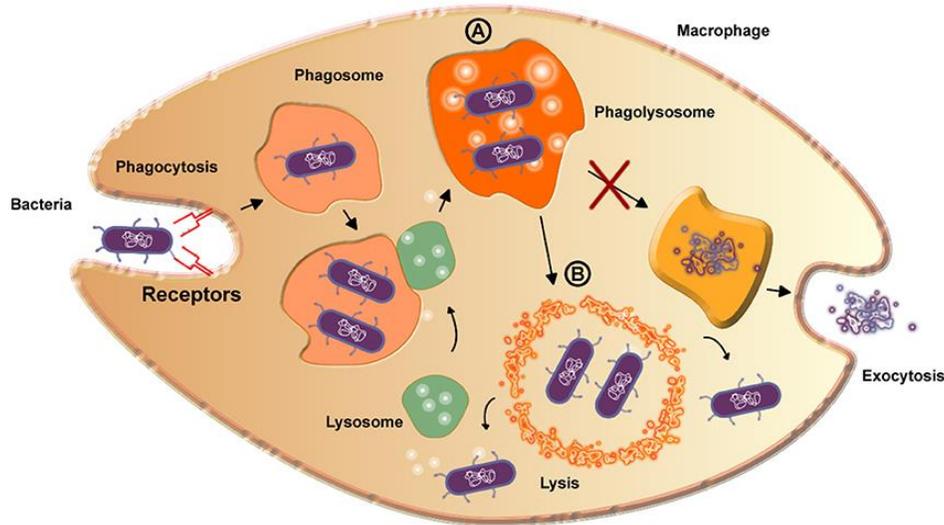
Otro estudio permitió establecer que los ovinos son una especie más sensible que las cabras al estímulo inhibitorio de la explosión respiratoria de los macrófagos y al efecto bactericida del suero, efecto que fue evaluado tras el contacto previo con *C. pseudotuberculosis*, hecho que podría dificultar la eliminación del patógeno por el sistema inmunológico (Valdivia *et al.*, 2015).

Las Catalasas son otro tipo de enzimas que intervienen en la defensa de las células frente al estrés oxidativo. *C. pseudotuberculosis* presenta la enzima catalasa (Bernard y Funke, 2012) que brinda

protección ante la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También los productos intermediarios de la enzima durante la reacción de dismutación, pueden unirse a el NADPH, lo que funciona como regulador de la actividad enzimática y disminuye la formación de otros productos de estrés oxidativo como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (O<sup>1</sup><sub>2</sub>) (Diaz *et al.*, 2003).

Otro mecanismo de eliminación de patógenos es mediado por los productos reactivos del nitrógeno (RNI). La enzima NOS (óxido nítrico-sintetasa) combina el oxígeno molecular con el nitrógeno guanidino de la L-arginina, para generar óxido nítrico (NO), que es tóxico para bacterias. Los macrófagos de ratón (pero no los humanos) necesitan para activar esta ruta a un nivel óptimo dos señales: interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) para activar la enzima NOS, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Se ha demostrado que el LPS puede favorecer la producción de TNF- $\alpha$  y el óxido nítrico, los cuales inducen apoptosis en los macrófagos por dos vías independientes (Comalada, 2002). En *C. pseudotuberculosis* la capa de LPS queda protegida por los ácidos corynomicólicos, lo que hace más difícil que el sistema inmune se active por el reconocimiento de esta estructura (Burkovski *et al.*, 2018). También el estudio *in vitro* de cepas de *C. pseudotuberculosis* mutantes del Factor Sigma, fueron más susceptibles a concentraciones de óxido nítrico, por lo que se propone que la presencia de este, protege ante este tipo de estrés oxidativo (Pacheco *et al.*, 2012).

Existen mecanismos independientes de oxígeno para la eliminación de los patógenos dentro de los macrófagos (Figura 7). Los cambios de pH tras la fusión del lisosoma primario a la vesícula de endocitosis (formación del heterofagosoma), donde se produce un aumento transitorio de pH (basificación) y luego una acidificación fuerte, son capaces de destruir muchos microorganismos. La producción de proteínas o péptidos antimicrobianos como las Defensinas, péptidos de 32-34 aminoácidos ricos en Cisteínas y Arginina que se han identificado en los macrófagos de conejo y en los PMN humanos, forman canales permeables a los iones en las bicapas lipídicas de los microorganismos. Estas son activas, sobre todo, durante el ascenso transitorio del pH que se produce antes de la acidificación. Las proteasas lisosómicas actúan a pH ácido y las lisozimas destruyen la pared del peptidoglicano. Las Lactoferrinas producidas por neutrófilos secuestran hierro, indispensable para las bacterias, incluso a pH ácido (Abbas *et al.*, 2018a). Sin embargo, la presencia de ácidos corynomicólicos en la estructura de la pared celular de *C. pseudotuberculosis* le otorga protección mecánica y posiblemente bioquímica, permitiéndole resistir la digestión por enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas y la acción de proteínas antimicrobianas (Figura 7A).



**Figura 7.** Representación esquemática de la infección de los macrófagos por *C. pseudotuberculosis*. **A:** El fagolisosoma aumenta el valor del pH, pero no es capaz de digerir la bacteria debido a la protección que le confieren los ácidos corynomicólicos de la pared celular, inhibiendo la exocitosis. **B:** aumenta la expresión de PLD, que destruye la membrana del fagolisosoma por lisis, exponiendo las bacterias al citoplasma, en el que pueden sobrevivir y reproducirse. Fuente: Figura tomada de Oliveira *et al.*, (2017a).

Existe una correlación positiva entre el contenido de estos lípidos, el grosor de la capa lipídica y la habilidad de producir lesiones en nódulos poplíteos de oveja. Los lípidos de la pared celular constituyen un factor piogénico, relacionado con la infiltración masiva de leucocitos polimorfonucleares, que transportan las bacterias a los nódulos linfáticos, y con el efecto leucotóxico que origina degeneración y lisis de macrófagos (Aleman y Spier., 2001; Burkovski *et al.*, 2018). La exotoxina PLD también contribuye a la resistencia y supervivencia de la bacteria en el interior de los macrófagos, ya que su acción enzimática hidroliza la esfingomiélin de las membranas celulares (Figura 7B) (Oliveira *et al.*, 2017a).

### II.5.3 Diseminación en tejidos y órganos

La exotoxina PLD cataliza la disociación de la esfingomiélin (Mao *et al.*, 2017), hidrolizando un componente importante de las membranas celulares, lo que provoca la lisis celular, incrementa la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edema. Esta enzima ocasiona reacciones de contracción celular y, como consecuencia, aumento de la permeabilidad capilar. De esta forma la PLD

actúa directamente sobre las células endoteliales en el entorno del punto de infección y en los macrófagos una vez que ha sido fagocitada la bacteria (Oliveira *et al.*, 2017a) (Figura 7B). La acción de la PLD facilita la colonización, la diseminación regional y sistémica de la bacteria, con la generación de abscesos en los nódulos linfáticos superficiales, debido al traslado del agente vía linfática hasta el linfonódulo regional (Dorella *et al.*, 2006a; Baird y Fontaine, 2007). Además, la PLD inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, y activa al complemento por la vía alternativa, ocasionando necrosis y trombosis de ganglio linfáticos, favoreciendo la supervivencia y multiplicación del microorganismo (Aleman y Spier, 2002; McKean *et al.*, 2007).

Las bacterias no controladas por la pared del absceso entran en los capilares y forman colonias que ocluyen los vasos generando isquemia que, junto a las toxinas, destruyen las células del tejido sano, aumentando la masa necrótica. Las bacterias viables se diseminan a través de los vasos linfáticos y penetran otros linfonodos, y eventualmente, en los vasos sanguíneos, llegando a diferentes órganos donde se repite la formación de abscesos. Este comportamiento origina la otra forma de la enfermedad que afecta nódulos linfáticos internos y órganos especialmente pulmón e hígado, como consecuencia de la diseminación hematógena desde el conducto eferente de los nódulos linfáticos con abscesos (Estevao *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2015; Odhah *et al.*, 2019).

*C. pseudotuberculosis* se libera como resultado de un proceso que conduce a la muerte de los fagocitos, aunque estos mecanismos específicos de muerte celular aún no están claros, se sabe que no inducen la autofagia o la apoptosis de los macrófagos. La Caspasa 3 es una proteína esencial en las etapas finales de inducción de apoptosis, así como cataliza la incisión de proteínas celulares y reparadoras de ADN. La proteína I asociada a microtubulos de cadena ligera 3 (MAP LC3-I) es una proteína de membrana crucial en la formación de autofagosomas, es un marcador del mecanismo de muerte por autofagia. Estudios realizados *in vitro* mediante la infección de la línea de macrófagos J774 con *C. pseudotuberculosis*, permitió determinar que los niveles de la MAP LC3-I y la actividad de la caspasa-3, se mantuvieron estables, sin variación en las células infectadas (Stefanska *et al.*, 2010). En otros trabajos la necrosis se ha visto favorecía en vez de la apoptosis, en macrófagos infectados con *C. pseudotuberculosis*, provocando cambios degenerativos como: ruptura de la membrana plasmática, alteraciones en las mitocondrias, cambios en la envoltura nuclear, dilatación de la envoltura del núcleo y de la membrana del retículo endoplasmático rugoso y formación de vesículas en el citoplasma (Hard *et al.*, 1972; Tashjian y Campbell, 1983).

#### II.5.4 Respuesta del Sistema Inmune

Los mecanismos inespecíficos de defensa, la fagocitosis, el sistema complemento y la respuesta inmune humoral son ineficientes en el control de las infecciones provocadas por bacterias intracelulares. La activación del sistema inmune celular es de vital importancia para la eliminación de estos microorganismos, siendo la respuesta de células T en sus versiones citotóxica y de tipo hipersensibilidad retardada, las encargadas de combatir a las bacterias intracelulares (Abbas *et al.*, 2018b). Los antígenos proteicos bacterianos son presentados a linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el contexto del MHC (por sus siglas del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) clase II y a linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través del MHC I, de células presentadoras de antígenos. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se activan y luego de proliferar, a células T cooperadoras, secretan citoquinas que atraen y activan macrófagos estimulando su poder fagocítico y microbicida. También contribuyen a estimular y activar los linfocitos B y la producción de anticuerpos. Debido a la persistencia y la capacidad de supervivencia de las bacterias, esta respuesta de células T se manifiesta como una inflamación mediada por las citoquinas que atraen más macrófagos originando la formación de piogranulomas, estructuras que pretenden localizar la infección. El sistema inmune del hospedero intenta restringir y limitar la diseminación de la infección a través de la formación de estas estructuras, que tienen lugar por el acumulo de macrófagos, células dendríticas, células epitelioides, linfocitos y citoquinas pro-inflamatorias. El portador de estas estructuras suele desarrollar hipersensibilidad retardada que se manifiesta como una respuesta más vigorosa que conduce a necrosis y fibrosis del granuloma. De esta manera, la respuesta inmune del hospedero es la principal causa de daño tisular y efectos sistémicos propios de la enfermedad. (Paule *et al.*, 2003; Bastos *et al.*, 2012, Seyffert *et al.*, 2014).

El estudio de la respuesta del sistema inmune en un modelo experimental permitió establecer que la respuesta humoral comienza entre el día 6 y 11 post infección. En las etapas tempranas de la infección se produce la expresión IFN- $\gamma$  siendo su duración de vida corta, seguido de una segunda producción de citoquinas más fuerte y duradera en el tiempo. La producción de citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL6 tienen lugar en el sitio de inoculación, mientras que el IFN- $\gamma$  se encuentra en los linfonódulos drenados. Se plantea que la patogénesis se relaciona con la producción de citoquinas y los niveles de piogranulomas (Figura 7B) (El-Enbaawy *et al.*, 2005; Dorella *et al.*, 2009).

Los estudios inmunohistoquímicos sobre la composición celular de las lesiones pulmonares en ovejas infectadas por *C. pseudotuberculosis* han puesto de manifiesto un predominio de macrófagos grandes

en las paredes del absceso, rodeando el parénquima pulmonar, con expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Los linfocitos T fueron prominentes en las lesiones, los linfocitos B y granulocitos comprendían una porción menor en los infiltrados celulares. Dentro de las lesiones encapsuladas se encontraron linfocitos y células MHC II en el centro de la masa necrótica. Rodeando esta región se identificaron células CD5<sup>+</sup>, así como células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> distribuidas a través del tejido linfático. Generalmente en las lesiones caseosa inmaduras se encuentran linfocitos T CD4<sup>+</sup> y en las lesiones más desarrolladas la concentración de células T CD8<sup>+</sup> es predominante, lo que se relaciona con el mecanismo del sistema inmune para evadir la diseminación de los macrófagos infectados. Estos datos revelaron la participación de macrófagos y de la respuesta mediada por MHC clase II, restringido a linfocitos T en la patogénesis de la LAC (Paule *et al.*, 2003, Dorella *et al.*, 2009).

Las células T CD8<sup>+</sup> generadas después de una infección aguda son altamente funcionales y constituyen un componente importante de la inmunidad protectora. Sin embargo, se ha comprobado que las infecciones crónicas a menudo se caracterizan por ocasionar deterioro funcional en la respuesta de células T, siendo una de las principales razones de la incapacidad del hospedero para eliminar el patógeno persistente. Las células T efectoras se generan durante las primeras etapas de la infección y gradualmente pierden la función durante el curso de la infección crónica. Este fenómeno de células T exhaustas o células T disfuncionales, fue descrito por primera vez en ratones con infección persistente causada por el virus de la Coriomeningitis linfocítica (LCMV) (Gallimore, 1998). A diferencia de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> altamente robustas, generada después de una infección aguda, las células T CD8<sup>+</sup> específicas generadas ante una infección crónica persistente se vuelven exhaustas y disfuncionales (Wherry *et al.*, 2003). Este fenómeno de producción de linfocitos T exhaustos también ha sido caracterizado en humanos con infecciones crónicas establecidas por el virus VIH (Letvin y Walker, 2003) y Virus de la Hepatitis B y C (Rehermann *et al.*, 2005).

Estudios realizados en ratones con infección crónica mediada por el virus LCMV, evidenciaron que el receptor PD-1, (inhibidor de CD28 (Saavedra- Hernández, 2013): CD28 co-estimulador esencial para iniciar las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>), presentó una sobreexpresión sostenida, en comparación con los animales que desarrollaron la enfermedad aguda donde no se detectaron niveles de PD-1 (Barber *et al.*, 2006). La molécula PD-1 es un receptor inhibidor que en unión a sus ligandos PD-L1/PD-L2, participa en la finalización de las respuestas inmunitarias, inactivando los TCR (por sus

siglas en inglés, *T cell Receptor*) (Gary y Koretzky, 2008). El uso de anticuerpos para el bloqueo del ligando PD-L1, provocó un aumento en la producción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> durante la infección crónica experimental, así como un aumento en sus capacidades de producir TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Barber *et al.*, 2006). Por tal motivo la expresión del receptor PD-1 se consideró una de las causas de la producción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos. Las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel importante en el mantenimiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos. La función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> durante una infección aguda y una infección crónica persistente fue evaluada utilizando como modelo ratones infectados con el virus LCMV (Matloubian *et al.*, 1994). Los ratones con infección aguda y depleción de células T CD4<sup>+</sup>, fueron capaces de generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8<sup>+</sup> específicos contra LCMV, eliminando el virus con una cinética similar a la de los ratones de control. Mientras que los animales inoculados con la cepa del virus que conduce a una infección crónica, unido a la inoculación de una dosis mínima de anticuerpos anti-CD4<sup>+</sup>, se convirtieron en portadores de por vida con altos niveles de virus en la mayoría de los tejidos y una disminución en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En las infecciones virales las células T CD4<sup>+</sup> son prescindibles en la resolución de infecciones agudas a corto plazo en las que no es necesario mantener la actividad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> durante más de 2 semanas. Sin embargo, en condiciones de infección crónica, en las que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tardan varios meses o más en eliminar la infección, la función de las células T CD4<sup>+</sup> es fundamental (Matloubian *et al.*, 1994). Estos hallazgos tienen implicaciones para las infecciones crónicas y persistentes en general y pueden proporcionar una posible explicación de la pérdida de actividad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, cuando las células T CD4<sup>+</sup> se vuelven limitantes. Para controlar las infecciones mediadas por bacterias intracelulares es importante lograr una respuesta prolongada de células T CD8<sup>+</sup> (respuesta de memoria), por lo que se han intensificado los estudios para entender como modular este tipo de respuesta inmune celular (Martin y Badovinac, 2018). A pesar de existir algunas similitudes a nivel molecular, epigenético, metabólico y funcional entre las células T CD8<sup>+</sup> efectoras y las T CD8<sup>+</sup> de memoria, éstas últimas persisten por largos periodos de tiempo y son capaces de proliferar posterior al re-encuentro con el antígeno.

La primera caracterización de la heterogeneidad dentro de un grupo de células T CD8<sup>+</sup> de memoria de origen indefinido en humanos describió dos subconjuntos: efector de memoria con receptores CD62L<sup>lo</sup> /CCR7<sup>lo</sup> (Tem) y células de memoria central con receptores CD62L<sup>hi</sup> / CCR7<sup>hi</sup> (Tcm). La expresión de CCR7 y CD62L en células Tcm facilita la localización en los órganos linfoides secundarios,

mientras que las células Tem son más citolíticas, expresan integrinas y quimiocinas, receptores necesarios para la localización en tejidos periféricos inflamados (Martin y Badovinac, 2018).

La expresión del factor de transcripción T-bet (Kallies y Good-Jacobson, 2017) dirige la diferenciación hacia los linfocitos efectores en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, mientras que la expresión de un factor de transcripción diferente, Blimp-1, promueve la generación de linfocitos memoria (Welsh *et al.*, 2009; Kaech y Cui, 2012). Las proteínas antiapoptóticas que promueven la supervivencia de los linfocitos T memoria son Bcl-2 y Bcl-XL, las cuales bloquean la apoptosis en estas células de memoria. La presencia de estas proteínas permite a los linfocitos memoria sobrevivir incluso después de eliminarse el antígeno y de que la respuesta inmunitaria innata haya desaparecido, cuando ya no están presentes las señales normales para la supervivencia y proliferación del linfocito T (Zhang y He, 2005; Wojciechowski *et al.*, 2007; Dunkle *et al.*, 2013). Las células memoria que quedan del clon expandido suelen ser de 10 a 100 veces más numerosas que el grupo de células vírgenes antes del encuentro con el antígeno. El tamaño aumentado del clon es una razón de que el encuentro con el antígeno en un animal inmunizado previamente, induce una respuesta más fuerte que la primera inmunización. Los linfocitos memoria responden con mayor rapidez a la estimulación antigénica que los linfocitos vírgenes específicos frente al mismo antígeno. Esta diferenciación acelerada podría deberse a que los loci génicos para las citocinas y otras moléculas efectoras están fijos en un estado accesible de la cromatina en los linfocitos memoria, en parte debido a cambios en la metilación y acetilación de las histonas (Purushe y Zhang, 2018). Estos genes con modificaciones epigénicas tienden a responder rápidamente ante el encuentro con el antígeno (Tough *et al.*, 2019).

La citocina IL-7 es importante para el mantenimiento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> memoria, desempeña un papel clave en el desarrollo temprano del linfocito y en la supervivencia de los linfocitos T vírgenes (Melchionda *et al.*, 2005).

La IL-7 y la IL-15 inducen la expresión de proteínas antiapoptóticas y estimulan una proliferación ligera, que mantienen las poblaciones de linfocitos T memoria durante períodos largos (Rubinstein *et al.*, 2008). También la IL-2 (Raeber *et al.*, 2018) y la IL-12 (Kosaka *et al.*, 2006) favorecen el mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria.

El papel del TLR2 (por sus siglas del inglés, *Toll-Like-Receptor 2*) en la homeostasis de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, en ausencia de un antígeno específico, está involucrado en el control directamente de la proliferación de estas células y la secreción de IFN- $\gamma$ . Un estudio demostró la participación del

TLR2 en la activación de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, provocando un aumento en su proliferación y expansión inducida por IL-7 tanto *in vitro* como *in vivo*. También se evidenció que los ligandos de TLR2 actúan en sinergia con IL-2 para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  *in vitro*, citocina que regula la diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (Sercan *et al.*, 2010). También otro estudio comprobó que el TLR2 aumenta la activación de las células T CD8<sup>+</sup> y permite la generación de células de memoria funcionales en respuesta a una señales bajas o ineficientes del TCR (Mercier *et al.*, 2009). En conjunto, estos datos apoyan la idea de que la señalización continua de TLR2 podría contribuir directamente al mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria en el organismo (Cottalorda *et al.*, 2009).

## II.6 TRATAMIENTO

El tratamiento con antibióticos se ve afectado debido a la encapsulación del microorganismo en los abscesos (Aleman y Spier, 2001; Williamson, 2001) y a su naturaleza intracelular, por lo que el procedimiento quirúrgico de lesiones externas se ha sugerido como una alternativa válida. Reportes de la evaluación *in vitro* de la sensibilidad a la acción de antibióticos evaluado en cepas de *C. pseudotuberculosis* provenientes de diferentes hospederos, mostraron por el método de difusión que, amoxicilina-clavulánico, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacino, cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, gentamicina, imipenem, kanamicina, norfloxacina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y vancomicina fueron activos frente al 100% de los aislamientos, mientras que amicacina presentó resultados variables. Por el método de dilución los antibióticos más activos correspondieron a los grupos de cefalosporinas, gluco-péptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclina, con menor actividad los b-lactámicos y aminoglucósidos (Gallardo *et al.*, 2019). Otro estudio de resistencia antimicrobiana realizado a partir de aislamientos de exudados de camellos, permitió identificar la sensibilidad a ciprofloxacino (100%), trimetoprim/sulfametoxazole (100%), streptomina (96%), amicacina (85%), neomicina (80%), gentamicina (86%), TE (80%), y novobiocin (85%), mientras que fueron resistentes a vancomicina (100%), penicilina G (90%), metronidasol (87%) y rifampicina (79%) (Fouad *et al.*, 2019).

En otro análisis de aislamientos en China todas las cepas fueron sensibles a vancomicina, norfloxacina, cefradina, claritromicina y cefepima, pero resistente a nitrofurantoína y furazolidona (Li *et al.*, 2018a). Mientras que aislamientos provenientes de Kosovo, fueron susceptibles a la oxitetraciclina (100%), amoxicilina / ácido clavulánico (100%), cloxacilina (95.8%), gentamicina (91.7%), seguido de

trimetoprima (83.3%) y altamente resistentes a estreptomina (83.3%) y penicilina G (62.5%) (Robaj *et al.*, 2017). Según la Organización mundial de sanidad animal (OIE), la LAC se encuentra en la lista de enfermedades prioritarias para las cuales se necesita el desarrollo de vacunas eficaces, para reducir el uso indiscriminado de antimicrobianos (OIE, 2018).

Algunos trabajos se han enfocado en la búsqueda de compuestos alternativos al uso de antibióticos. La evaluación de la actividad antibacteriana de diferentes extractos de *Moringa oleífera*, estableció que el extracto en base a etanol, presentó efecto antibacteriano contra *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter spp*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa*. (Fouad *et al.*, 2019). El uso del butirato de sodio como tratamiento alternativo, fue capaz de disminuir la infectividad de *C. pseudotuberculosis* en la línea de macrófagos RAW264.7 y el conteo de colonias a partir de muestras de bazo de ratones C57BL/6 infectados. El mecanismo de acción de este compuesto puede estar relacionado con el hecho de que disminuye la expresión de los genes *sodC* (Zn / Superóxido dismutasa), *spaC* (proteína C), *pld* (exotoxina PLD), y aumenta la expresión del gen *cramp* que codifica para un péptido antimicrobiano (Zhou *et al.*, 2019). El tratamiento de heridas quirúrgicas resultantes de la escisión de lesiones superficiales con una crema a base de nano partículas de plata AgNP, se comparó con el método de tratamiento posquirúrgico estándar, donde se emplea solución de yodo 10%, presentando resultados eficientes, así como, una acelerada cicatrización (Stanisic *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019). Debido a las características de la patogénesis, el curso crónico y poca respuesta al tratamiento, la enfermedad es compleja de erradicar en las granjas de producción una vez que se establece, por lo que es necesario continuar con el estudio de moléculas candidatas para la producción de vacunas.

## II.7 VACUNAS LAC

La vacunación es el método más efectivo para controlar la salud animal y humana, establecer programas de control de enfermedades y reducción del uso de agentes antimicrobianos. Mediante la vacunación se busca prevenir y controlar la aparición de una enfermedad y reducir la transmisión del agente patógeno.

### II.7.1 Vacunas comerciales

La mayoría de las vacunas comerciales actualmente disponibles para LAC, son polivalentes presentando una combinación de antígenos de varios agentes patógenos incluyendo *C.*

*pseudotuberculosis*. Estas usualmente son vacunas inactivadas que utilizan una suspensión de cultivos totales de *C. pseudotuberculosis*, el cual presenta abundante exotoxina PLD, ya que es considerada el antígeno con mayor capacidad inmunogénica (Hodgson *et al.*, 1999, El-Enbaawy *et al.*, 2005).

La vacuna Glanvac 3 (Zoetis, London) es un toxoide, que presenta una combinación de toxinas de *Clostridium perfringens* Tipo D, *Clostridium tetani* y *C. pseudotuberculosis* con 0,1 mg/mL de Tiomersal como preservante (Zoetis, 2020). Los productores ovinos del Reino Unido informan un buen control de campo después del uso de la vacuna Glanvac 3, importada desde Australia, a pesar de presentar diferencias fenotípicas en la clínica de la enfermedad (Fontaine, 2015; Silk y Lovatt, 2016).

La Glanvac 6® (Zoetis, West Ryde, Australia), es inactivada y presenta una formulación multicomponente que incluye antígenos ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis* (toxina PLD), *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novy* tipo B, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei* (Paton, *et al.*, 1995). Esta vacuna reduce las manifestaciones clínicas de la enfermedad y el desarrollo de lesiones pulmonares. El programa de vacunación indica la administración de dos dosis separadas por un intervalo de 1 mes y un refuerzo anual (Windsor, 2014; Windsor y Bush., 2016). El empleo de esta vacuna en los programas de prevención contra LAC se ha reportado en Australia, Canadá y Nueva Zelanda, presentando una pobre respuesta serológica y una reducción mínima de la incidencia de la enfermedad (Williamson, 2001; Windsor y Bush., 2016).

En Australia es administrada tanto a ovejas como cabras y varios ensayos de campo han mostrado tasas de protección variables. En 1995 la prevalencia promedio de LAC en ovejas adultas en rebaños vacunados era de 97% en Nueva Gales del Sur, 91% en Victoria y el 88% en Australia Occidental. Para el 2003 la prevalencia promedio estimada de LAC en la población de ovejas adultas había disminuido a un 29% en Nueva Gales del Sur, 26% en Victoria y 20% en Australia Occidental. Además, el estudio permitió establecer que solo el 43% de los productores usaban la vacuna y de estos solo el 12% seguían de manera adecuada las indicaciones del fabricante (Paton *et al.*, 2003; Windsor, 2014).

En Canadá en 1998 se realizó una evaluación de la eficacia de esta vacuna en comparación con la vacuna comercial Case-Bac y una vacuna experimental compuesta por muramil dipéptido. Glanvac 6 y la vacuna experimental presentaron un mayor título de anticuerpos que Case-Bac, durante 6 a 12 meses; sin embargo, Glanvac 6 provocó también un elevado número de manifestaciones de alergia en el sitio de inoculación (Stanford *et al.*, 1998).

En España la compañía Zoetis comercializa la vacuna inactivada Biodectin™, la cual está compuesta por la combinación de seis fracciones antigénicas: Moxidectina (antiparasitario), *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Tipo B, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* Tipo D, *C. pseudotuberculosis* y *Clostridium chauvoei*, hidróxido de aluminio y Tiomersal. Esta se emplea en los programas habituales de vacunación y desparasitación mediante inyección subcutánea de 2mL del producto en animales de hasta 50kg y de 3mL en animales de 51 a 75kg. Se recomienda la revacunación anual y su uso en ovejas gestantes, revacunando de 4 a 6 semanas antes de la fecha del parto, con el fin de lograr tanto una transferencia óptima de los anticuerpos calostrales como para evitar la infestación parasitaria de los corderos (Zoetis, 2020).

La empresa Colorado Serum produce la vacuna Case-Bac (Colorado Serum, EUA), compuesta por toxina PLD, utilizada en ovejas para prevenir LAC. Esta vacuna se administra por vía subcutánea, 2mL y se repite la vacunación a las 4 semanas, siendo todos los animales revacunados anualmente. Los anticuerpos maternos podrían interferir con la inmunidad activa, por lo que se debe esperar hasta que el animal tenga 3 meses de edad para comenzar la serie de vacunación primaria. Puede causar reacción adversa en el sitio de inyección, letargo, rigidez y fiebre en las cabras.

También existe la vacuna Caseous D-T (Colorado Serum, EUA) compuesta por toxinas de *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani* y PLD de *C. pseudotuberculosis*. Se ha demostrado que este producto ayuda en la prevención y el control de LAC, aunque se pueden observar leve cojera (dolor) en corderos, letargo, en un porcentaje elevado de los animales maduros después de la vacunación (Valleyvet, 2020). En Estados Unidos se han empleado Case-Bac y Caseous D-T para el control de LCA. Se ha demostrado en estudios experimentales que Case-Bac previene la formación de abscesos internos y externos en ovejas, antes del desafío con *C. pseudotuberculosis*. Aunque Case-Bac no tiene licencia para su uso en cabras, se ha utilizado de forma limitada en esta especie. La vacuna no parece ser tan efectiva como en las ovejas, ya que los efectos secundarios tienden a ser más severos provocando fiebre, malestar general, edema ventral, ataxia y convulsiones (Williamson, 2001). Otra de las vacunas comerciales inactivas para la inmunización de ovinos y caprinos, es la vacuna de la USDA (Nacional Animal Disease Center, Ames, IA USA) que contiene pared celular de *C. pseudotuberculosis* no viable con o sin muramyl dipéptido (Bastos *et al.*, 2012).

Vacunas comerciales elaboradas a partir de cepas vivas atenuadas también se han utilizado, como la vacuna LinfoVac (Laboratorios Vencofarma do Brasil), que contiene la cepa viva atenuada (1002) de

*C. pseudotuberculosis* y se ha autorizado para su uso en Brasil. Esta vacuna está disponible en suspensión líquida y se debe administrar anualmente a los animales, por vía subcutánea, con un refuerzo a los 30 días post vacunación y luego una sola dosis por año. La vacuna ha conferido una protección en un 80% en ensayos experimentales (Dorrella *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2018). Brasil también cuenta con licencia para el uso de Biodetin (Fort Dodge Australia PTY LTD) (Guimares *et al.*, 2011). La protección proporcionada por las vacunas comerciales está asociada a la producción de anticuerpos anti-exotoxina PLD, los cuales protegen contra el daño tisular y la diseminación del microorganismo; sin embargo, es una protección parcial ya que estas vacunas no son capaces de activar la respuesta inmune celular, necesaria para eliminar las bacterias intracelulares. Por tal motivo diferentes grupos de investigadores han trabajado en el desarrollo de vacunas experimentales que permitan una protección completa y eficaz. En México no se cuenta con ninguna de las vacunas comerciales existentes, y a pesar de la presencia de la Empresa Zoetis, ésta no oferta la vacuna dentro de sus productos (Zoetis, 2020).

### **II.7.2 Vacunas experimentales: Inactivadas y toxoides**

Las vacunas inactivadas están compuestas por cultivos totales de la bacteria no viables o toxinas, inactivados ya sea por métodos químicos o físicos. En estas formulaciones el microorganismo se encuentra muerto por lo que no confieren peligro de desarrollo de la enfermedad; sin embargo, la respuesta principalmente es de tipo humoral, menos intensa, requiere de altas concentraciones del microorganismo y de varias dosis. No son sometidas a ningún procedimiento de purificación, por lo que contienen todos los componentes bioquímicos de la bacteria los cuales son más reactógenos y pueden producir efectos adversos (Jorge y Dellagostin, 2017). Dentro de las vacunas experimentales a base de toxoide, se evaluó un precipitado proteico, con elevada concentración de PLD inactivada, de una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada de alpaca en Perú. La inmunización de un grupo de 20 ratones BALB/c indujo protección ante el desafío con  $10^4$  UFC de una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. La vacuna redujo los efectos tóxicos de *C. pseudotuberculosis*, con la disminución del número y tamaño de abscesos en los animales del grupo vacunado (40% afectado) comparado con los múltiples abscesos de mayor tamaño a nivel subcutáneo y en riñón e hígado, encontrados en los animales del grupo control (95% afectado). Sin embargo, cuando se analizaron los intervalos de confianza, se observó que no existían diferencias significativas entre los grupos control y vacunados (Medrano *et al.*, 2003).

También se reportó en Egipto la comparación de la eficacia de cuatro vacunas no comerciales en base a PLD como antígeno principal, para estimular la respuesta inmune en ovinos, ante el desafío con una cepa virulenta. La primera vacuna se formuló como toxoide en base a PLD, la vacuna 2 con PLD + bacteria inactivada, la vacuna 3 presentó PLD + vacuna comercial Covexin8 (antígenos de *Clostridium spp.*, Schering Animal Health) y la vacuna 4 toxina PLD + vacuna polivalente de *Clostridium spp.* producida por un instituto de investigación local. Se determinaron los niveles de iones superóxido como respuesta inmune inespecífica, siendo estos elevados en los grupos de animales vacunados. La actividad de lisozimas fue superior en el grupo vacunado con PLD toxoide + bacterina, seguido de PLD toxoide, PLD + vacuna comercial Covexin8 y la vacuna experimental local. La respuesta inmune celular se determinó mediante el Kit colorimétrico de medición de proliferación celular ELISA BrdU colorimetric kit (Roche). El grupo vacunado solo con PLD mostró una marcada respuesta positiva de proliferación de linfocitos en comparación con el resto de los grupos. Los resultados indicaron que PLD estimuló la respuesta inmune celular específica e inespecífica (Syame *et al.*, 2018).

El grupo de trabajo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM, a partir de los aislados caracterizados provenientes de Jalisco (Varela *et al.*, 2018), desarrollaron una vacuna experimental, compuesta por cultivos totales inactivados. Se emplearon los aislamientos H14X y 1.2 2J-L, debido a que presentaron características bioquímicas diferenciales, la presencia de los genes de virulencia *pld*, *hsp60*, *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fag D* (Hernández, 2015), así como desarrollaron cuadros clínicos graves en los hospederos. La composición antigénica de la bacterina se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE, demostrándose la presencia de proteínas de 14,17, 28, 31, 75, 108 y 125 kDa, rango dentro del que se encuentran los principales factores de virulencia (Ortiz, 2016). Posteriormente se evaluó la capacidad protectora de la vacuna en ovinos desafiados con la cepa 43926 ATCC biovar *ovis*. Luego del desafío en los animales del grupo vacunado no se observaron lesiones ni signos clínicos de la enfermedad a diferencia del grupo control, donde 3 de 4 animales desarrollaron abscesos en pulmón y nódulo linfoide. La detección de anticuerpos anti *C. pseudotuberculosis* se realizó mediante ELISA y se observó un aumento en la absorbancia, en las muestras provenientes de animales vacunados con la segunda dosis de inmunización, pero el análisis estadístico arrojó que la diferencia entre los grupos no era significativa. La vacuna de cultivos totales inactivados de las cepas H14X y 1.2 2J-L fue capaz de conferir protección, aunque deben ampliarse los estudios para determinar qué respuestas protectoras del sistema inmune fueron activadas por esta vacuna (García, 2017).

### II.7.3 Vacunas atenuadas

Las vacunas atenuadas presentan agentes inmunizantes vivos que pueden replicarse en el organismo sin causar la enfermedad, ya que carecen de determinadas estructuras o moléculas que disminuyen su virulencia. En principio confieren una respuesta inmune muy intensa y de larga duración ya que dan lugar a una infección similar a la natural. Sin embargo, estas constituyen un riesgo al estar formadas por microorganismos vivos que puede revertir la virulencia y desencadenar la enfermedad (Jorge y Dellagostin, 2017).

Las primeras vacunas atenuadas experimentales para LAC empleaban una cepa denominada Toxminus, cuyo gen *pld* cromosómico fue inactivado. La necropsia de los animales vacunados con  $10^5$  a  $10^7$  UFC de la cepa atenuada Toxminus, permitió observar que no se formaron abscesos en los animales desafiados con  $10^6$  UFC de una cepa virulenta, en comparación con el grupo control donde se desarrollaron abscesos de 2.5 cm en nódulos poplíteos. Sin embargo, la vacuna produjo un absceso indeseable en el sitio de inoculación, el título de anticuerpos en los grupos vacunados con  $10^5$  a  $10^7$  UFC fue similar por lo que la respuesta no fue dosis dependiente y la cepa virulenta de desafío indujo una respuesta de anticuerpos superior en las semanas 5 y 9. También hubo una reducción en la capacidad de Toxminus de permanecer en el hospedero, debido a la ausencia de PLD, ya que es el antígeno que favorece la persistencia, así como activa de manera elevada la respuesta inmune humoral (Hodgson *et al.*, 1992).

Teniendo en cuenta el papel que juega PLD durante el desarrollo de la respuesta del sistema inmune, en otro estudio se transformó la cepa Toxminus con un plásmido que contenía el gen de *pld* modificado para la obtención de la exotoxina con un cambio de histidina por tirosina en la posición 20, lo que elimina la actividad enzimática. La respuesta de anticuerpos anti-PLD fue elevada después de 2 semanas post-vacunación, solo en los animales vacunados con Toxminus transformada con el gen *pld*. La respuesta humoral fue de tipo IgG1 por vía oral, mientras que el isotipo IgG2 se observó en ovejas vacunadas por vía subcutánea. La introducción de microorganismos vivos a la mucosa principalmente estimula las respuestas secretoras de IgA, mientras que por la vía subcutánea las respuestas predominantes son humoral IgG y celular (IFN- $\gamma$ ). Las células Th1 secretan IFN- $\gamma$  y tienden a conducir a una producción de anticuerpos del isotipo IgG2, mientras que los clones Th2 secretan IL-4 y preferentemente inducen IgG1, IgA e IgE. La incidencia y el grado de formación de absceso fueron muy reducidos (abscesos de 0.2cm y 1cm) presentándose solo en dos animales en el sitio de inoculación

de la cepa virulenta para el desafío. En el grupo de animales vacunados con Toxminus no modificada el 50% de las ovejas desarrollaron abscesos, así como también el 66% de animales del grupo control no vacunado. El uso de cepas vivas atenuadas siempre implica el riesgo de reversión de la virulencia, la cepa Toxminus no permitió una expresión elevada de PLD y se encontró evidencia, aunque en una proporción mínima, de la excreción a través de las heces de la bacteria viva atenuada (Hogdson *et al.*, 1994).

Este grupo de investigadores en 1999 transformó la cepa Toxminus con un plásmido que contenía el gen *pld* modificado para la obtención de la exotoxina con un cambio de la Histidina de la posición 20 por una Serina, logrando aumentar la expresión de la proteína modificada en un 40% en comparación con el trabajo anterior. En este estudio evaluaron la vacuna Glanvac 6 que presenta exotoxina PLD inactivada con formalina y la combinación de la vacuna Glanvac 6 con la proteína PLD modificada en la posición 20. La vacuna Glanvac 6 mostró mayor reacción en el sitio de inoculación que la vacuna con la PLD modificada genéticamente. Esto se debe a que la inactivación de la toxina con Formalina no es 100% efectiva, se ha demostrado que deja un 1% de toxina activa. El título de anticuerpos inducido por ambas vacunas fue similar, no presentando diferencias significativas. La vacuna Glanvac 6 fue capaz de proteger al 95% de los animales desafiados, mientras que la vacuna Glavac 6 con PLD modificada solo protegió al 44% de los animales (Hodgson *et al.*, 1999). Por lo que la modificación genética para la obtención de la exotoxina deficiente del sitio activo no favoreció el aumento en la respuesta protectora de la vacuna.

Mediante mutación por intercambio alélico del gen *aroQ* se logró la obtención de una cepa atenuada que protegió parcialmente a ratones BALB/c desafiados con una cepa virulenta (Simmons *et al.*, 1997). El desafío se reprodujo en ovinos no obteniéndose buenos resultados, ya que los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2 fueron bajos, no aumentaron los niveles de TNF- $\alpha$  y no hubo protección en los animales vacunados (Simmons *et al.*, 1998).

En un estudio previo se obtuvieron cepas de *C. pseudotuberculosis* con diferentes mutaciones generadas a través del sistema de transposon-TnFuZ, el cual interrumpe la secuencia de los genes, con la inserción de secuencias transposones en el genoma (Dorella *et al.*, 2006b). La cepa CZ171053 mutada en el gen *ciuA*, que participa en la adquisición de hierro, presentó una capacidad reducida para sobrevivir *in vitro* dentro de los macrófagos de la línea celular J774, así como indujo una respuesta de producción de inmunoglobulinas y citocinas en ratones BALB/c. La inmunización de ratones BALB/c

con la cepa CZ171053, permitió la sobrevivencia del 80% de los animales desafiados con  $10^6$  UFC de la cepa virulenta MIC-6 (Ribeiro *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que esta cepa se podría usar para el desarrollo de una vacuna viva atenuada para evaluar en los hospederos diana de la enfermedad. Otro estudio permitió determinar el comportamiento de la respuesta inmune humoral y celular de ratones BALB/c inoculados con  $10^7$  UFC de una cepa atenuada T1 (Vale *et al.*, 2016). Los ratones vacunados no mostraron lesiones características de la enfermedad y el bazo fue recolectado para estudios *in vitro*. El cultivo de las células del bazo de estos animales, una vez estimuladas *in vitro* con antígenos secretados por T1, colectados del sobrenadante del cultivo, presentaron una mayor proliferación que las células estimuladas con antígenos intracelulares de T1 (Vale *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que los linfocitos fueron estimulados por la presencia de antígenos secretados, (PLD y CP40), que se encuentran en altas concentración en el sobrenadante del cultivo de *C. pseudotuberculosis* (Paule *et al.*, 2004). Se observó que la inoculación experimental con T1 indujo un aumento en el título de anticuerpos IgG, principalmente las subclases IgG1 e IgG2. En consecuencia, se encontró en el cultivo de las células del bazo una producción significativa de IFN- $\gamma$  después de la estimulación con los antígenos secretados e intracelulares. En los animales no se detectó producción elevada de IL-4; sin embargo, en células estimuladas con antígenos intracelulares la producción de esta citocina fue cuatro veces mayor en comparación con las estimuladas con antígenos secretados. Este fenómeno puede deberse a que la suspensión de antígenos intracelulares presentan mayor cantidad de proteínas estructurales y antígenos lipídicos que la suspensión de antígenos secretados. Las citocinas IL-10 e IL-12 aumentaron su concentración en las células del bazo estimuladas con ambos antígenos, siendo superiores los niveles alcanzados por las células estimuladas con los antígenos intracelulares. La citocina IL-10 puede controlar la síntesis de IFN- $\gamma$  durante la infección, evitando así la sobrereactividad Th1, mientras que IL-12 puede desencadenar mecanismos relacionados con la proliferación celular, producción de IFN- $\gamma$  y el cambio a Th1 que se requiere para prevenir la diseminación de patógenos intracelulares. En consecuencia, encontraron una mayor producción de IL-12 después de 60 días, siendo los niveles más altos detectados a los 120 días en el cultivo de las células estimuladas con ambos antígenos, lo que puede deberse a la persistencia de la infección. Algunos estudios han demostrado que se requiere IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 para controlar las infecciones persistentes causadas por bacterias intracelulares (Fortune *et al.*, 2004). También se evaluó el comportamiento de los productos intermediarios reactivos del nitrógeno, los cuales aumentaron sus

niveles a los 120 días post- inoculación del cultivo, siendo mayor en las células estimuladas con los antígenos internos (Vale *et al.*, 2016). Resultados similares se obtuvieron en la producción IFN- $\gamma$  a partir de la tercera semana post-inoculación con la cepa ATCC 1940, en el cultivo de células del bazo de ratones ICR-JCL, previamente estimulados con cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* inactivados con formalina (Lan *et al.*, 1999).

#### II.7.4. Vacunas de ADN

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de vacunas de nueva generación, dentro de las que se encuentran las vacunas de ADN desnudo. En estas vacunas se utiliza un vector o plásmido que tiene la capacidad de replicarse en las células del organismo inmunizado y ha este se le insertan los genes de interés que codifican para las proteínas inmunogénicas o factores de virulencia del patógeno, frente a los que se quiere proteger al animal. Estas vacunas son solo de ADN, no cuentan con envolturas o estructuras proteicas. Es muy importante la ruta de administración, la dosis, y la re-inmunización ya que son factores que influyen en la potencia y el tipo de respuesta inmune. Aunque la mayoría de estas vacunas son inoculadas mediante inyección intramuscular o intradérmica, se ha implementado el bombardeo de genes, donde las moléculas de ADN cubiertas con nano partículas, son insertadas en las células. La desventaja de este tipo de vacuna radica en la capacidad de expresar el antígeno de interés, ya que en la mayoría de los casos las partículas presentan una baja capacidad de adsorción y la cantidad de plásmidos que se introducen en las células es muy limitado.

Estas vacunas también han sido estudiadas para la inmunización contra *C. pseudotuberculosis*. El diseño de un plásmido portador del gen que codifica para el dominio extracelular de CTLA-4 bovino fusionado al gen *pld* inactivado (boCTLA-4-HIg- $\Delta$ PLD) se evaluó como vacuna de ADN desnudo en ovinos. El CTLA-4 se une con alta afinidad al antígeno de membrana B7 en células presentadoras de antígeno (APC), mejorando la respuesta inmune humoral. Aunque aumento el título de anticuerpos significativamente, la protección de los ovinos inmunizados fue parcial ante el desafío experimental con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* (Chaplin *et al.*, 1999). Para determinar el sitio de inoculación más eficiente para la administración de esta vacuna de ADN, fueron evaluadas diferentes vías de inmunización: intramuscular, subcutánea y bombardeo con pistola génica. La vacuna administrada por vía intramuscular presentó mejores resultados con niveles de protección similares a

los observados en vacunas proteicas, mientras que subcutánea y con pistola genética no protegió a las ovejas contra el desafío bacteriano (De Rose *et al.*, 2002).

También se probó una vacuna de ADN con el antígeno Hsp60 (plásmido pVAX1/hsp60), la cual fue administrada por vía intramuscular en ratones BALB/c. Esta fue capaz de inducir una respuesta elevada de anticuerpos anti-hsp60 de tipo IgG1 e IgG2a, con una tendencia a respuesta Th1 luego del día 30 de inmunización. Aunque originó una respuesta humoral significativa, todos los animales murieron luego del desafío con la cepa virulenta MIC-6, por lo que esta vacuna no fue capaz de conferir una respuesta protectora (Costa *et al.*, 2011).

En otros experimentos se determinó el potencial de una vacuna de ADN formulada en base al plásmido pTARGET transformado con la proteína esterasa cp09720 (Brum *et al.*, 2017). Esta proteína fue previamente identificada como candidato vacunal en un análisis del pan-genoma de las proteínas secretadas por la bacteria (Santos *et al.*, 2013). Esta vacuna de ADN se comparó con una vacuna de subunidades a partir de la esterasa CP09720 obtenida por vía recombinante adyuvada con hidróxido de aluminio. Ambas se evaluaron en ratones BALB/c, siendo la vacuna de proteína recombinante la que indujo mayor título de anticuerpos IgG1 (asociado a respuesta Th2) e IgG2 (respuesta celular Th1), a los 21 y 42 días post -inoculación. La respuesta inmune celular se analizó mediante la detección de la expresión de los genes que codifican para IL-4, IL-10, IL-12 y IFN- $\gamma$  por PCR en tiempo real. Las dos vacunas fueron capaces de aumentar la expresión de IFN- $\gamma$ ; sin embargo, la vacuna de subunidades con proteína esterasa cp09720 recombinante presentó los niveles más altos de ARNm de IFN- $\gamma$ . La expresión de las citocinas IL-4, IL-10 e IL-12 no aumentó en comparación con el grupo control. Los niveles de protección ante el desafío con la cepa virulenta MIC-6, para la vacuna de subunidades con proteína esterasa cp09720 recombinante fueron de un 58.3%, mientras que la vacuna de ADN pTARGET/ proteína esterasa cp09720 solo protegió al 16.6% (Brum *et al.*, 2017).

### **II.7.5 Vacunas de Subunidades proteicas recombinantes**

Las vacunas de subunidades contienen una combinación de antígenos de diferente naturaleza como lipopolisacaridos, extractos ribosómicos, proteínas recombinantes purificadas o péptidos sintéticos. En estas vacunas se emplean moléculas completas o fragmentos responsables de la patogenicidad, sin el empleo del microorganismo patógeno, evitándose el riesgo de desencadenar la enfermedad. Además no se requiere del mantenimiento y cultivo en grandes escalas de microorganismos patógenos, como

*C. pseudotuberculosis* el cual es zoonótico y puede afectar al hombre durante la producción de las vacunas. Estas vacunas no son muy inmunogénicas por lo que requieren en la formulación del uso de sustancias adyuvantes, que potencien la respuesta del sistema inmune (Jorge y Dellagostin, 2017).

La tendencia en la producción de vacunas contra la LAC se ha re-direccionado al uso de antígenos proteicos recombinantes en busca de mejorar la protección conferida por las vacunas. La proteína PLD obtenida por vía recombinante ha sido de las más empleadas para el desarrollo de vacunas de subunidades. Un grupo de investigadores del Reino Unido determinó las potencialidades de una vacuna a partir de 50µg de PLD obtenida por vía recombinante (PLDr) en *E. coli* y su combinación con  $1.25 \times 10^{10}$  cells/mL de cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* inactivados con formalina. En este trabajo el grupo control fue vacunado con Glanvac 3 (Commonwealth Serum Laboratories (CSL) Ltd., Victoria, Australia), vacuna comercial con licencia de uso en el Reino Unido. Las vacunas se administraron por vía subcutánea, con un intervalo de 4 semanas entre la primera y segunda inmunización y el desafío se realizó 2 semanas después de la segunda inmunización con  $10^4$  UFC de una cepa de *C. pseudotuberculosis* virulenta. Los niveles más altos de anticuerpos fueron detectados en los grupos inmunizados con la vacuna de proteína PLDr y la vacuna PLDr + células totales inactivadas, en comparación con los grupos vacuna de células totales inactivadas y Glanvac 3. En todos los grupos con PLDr los niveles medios de IgG anti-PLD alcanzaron su punto máximo antes de la vacunación de refuerzo, por lo que el componente de células enteras se consideró que no contribuyó a la respuesta inmune humoral. Sin embargo, el empleo de otro sistema ELISA que utiliza células completas como antígeno, si permitió identificar elevados niveles de anticuerpos en los grupos vacunados con células totales inactivas y PLDr + células totales inactivas, no detectando anticuerpos en los grupos PLDr y Glanvac3. Esto pudo deberse a que, en las formulaciones de células totales inactivas, empleadas tanto para la vacuna como para el ELISA, hayan presentado una concentración de PLD muy baja. No se encontró evidencia de infección en ninguno de los animales inmunizados con la vacuna PLDr y la vacuna PLDr + células totales inactivadas, incluyendo la resolución de abscesos en el sitio de inoculación, solo desarrollados por esta última (Fontaine *et al.*, 2006). Estos resultados implican que el empleo de PLD obtenida por vía recombinante permite el desarrollo de una respuesta inmune protectora, con una respuesta humoral más rápida y elevada, en comparación con la vacuna Glanvac 3.

En el 2009 se realizó la inmunización de ratones BALB/c con la proteína Hsp60 recombinante, la cual indujo una respuesta elevada de IgG anti-Hsp60, con una producción de IgG1 significativamente mayor que IgG2a. La respuesta inmune células se comprobó a través de la detección de citocinas, como interferón gamma el cual se produjo en concentración elevada, así como IL-10, mientras que IL-4 no aumentó significativamente. Esta vacuna no protegió a los animales desafiados con  $10^6$  UFC de una cepa virulenta, los cuales experimentaron signos clínicos de la enfermedad, formación de abscesos y la muerte al día 12 post desafío. Por lo que esta vacuna a pesar de inducir una respuesta elevada del sistema inmune, no confiere una respuesta inmune protectora, capaz de activarse ante la infección con una cepa virulenta (Pinho *et al.*, 2009).

La combinación de la proteína PLD obtenida por vía recombinante junto a cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* y *equi*, inactivados con formalina, fueron empleados para la inmunización de ovinos. En este trabajo se evaluaron en ovinos 2 formulaciones compuestas cada una por 50µg de PLDr y 20mg de células inactivadas ya sea biovar *ovis* para vacuna 1 y biovar *equi* para vacuna 2. El esquema de vacunación incluyó una re-inmunización a las 3 semanas y el desafío se realizó con  $2 \times 10^6$  UFC de una cepa biovar *ovis* virulenta aislada de animales locales. La detección de los niveles de anticuerpos anti-PLD mediante ELISA permitió ver que los animales vacunados presentaron un aumento de IgG después de la segunda dosis de refuerzo, pero luego del desafío se produjo una ligera disminución en la DO, aunque los niveles se mantuvieron elevados por encima del valor de corte durante 20 semanas. No se observaron lesiones en nódulos linfáticos externos e internos, en comparación con el grupo control no vacunado donde el 80% de los animales presentaron manifestaciones de la enfermedad. Ambas vacunas fueron capaces de proteger a los animales ante el desafío con una cepa virulenta. En este trabajo por primera vez se inmunizan ovejas con una cepa biovar *equi* en combinación con PLD obtenida por vía recombinante (Moussa *et al.*, 2016b).

Diferentes formulaciones se evaluaron en ratones BALB/c, combinando proteínas rCP09720 (esterasa) o rCP01850 (proteína L14 de unión a la subunidad 50S) y la rPLD obtenidas por vía recombinantes. En este estudio las tasas de supervivencia después del desafío fueron de 30% (rPLD), 40% (rPLD + rCP09720) y 50% (rPLD + rCP01850). La combinación de rCP01850 con rPLD confirió protección al 50% de los animales desafiados con una cepa virulenta, con un aumento significativo en los niveles de IgG2. También la vacuna fue capaz de inducir una respuesta inmune celular aumentando

significativamente los niveles de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , mientras que la producción de IL-4 e IL-12 no fue detectada (Silva *et al.*, 2018).

Recientemente se empleó una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus-Calmette-Gueri) para la expresión de PLD recombinante en el plásmido pUS2000. El sistema no fue eficiente para la expresión elevada de la proteína PLD, pero fue efectivo para la vacunación y protección en un modelo murino. La inmunización de ratones BALB/c con  $10^6$  UFC de *M. bovis* pUS2000/PLD para la expresión de PLD, así como con *M. bovis* pUS2000/PLD+ 50 $\mu$ g de PLDr purificada y la cepa *M. bovis* sin modificar, indujo una producción de anticuerpos elevada en comparación con el control negativo (100 $\mu$ L de Na Cl 0.9%), pero sin diferencias significativas entre los grupos vacunados. Esto se debe a que la cepa *M. bovis* por si sola es capaz de inducir una respuesta inmune humoral y celular elevada. Sin embargo, después de 42 días de inmunización, ante el desafío con  $2 \times 10^4$  UFC de la cepa virulenta MIC-6, el grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/PLD experimentó un aumento significativo en los niveles de IgG en comparación con el resto de los grupos. La respuesta inmune celular se evaluó midiendo los niveles de producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo de los animales vacunados, tras ser estimuladas con 8 $\mu$ g/mL de PLDr. Los niveles de IFN- $\gamma$  detectados para el grupo *M. bovis* no modificada fueron de 365pg/mL, mientras que en el cultivo de las células de animales vacunados *M. bovis* pUS2000/PLD fueron de 420pg/mL y de 498pg/mL en las células del grupo que recibió una reactivación de la vacunación con 50 $\mu$ g de PLDr purificada. Para el caso de la IL-10 las células del grupo control produjeron 252pg/mL, las del grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/PLD 1317pg/mL y en el cultivo de las células del grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/PLD+ PLDr fue de 590pg/mL. El nivel de protección conferida por estas formulaciones fue del 88% en los animales vacunados con *M. bovis* pUS2000/PLD+ 50 $\mu$ g de PLDr, de un 77% para el grupo *M. bovis* pUS2000/PLD y del 66% para el grupo *M. bovis* no modificado. La respuesta inmune protectora generada por esta vacuna de células enteras de *M. bovis* BCG modificada para expresar PLD, podría originar la activación de varias poblaciones de células T, debido a la variedad de antígenos (lípidos, proteínas y carbohidratos) de la formulación. Luego la re-inmunización con 50 $\mu$ g de la PLD obtenida vía recombinante estimula el aumento en la proliferación de células T específicas para este antígeno en particular (Leal *et al.*, 2018).

Las vacunas de subunidades también se han desarrollado empleando la proteína CP40 obtenida por vía recombinante. En 1994 fue identificada CP40 en el sobrenadante de cultivo de *C. pseudotuberculosis*,

siendo co-purificada junto con la toxina PLD durante la preparación de vacunas inactivadas. La preparación de las vacunas de PLD a partir de sobrenadantes de cultivo de *C. pseudotuberculosis* habitualmente contienen otros antígenos bacterianos indefinidos que podrían estar contribuyendo con la respuesta inmune protectora. La proteína CP40 fue identificada a través de ensayos de inmunoblot, donde se observó que los sueros de animales vacunados con Glanvac podían reconocer de manera intermitente esta proteína, lo que sugiere que estaba presente en algunos lotes de vacuna. En un estudio experimental en ovejas, la inmunización con 100µg de CP40 recombinante protegió al 82% de los animales, con una disminución de las lesiones pulmonares en el 98% de los animales. No se encontró relación entre la disminución en el desarrollo de lesiones pulmonares y el título de anticuerpos, por lo que se asumió que la respuesta celular fue la responsable de la protección ante la infección. En este caso los anticuerpos anti-CP40 podrían estar involucrados en la protección a través de mecanismos indirectos, como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El suero de los animales vacunados se analizó mediante inmunoblot, mostrando una fuerte respuesta de anticuerpos específica, restringida a la proteína de 40 kDa (Hodgson *et al.*, 1994).

Posteriormente se realizó la evaluación comparativa de cuatro formulaciones vacunales, que utilizaron como inmunógenos la proteína CP40 recombinante y la cepa CP09, atenuada mediante mutagénesis inducida. Estos candidatos se evaluaron de manera combinada y por separado, para determinar su capacidad inmunoprotectora ante el desafío con 10<sup>4</sup> UFC de la cepa virulenta MIC-6 en un modelo murino. La cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* CP09 en una concentración de 10<sup>6</sup> UFC, no fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en los animales vacunados, ni desafiados. Los animales vacunados con CP40r, así como la combinación de la cepa atenuada CP09 + CP40r y el grupo con una dosis de CP40r seguido de una re-inmunización con la cepa CP09, presentaron un aumento significativo en el título de anticuerpos IgG1, a los 30 días post-inmunización. Estas diferencias significativas se mantuvieron luego del desafío, excepto para el grupo inmunizado con CP40r donde no se observó un aumento ni diferencias significativas en los niveles de IgG1 a los 45 o 60 días. Sin embargo, estos grupos luego del desafío experimentaron un aumento significativo en los niveles de IgG2, siendo el máximo alcanzado por los animales inmunizados con CP40r. El isotipo IgG2 se encuentra relacionado con una respuesta celular de Th1, células involucradas principalmente en la inmunidad contra patógenos intracelulares, activación de macrófagos y células T citotóxicas, producción de opsonización y activación del complemento. La formulación a base de CP40r protegió

al 90% de los animales ante el desafío con la cepa virulenta, seguido del grupo vacunado con la cepa atenuada CP09 + CP40r con un 70%, mientras que la vacunación con CP40r seguido de la inmunización con CP09 solo protegió al 60% y la cepa CP09 solo al 50%. Estos resultados indican que las formulaciones con la proteína CP40 recombinante fueron más eficientes en la protección asociada a una respuesta celular Th1, en ausencia de un perfil Th2 después del desafío (Silva *et al.*, 2014).

Otro grupo de investigadores realizó la evaluación en ratones BALB/c de una vacuna de subunidades de CP40 recombinante con diferentes adyuvantes, saponina o adyuvante completo de Freud (ACF). Luego de 40 días de la última inmunización se realizó el desafío con  $10^4$  UFC de la cepa virulenta C57. No se detectaron niveles significativos de anticuerpos IgG1 en ninguno de los grupos vacunados o control. Los animales inmunizados con CP40r / saponina mostraron valores elevados en los niveles completos de anticuerpos anti-CP40r IgG y de las subclases IgG2a, IgG2b e IgG3, con diferencia estadísticamente significativas con respecto al grupo control al día 60 después de la inmunización. El grupo vacunado con CP40r / ACF mostró una diferencia significativa en los niveles completos de IgG, IgG2a e IgG2b en el día 30 después de la inmunización. La producción de anticuerpos IgG2b fue significativamente diferente a partir del día 30, con producción estable junto a IgG3 en el día 60 después de la inmunización. Las subclases IgG2a e IgG2b se consideran los mediadores más potentes para la modulación adecuada de una respuesta inmune, tipo Th1, mientras que IgG1 e IgG3 están relacionada con la respuesta Th2, la respuesta humoral y las reacciones alérgicas. Luego del desafío hubo un aumento en el título de anticuerpos en el grupo vacunado con CP40r / saponina al día 30, así como en el grupo vacunado con CP40r / ACF, no mostrando diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Ambas formulaciones vacunales protegieron al 100% de los animales desafiados, a diferencia del grupo control negativo. Los resultados sugieren una tendencia hacia una respuesta de Th1, mientras que los isotipos asociados a respuestas de tipo Th2, como IgG1 e IgG3, no se detectaron o reaccionaron menos a la proteína recombinante. La reactividad y la producción de isotipos específicos para IgG2a, IgG2b e IgG3 se asocian con la acción de las citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$ , que activan las células B modificando la cadena pesada de la inmunoglobulina. El uso de diferentes adyuvantes no influyó en la respuesta de anticuerpos; sin embargo, es conocido que el adyuvante de Freud es tóxico en ovejas por lo que la saponina podría ser empleada obteniéndose los resultados similares. Además, se ha demostrado que la saponina estimula la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

citotóxicos. La proteína CP40 recombinante fue capaz de generar una respuesta inmune humoral y celular (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

Las investigaciones más recientes se han enfocado en la identificación de nuevas moléculas implicadas en los mecanismos de patogenicidad y virulencia de la bacteria (Galvao *et al.*, 2017; Raynal *et al.*, 2018; Sobrinho-Santos *et al.*, 2018), para su posterior evaluación como candidatos vacunales. Hasta la fecha los resultados más alentadores se han obtenido con formulaciones a base de la exotoxina PLD o la endoglicosidasa CP40, obtenidas por vía recombinante. Cabe destacar que estas moléculas no se han evaluado en una misma formulación, lo cual favorecería la respuesta inmune humoral y celular, en base a sus capacidades individuales anteriormente comprobadas.

## **II.8 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli***

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante y la optimización de los bioprocesos ha permitido la obtención de proteínas heterólogas con fines farmacológicos, industriales e investigativos. Las proteínas recombinantes u heterólogas son aquellas cuya síntesis tiene lugar en organismos distintos al nativo, producto de la manipulación genética. El empleo de sistemas para la expresión de proteínas heterólogas resulta una manera conveniente para obtenerlas en grandes cantidades y con características similares a la proteína nativa (Guevara-Hernández *et al.*, 2013). Purificarlas a partir de sus fuentes naturales requeriría generalmente de la implementación de metodologías complejas y específicas, lo cual sería costoso. Además, permite evitar el riesgo de manipulación de grandes volúmenes de microorganismos patógenos (Guevara-Hernández *et al.*, 2013; González y Fillat, 2018).

El sistema de expresión lo conforman el organismo hospedero y el vector o plásmido de expresión que contiene los elementos génicos, formando ambos la maquinaria para la transcripción y traducción del gen de interés. El sistema de expresión óptimo dependerá del origen biológico y las propiedades de la proteína de interés, las características de crecimiento del hospedero, los niveles de expresión y la localización celular de la proteína, la existencia de modificaciones post-traduccionales, la actividad biológica de la proteína, así como el costo económico de todo el bioproceso (González y Fillat, 2018). Los plásmido o vectores son moléculas de ADN circular por lo general de origen bacteriano que constan con un origen de replicación, el promotor, el sitio de unión al ribosoma, el sitio múltiple de clonaje donde se inserta la secuencia codificadora, terminadores de la transcripción, así como marcadores de resistencia a antibióticos que facilitan la selección de los clones recombinantes y

garantizan la estabilidad del plásmido en el hospedero mediante el cultivo en un medio selectivo (Sambrook *et al.*, 2012).

La bacteria Gram negativa *Escherichia coli* es el organismo procariota más extensamente utilizado para realizar manipulaciones genéticas y para la producción industrial de proteínas de interés terapéutico o comercial. Comparado con otros sistemas de expresión establecidos, *E. coli* ofrece ventajas como: crecimiento a expensas de fuentes de carbono baratas, una rápida acumulación de biomasa, fermentaciones que alcanzan altas densidades celulares en un proceso simple y corto. Además, su larga historia como sistema modelo ha derivado un amplio conocimiento sobre su fisiología y genoma; y en consecuencia se han desarrollado muchas herramientas de ingeniería cromosómica que facilitan la clonación de genes y su expresión (González y Fillat, 2018).

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) es muy empleada en el ámbito industrial debido a que carece de las proteasas Lon y Omp-t, lo cual reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante en la bacteria. También produce bajas cantidades de acetato, subproducto metabólico altamente indeseable en la producción de proteínas recombinantes. Esta cepa contiene el profago  $\lambda$ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG (Phue *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014). El sistema de expresión T7 se basa en el uso de la ARN polimerasa y el promotor del bacteriófago T7. Esta ARN es menos compleja, se compone por una sola subunidad y es capaz de realizar todo el proceso de transcripción, como su homóloga en organismos superiores. Los plásmidos pET presentan el sistema T7 acoplado y se han empleado para la obtención de proteínas con una elevada expresión y rendimiento. Para expresar el gen de interés en este sistema es necesario una fuente de T7 ARN polimerasa en la célula hospedera, lo que se logra con el uso de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). La T7 ARN polimerasa no reconoce los promotores de *E. coli*, solo reconoce su promotor T7, el cual a su vez no es reconocido por las ARN polimerasas de la bacteria. Esta enzima es capaz de transcribir los genes cinco veces más rápido que la ARN polimerasa de *E. coli*. El gen que codifica la T7 ARN polimerasa presente en la cepa BL21 (DE3) está bajo el control del promotor *lacUV5*, por lo que su expresión es básicamente controlada por los mismos mecanismos del operón lactosa. El promotor Lac se reprime en presencia de glucosa y se induce en presencia de lactosa o su análogo isopropil-tiogalactosido (IPTG) el cual es muy eficiente y ampliamente utilizados a escala de laboratorio (Studier *et al.*, 1990; Studier *et al.*, 2005; Angius *et al.*, 2018).

El procedimiento para obtener la proteína recombinante consiste en introducir el gen que codifica para la proteína de interés en un vector de expresión (plásmidos, virus, cósmidos) a través de un proceso de ligazón, seguido de la transformación del organismo hospedero con la construcción génica de interés (Sambrook *et al.*, 2012). El gen se obtiene mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando ADN genómico o ADN complementario (ADNc) mediante la transcripción reversa del ARN mensajero de interés. Posteriormente se utilizan enzimas de restricción para generar el sitio específico donde se va a insertar el ADN en el vector de expresión. En caso de ser necesario, los sitios para el reconocimiento de las enzimas de restricción se pueden introducir en los cebadores que se emplean para la amplificación del gen mediante PCR. Luego se realiza la reacción de ligazón donde se une el gen de interés al plásmido mediante la acción de una enzima ligasa. Lo siguiente es la transformación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido recombinante, ya sea por método químico con CaCl<sub>2</sub> o mediante electroporación, los cuales permeabilizan la membrana y favorecen la entrada del material genético a la célula. El crecimiento bacteriano se estimula con medio Luria Bertani (LB) y al llegar a la fase exponencial (densidad óptica del cultivo entre 0.6-0.8 a 600 nm) se añade el inductor. La adición del IPTG al medio induce la expresión de la T7 ARN polimerasa y consecuentemente la del gen de interés, ya que este inductor remueve el represor lac del operador lacO. El gen que codifica el represor lac está presente en el cromosoma bacteriano, con lo que se garantizan altas concentraciones del represor en la célula. Esto hace que en condiciones normales la enzima no se exprese o se exprese muy poco (Studier *et al.*, 2005; González y Fillat, 2018). Las proteínas expresadas por vía recombinante pueden ser dirigidas hacia el citoplasma, periplasma o medio extracelular (medio de cultivo).

En bacterias resulta difícil la secreción al medio extracelular de grandes cantidades de la proteína recombinante, por tal motivo en presencia de altos niveles de expresión es frecuente la formación de agregados insolubles en el citoplasma denominados cuerpos de inclusión. Para la purificación de las proteínas el primer paso es la ruptura celular, la cual se puede llevar a cabo empleado medios mecánicos o químicos. Si la proteína se encuentra soluble en el citoplasma se aplican directamente métodos cromatógrafos para su obtención. En el caso de proteínas insolubles, que se encuentran formando cuerpos de inclusión es necesario el uso de agente caotrópicos, que tienden a desnaturalizar la proteína, siendo necesaria posteriormente la implementación de técnicas de re-naturalización. Uno de los métodos empleado para la purificación de proteínas es el uso de marcadores de afinidad. Esta técnica

consiste en la adición a las proteínas de una cola de poli-histidina que permite la purificación de esta por medio de cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). Estos métodos permiten la obtención de la proteína recombinante en grandes concentraciones y con un elevado grado de pureza. La proteína PLD ha sido obtenida por vía recombinante en *E. coli* con el empleo de diferentes sistemas de expresión. El clonaje por primera vez del gen que codifica para esta proteína se realizó en el vector pUC12 en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  y mediante ensayos de Southern blot fue identificada la secuencia del gen insertado en el plásmido (Hodgson *et al.*, 1990). Luego en otro trabajo para la obtención de PLD inactivada mediante mutagénesis sitio específica, se utilizó el sistema *E. coli* DH5 $\alpha$  y el plásmido pTZ18U, seguido de la identificación de la expresión mediante electroforesis en SDS-PAGE y Western blot (Hodgson *et al.*, 1994). Otros investigadores han empleado el plásmido pAE para la expresión de PLD en células *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de la proteína recombinante es analizada por SDS-PAGE al 12% teñido con azul Coomassie y Western blot con anticuerpo monoclonal anti-6x His y la purificación se ha realizado por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (Leal *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

Por otra parte, la proteína CP40 se obtuvo por vía recombinante con el plásmido pBE12GEX2 utilizando *E. coli* XL1-Blue. En este estudio la proteína se expresó en un 15% de las proteínas totales y fue obtenida del sobrenadante del cultivo (Walker *et al.*, 1994). También se empleó el plásmido pAE y la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión con 1Mm de IPTG. En este estudio se empleó un sistema de purificación de cromatografía de afinidad, utilizando la columna HisTrap<sup>TM</sup> HP (GE Healthcare, USA) (Silva *et al.*, 2014). El sistema de expresión de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pAE, fue empleado por Droppa *et al.*, (2016) para la obtención de CP40. La expresión de la proteína se confirmó mediante Western blot usando anticuerpo monoclonal anti-histidina conjugado con peroxidasa (Sigma, USA). La purificación se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de níquel sepharose HisTrap<sup>TM</sup> (GE). La pureza se determinó mediante SDS-PAGE al 12%, y la concentración se determinó con un kit BCA (PIERCE) (Droppa-Almeida *et al.*, 2016). Las proteínas obtenidas por vía recombinantes pueden ser empleadas en vacunas y medios diagnósticos. Brindan una alternativa viable y fácil de escalar, con bajos costos de producción, así como permiten la elaboración de vacunas inocuas, a partir de antígenos específicos y altamente puros.

## II.9 VACUNOLOGÍA INVERSA, HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.

La inmuno-informática ha emergido como un campo importante que actúa como una intersección entre la inmunología experimental y los enfoques computacionales. Una de las aplicaciones que se ha derivado de esta área es la vacunología inversa. Esta analiza el genoma o las secuencias de aminoácidos con el objetivo de identificar proteínas o péptidos con potencial inmunogénico. Estas herramientas bioinformáticas representan una ventaja ya que permiten obtener resultados basado en el uso de programas predictivos, antes de evaluar experimentalmente las proteínas o péptidos, evitando el uso de animales de experimentación en las primeras etapas del diseño de las vacunas, así como un ahorro significativo en tiempo y gastos de la investigación.

Los estudios de vacunología inversa se enfocan en el análisis *in silico* primero del proteoma usando predictores genéticos y luego del análisis de las características de cada proteína por separado (Goodswen *et al.*, 2014; Flower *et al.*, 2015). Estas estrategias fueron utilizadas por primera vez en la predicción de antígenos para el desarrollo de una vacuna contra *Meningococcus* serogrupo B (Christensen *et al.*, 2013).

Los criterios de selección de posibles candidatos vacunales para el diseño de vacunas varían en dependencia del patógeno. Para la identificación de proteínas con potencial inmunogénico se deben tener en cuenta las características y propiedades que influyen de manera positiva en la activación del sistema inmune. Existen diferentes tipos de programas que permiten la identificación y predicción de características como estructura, adherencia, fusión, antigenicidad, unión a MHC clase I y II, secuencias de unión a proteosomas, así como activadores de linfocitos B y T. La localización celular es una de las características a tener en cuenta ya que la mayoría de las proteínas antigénicas son aquellas que están más expuestas en el hospedero y pueden ser rápidamente reconocidas por el sistema inmune, como proteínas secretadas, proteínas expuestas a la superficie o proteínas de membrana (Dalsass *et al.*, 2019). La capacidad de unión y presentación en el contexto MHC clase I y II permite identificar qué tipo de respuesta inmune estará favorecida. Los factores de virulencia son los principales candidatos y a menudo los genes que los codifican se encuentran en islas de patogenicidad compartidas y conservadas por diversas cepas. La obtención de resultados satisfactorios depende de la precisión en la predicción de antígenos y para ello existen diversos programas informáticos que facilitan este proceso (Doytchinova y Flower, 2007; Singh *et al.*, 2017; Droppa *et al.*, 2018).

Los programas de predicción pueden ser de dos tipos, de acuerdo con sus enfoques algorítmicos. Los de tipo de árbol de decisiones o "filtrado" y los de aprendizaje computacional automático o "clasificatorios". Los programas de tipo de árbol de decisiones o filtrado se basan en diagramas de flujo donde las secuencias de las proteínas del patógeno se evalúan ante una serie de condiciones o filtros hasta un subconjunto donde se identifican como posibles candidatos para la vacuna. Los filtros corresponden a características de las proteínas que se puede medir directamente, como el peso molecular, o características predichas por un programa computacional, como la localización sub-celular o la probabilidad de ser una proteína de adhesión. La desventaja con los programas que utilizan este tipo de algoritmo es que en cada paso de clasificación van eliminando posibles candidatos.

Los programas de aprendizaje computacional automático o "clasificatorios" utilizan enfoques o modelos estocásticos como máquinas de vectores de soporte, redes neuronales artificiales o modelos ocultos de Markov, para predecir la calidad de unión o enlace de la secuencia en estudio. Estos enfoques intentan refinar el modelo de predicción ajustando parámetros teniendo en cuenta la información de secuencias posibles candidatos o no, proporcionadas por una colección conocida que se emplea para entrenar el modelo. Estas aplicaciones de aprendizaje automático no descartan proteínas, como las herramientas de árbol de decisión, clasificando todo el conjunto de proteínas de entrada por su probabilidad de ser un candidato vacunal. Esto resulta muy útil para los ensayos confirmatorios preclínicos, ya que se puede comenzar con los candidatos más prometedores clasificados en las primeras posiciones. Las herramientas de aprendizaje automático difieren entre sí del tipo de algoritmo de clasificación por la cantidad de características que miden y el tamaño y variedad de proteínas que constituyen el conjunto de entrenamiento (Michalik *et al.*, 2016).

El programa VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen>) fue la primera herramienta bioinformática confiable para la predicción de proteínas con capacidad antigénica en bacterias, virus, células tumorales y posteriormente parásitos y hongos (Doytchinova y Flower, 2007; Doytchinova y Flower, 2008). El programa es entrenado con múltiples secuencias conocidas de antígenos inmunoprotectores y no protectores, que sirven como referencia para la predicción. La página de resultados informa la probabilidad de que la proteína (como una fracción de unidad) sea antigénica o no (antígeno probable o antígeno no probable). El programa tiene en cuenta tres propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que componen la proteína como hidrofobicidad, tamaño molecular y la polaridad. A cada propiedad de los aminoácidos se le asigna una variable z, y luego las cadenas o

secuencias de aminoácidos que conforman la proteína son convertidas en vectores uniformes a través de covarianza cruzada automática. Las variables relevantes son seleccionadas por algoritmo genético o por etapas de regresión y finalmente clasifican a la proteína como antígeno protector o no, mediante análisis basado en el cálculo de mínimos cuadrados parciales (Zaharieva *et al.*, 2017). Para la predicción de proteínas antigénicas de origen bacteriano presenta un 80% de precisión, 79% sensibilidad y 81% de especificidad (Doytchinova y Flower, 2007). El programa considera a partir del valor de score (corte) fijado, en adelante, que la proteína presenta actividad antigénica. Esta herramienta ha sido empleada en investigaciones veterinarias en la detección de antígenos para el diseño de vacunas contra *Brucella spp.*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Pajaroellobacter abortibovis*, *Leptospira interrogans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Anaplasma marginale* y *C. pseudotuberculosis* (Zaharieva *et al.*, 2017).

Las herramientas para identificar epítomos de células B se dividen en aquellas que dependen de la información de la estructura primaria e identifican epítomos continuos, lineales, así como las que dependen de información de la estructura secundaria y predicen epítomos discontinuos o estructurales. El primer grupo de herramientas realiza la predicción teniendo en cuenta un conjunto de descriptores como atributos fisicoquímicos, accesibilidad superficial y composición de aminoácidos. En general rinden precisión para epítomos continuos (lineales), pero son menos eficientes en la identificación de epítomos discontinuos. Para superar esta deficiencia se ha incorporado a los programas cálculos de predicción incluyendo información de estructura secundaria, accesibilidad de superficie calculada y/o índices de protuberancia, además de información sobre la estructura tridimensional de la proteína y la estructura de complejos antígeno BCR conocidos. Ejemplos de herramientas basadas en secuencias lineales son BepiPred, ABCpred, BEST y para la predicción basada en estructura se utilizan programas como BepiPred 2.0, ElliPro, Paratome, PEPOP y BEEPro (Soria-Guerra *et al.*, 2015; Michalik *et al.* 2016; Zaharieva *et al.*, 2017; Jespersen *et al.*, 2017).

Existen interfaces web que permiten realizar pruebas exhaustivas de sus predicciones y análisis en función de sus bases de datos (Singh *et al.*, 2010). La página web IEDB (por sus siglas en inglés, *Inmune Epitope Database and Analysis Resource*) proporciona una compilación actualizada regularmente, de epítomos vinculantes y sus afinidades. Constituye una herramienta de predicción accesible a través de una única intuitiva interfaz web, que incorpora diferentes programas y algoritmos para la caracterización general de una proteína o secuencia. Permite la identificación de epítomos

antigénicos, con mayor probabilidad de exposición a superficie, de unión a anticuerpos, de unión a MHC I y MHC II para activación de células T (Fleri *et al.*, 2017).

Vaxign es un sitio web diseñado para la predicción de moléculas con potencial inmunogénico basados en secuencias de genomas. Fue evaluado y estandarizado para la predicción de candidatos a vacunas contra *Escherichia coli* uropatógena (He *et al.*, 2010). El programa emite un criterio en función de la evaluación de diversas propiedades de la proteína. Vaxign predice la ubicación subcelular de la proteína, la presencia de hélices de transmembrana, probabilidad de adhesión, secuencias conservadas en proteínas de humanos y/o proteínas de ratón, secuencia de exclusión en el genoma de cepas no patógenas y epítomos que se unen a MHC clase I y clase II. También realiza la predicción basada en el previo entrenamiento con otras secuencias. La base de datos pre-calculada de Vaxign contiene predicciones de vacunas para más de 70 genomas (Ong *et al.*, 2020).

Numerosos estudios de vacunología inversa se han realizado para la predicción de antígenos inmunogénicos de *C. pseudotuberculosis*. El estudio *in silico* del pan-exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* se realizó con las cepas 1002, C231, I19, FRC41 y PAT10 (Santos *et al.*, 2012). En este trabajo se aplicó la vacunología inversa para analizar la secuencia del pan-genoma y la identificación de genes expresados en el ciclo de vida del patógeno. Todos los marcos de lectura abiertos (ORF) derivado de la secuencia del genoma se evaluaron usando un programa computacional para determinar su habilidad como candidatos a vacunas, prestando especial atención a los que codifican proteínas exportadas, ya que son esenciales en las interacciones hospedero-patógeno (Santos *et al.*, 2012).

Otro análisis de vacunología inversa con los programas Surf+ y Vaxign se realizó para predecir nuevos antígenos que pueden ser empleados en el desarrollo de vacuna con ambos tipos de biovar *ovis* y *equi* (Soares *et al.*, 2012). Este mismo grupo de investigadores en el 2013 realizó el estudio del pan-genoma de 15 cepas aisladas de hospederos y orígenes geográficos diferentes. El pan genoma se compone de tres partes: genoma central, genoma accesorio y genes específicos de cepa. El genoma central está compuesto por genes que comparten todas las cepas analizadas en el estudio. Por lo general, los genes centrales codifican productos que son responsables de los aspectos básicos de la vida del organismo, como los procesos de replicación, transcripción, traducción y mantenimiento de homeostasis celular, haciéndolos objetivos adecuados para el desarrollo de vacunas (Tettelin *et al.*, 2008; Raoult *et al.*, 2015). Los resultados del trabajo revelaron estrechas relaciones entre las diferentes cepas de

corinebacterias evaluadas, el comportamiento clonal de *C. pseudotuberculosis* y aumentos lentos en el tamaño de los pan-genomas (Soares *et al.*, 2013).

Diferentes proteínas identificadas como posibles factores de virulencia SpaC, SodC, NanH y PknG han sido analizadas usando inmunoinformática, con el programa VaxiJen. En este trabajo se descubrió que SpaC, PknG y NanH presentan mejor potencial para el desarrollo de una vacuna que SodC (Santana *et al.*, 2016). Mediante un análisis de predicción de epítomos con la página web IEDB se determinaron posibles secuencias de la proteína CP40, que pueden ser reconocidas con mayor eficiencia por los anticuerpos. En este trabajo de un total de 184 epítomos evaluados se identificaron 6 péptidos con mayor potencial inmunogénico. También en este estudio se determinaron las interacciones que se producen entre la proteína CP40 con el receptor tipo Toll (TLR-2). Estos receptores forman parte del sistema inmune innato, son moléculas de transmembrana que participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), activando el sistema inmune. La activación de estos receptores induce respuesta inflamatoria en leucocitos de linaje mieloide y señala la vía del sistema inmune NF- $\kappa$ B. Los TLR también aumentan la producción de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40, que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos, siendo necesarias para la activación de Linfocitos T por parte de las células dendríticas y macrófagos. Se demostró que los 6 péptidos con potencial inmunoestimulante son capaces de interactuar con el receptor TLR2. Este estudio *in silico* plantea el potencial que presenta la proteína CP40 para interactuar con el receptor TLR2, lo que le confiere capacidad para activar la respuesta inmune celular (Droppa-Almeida *et al.*, 2018).

Otro análisis de vacunología inversa permitió identificar las características inmunoprotectoras de proteínas que se activan para la defensa de *C. pseudotuberculosis* ante condiciones de estrés ambiental. Mediante el empleo de los programas Vaxign y VaxiJen se identificaron la localización celular (membrana citoplasmática) y la capacidad antigénica (a partir de 0.4) de las proteínas CopC de resistencia a cobre (*copC*= antigenicidad= 0.85), *YkuE* metalofosfoesterasa (*ykuE*=0.40), NADH deshidrogenasa (*ndh*=0.48), MtrB sensor histidina quinasa (*mtrB*=0.54), FtsL proteína de unión a penicilina (*ftsI*=0.64), SenX3 histidina-quinasa de transducción de señales *senX3*=0.61) (Araújo *et al.*, 2019).

La influencia de diferentes condiciones de estrés (alto contenido de hierro, bajo contenido de hierro, ósmosis y pH) se evaluaron en la expresión de los genes en *C. pseudotuberculosis*. Utilizando redes de

co-expresión para la identificación de genes causales basado en datos de secuencia de ARN-seg, mediante un algoritmo de inferencia de red consenso llamado miRsig y la herramienta miRinfluence, se identificaron los genes causales o influyentes de la red. Los resultados indicaron que más del 50% de los genes identificados como influyentes están involucrados en funciones celulares. Por otra parte, en la mayoría de las cepas analizadas, los genes causales tienen roles en procesos asociados con la respuesta a tensiones extracelulares, patogenicidad, componentes de la membrana y genes esenciales (Franco *et al.*, 2020).

La comparación entre los programas NERVE, Vaxign, VaxiJen, Jenner-predict, Bowman-Heinson, y VacSol, para la identificación de antígenos bacterianos protectores (ABP) con capacidad conocida, permitió establecer que ninguno de los programas fue capaz de identificar al 100% el mismo conjunto de antígenos ABP probados. Las listas de proteínas candidatas establecidas por cada programa no fue similar ya que estos sugieren los posibles candidatos de acuerdo a diferentes algoritmos o patrones de selección (Dalsass *et al.*, 2019). Estos resultados indican que se requiere de una mejora en la precisión de las herramientas bioinformáticas existentes, con el apoyo de la expansión de las bases de datos y la incorporación de datos negativos provenientes de evaluaciones experimentales. También sugiere que la combinación de diferentes programas predictivos puede ampliar el rango de moléculas a considerar posibles candidatos, y que aquellas que sean clasificadas por diferentes algoritmos tienen mayor probabilidad de ser las más inmunogénicas.

### III. JUSTIFICACION

En los últimos años la ovinocultura mexicana se ha fortalecido de manera considerable, incrementando el número de unidades de animales a 8 749 589 millones, con distribución principalmente en los Estado de México, Hidalgo, Zacatecas, Oaxaca, San Luis Potosí, Jalisco y Guanajuato, que concentran cerca del 55% del inventario (SIAP, 2019). Sin embargo, la producción no logra cubrir la demanda nacional, por ello, se importa carne de países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Chile. Estudios realizados por la FAO indican que el comercio de carne se encuentra especialmente reforzado por el aumento de las importaciones desde China, Japón y México (FAO, 2018).

La Linfadenitis caseosa es considerada una de las enfermedades que más afecta las unidades de producción ovina y caprina. Existen evidencias de su prevalencia en los países anteriormente mencionados, así como en México (Ochoa *et al.*, 1996; Barrietos *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2018; Parise *et al.*, 2018).

La infección es causada por *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, bacteria que provoca la formación de abscesos cutáneo y/o viscerales, originando grandes pérdidas debido al deterioro progresivo del estado general del animal y la predisposición de padecer otro tipo de enfermedades por la inmunodepresión local principalmente a nivel pulmonar y de nódulos linfoides mediastínicos lesionados (Dorella *et al.*, 2006).

Estos hechos impactan negativamente en las exportaciones y disminuyen las posibilidades de comercialización. Durante la esquila se producen cortes que son una puerta de entrada para el microorganismo, así como también el contacto directo entre heridas en la piel o la ingestión de alimentos contaminados (Aleman y Spier, 2001; Chirino-Zarraga *et al.*, 2005).

Esta enfermedad tiene implicaciones zoonóticas en el personal dedicado a la cría y explotación ovina y caprina (Bastos *et al.*, 2012; Fernández-Alonso *et al.*, 2018). El tratamiento de la Linfadenitis caseosa es difícil, debido a que es provocada por una bacteria intracelular facultativa que se caracteriza por producir la enfermedad de manera crónica y latente. El microorganismo es capaz de sobrevivir y multiplicarse aun dentro de las células (Stefanska *et al.*, 2010), estando en un nicho inaccesible a los antibióticos, por lo cual la vacunación para lograr la activación del sistema inmune adaptativo, constituye una alternativa importante para el control de la enfermedad (Dorella *et al.*, 2009). Actualmente se trabaja en función de evitar el uso de antibióticos para disminuir la resistencia antimicrobiana y en este sentido la vacunación es el método más efectivo y económico para la

prevención, control y erradicación de enfermedades infecciosas. Mediante la vacunación se estimula en el hospedero los mecanismos destinados a la eliminación del patógeno, así como activación de la memoria inmunológica. Hasta la fecha las vacunas comerciales diseñadas para el control de la enfermedad, presentan resultados variables en los rebaños vacunados (Widson y Bush., 2016). La protección proporcionada por las vacunas comerciales está asociada a la producción de anticuerpos anti-exotoxina PLD, los cuales protegen contra el daño tisular y la diseminación del microorganismo; sin embargo, es una protección parcial ya que se requiere mayor activación de la respuesta inmune celular, necesaria para eliminar las bacterias intracelulares (Bastos *et al.*, 2012). En el mercado internacional existen vacunas vivas atenuadas o inactivadas, multicomponentes y con fracciones de exoproteínas contra *C. pseudotuberculosis* que son usadas principalmente en países desarrollados; sin embargo, estas no han logrado una protección eficaz (O'Reilly, 2010; Windsor, 2011).

Las investigaciones recientes se han enfocado en el estudio de moléculas con potencialidades para el desarrollo de nuevas vacunas (Galvao *et al.*, 2017; Raynal *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018) y en este sentido las vacunas de subunidades con proteínas recombinantes han presentado resultados satisfactorios (Silva *et al.*, 2014; Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018).

En México no se comercializan ninguna de las vacunas existentes y diversos estudios han demostrado la presencia de *C. pseudotuberculosis* en las zonas productoras del país (Parise *et al.*, 2018; Varela *et al.*, 2018). Por tal motivo es importante trabajar en la obtención y caracterización de proteínas posibles candidatos vacunales, partiendo de un aislado de origen autóctono, que garantice la reactividad cruzada y conservación de los caracteres inmunogénicos en comparación con otras cepas de origen mexicano, para lograr una protección eficaz. Por otra parte, la obtención de estas proteínas por vía recombinante constituye un método eficiente, que confiere altos rendimientos de producción con menores costos, evita el riesgo de manipulación de grandes volúmenes de microorganismos patógenos y permite la obtención de antígenos inmunogénicos con elevados niveles de pureza (Guevara-Hernández *et al.*, 2013; González y Fillat, 2018).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las proteínas recombinantes PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidas de un aislado de origen mexicano, constituyen antígenos con potencial inmunogénico.

## V. OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar las proteínas recombinantes PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a partir de un aislado mexicano.

### V.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**1.1** Amplificar mediante PCR la secuencia de los genes completos que codifican para las proteínas PLD y CP40 de *C. pseudotuberculosis* aislado de origen mexicano.

**1.2** Clonar los genes *pld* y *cp40* en un plásmido para la expresión de las proteínas en la bacteria hospedera *Escherichia coli*.

**1.3** Secuenciar los plásmidos recombinantes y establecer la identidad de la secuencia de los genes insertados.

**1.4** Realizar un análisis filogenético de *C. pseudotuberculosis* aislado 2J-L, basado en la secuencia de los genes *pld* y *cp40*.

**1.5** Analizar la identidad de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de las proteínas recombinantes PLD y CP40.

**1.6** Caracterizar *in silico* las propiedades físico-químicas y estructura de las proteínas recombinantes PLD y CP40.

**1.7** Inducir la expresión de las proteínas recombinantes PLD y CP40 en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*.

**1.8** Identificar la expresión de las proteínas recombinantes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

**1.9** Identificar epítomos lineales y discontinuos de células B y epítomos de células T en el contexto MHC I, de las proteínas recombinantes PLD y CP40 del aislado 2J-L.

**1.10** Estimar la conservación de los epítomos de las proteínas recombinantes PLD y CP40 del aislado 2J-L, en comparación con las proteínas de las cepas de origen mexicano MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29.

**1.11** Predecir el potencial inmunogénico de las proteínas recombinantes PLD y CP40 como futuros candidatos vacunales.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Límite de Espacio y Tiempo

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México. El CIESA se localiza en el kilómetro 12.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca–Atacomulco. La investigación se efectuó en un periodo de tiempo comprendido desde el 1 de agosto del 2018 al 31 de julio del 2020.

### VI.2 Microorganismos

El material genético empleado para la obtención de los genes *pld* y *cp40* se extrajo de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* aislamiento 2J-L, obtenido de un caso clínico en un ovino del Estado de Jalisco, México. Este aislado autóctono se caracterizó en un estudio previo por medio del sistema API-Coryne (Lab. Biomeriux, REF, 20-900. Francia) e identificación de los genes de virulencia y patogenicidad *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*, *hsp60* y *pld*, así como los genes *rpoB* y gen *16s rRNA* (Varela *et al.*, 2018). *C. pseudotuberculosis* cepa 43926 ATCC fue utilizada en el estudio como control positivo. Las cepas se cultivaron en agar sangre, 40g/L de agar y 25mL de sangre de carnero, incubadas a 37°C durante 24-48 h en condiciones de anaeróbiosis. Luego se cultivaron colonias puras y aisladas, en medio líquido Infusión Cerebro-Corazón (BHI) 37g/L, durante un periodo de incubación de 48 a 72 h a 37°C.

La cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con genotipo [F -  $\phi$ 80lacZ  $\Delta$ M15 $\Delta$  (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk - , mk +) gal - phoA supE44  $\lambda$  - thi - 1 gyrA96 relA1] se utilizó en las etapas de clonaje y replicación de los plásmidos recombinantes transformados con los genes *pld* y *cp40*. La cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) con genotipo [F'ompT [lon] hsdSB (rB- mB-)] que porta el profago  $\lambda$  que contiene el gen de la ARN polimerasa del fago T7, se empleó en la expresión de las proteínas recombinantes. El cultivo para el mantenimiento y conservación de estas cepas de *E. coli* se realizó en medio Luria-Bertani (LB): Triptona 10g/L (p/v), extracto de levadura 5g/L (p/v), NaCl 10g/L (p/v) con una incubación de 16 h a 37°C.

### VI.3 Extracción del ADN de las cepas de *C. pseudotuberculosis*

La extracción del ADN total de *C. pseudotuberculosis* 2J-L y cepa 43926 ATCC, se realizó mediante el empleo del kit comercial FAST ID Genomic DNA Extraction (FANSA, EUA). Siguiendo las

especificaciones del proveedor se centrifugaron 2mL de cultivo de las cepas de *C. pseudotuberculosis* en medio BHI, a 10 000 g x 2 min para obtener el pellet de células. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1mL de buffer de lisis con Proteinasa K (20mg/mL). Luego se mezcló vigorosamente por vortex y se incubó a 65°C por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 10 000 g x 5 min y se depositó 500µL del sobrenadante en un tubo de micro-centrífuga nuevo. Se adicionaron 500µL de buffer de unión genómico y se centrifugó a 10 000 g x 5 min. El sobrenadante se añadió a una columna de unión de ADN y se centrifugó a 10 000 g x 2 min. Se lavó una vez la columna con 650µL de buffer de lavado y tres veces con etanol al 75%. La elusión final se realizó con 100µL de 1x TE y se conservó a -20°C.

#### VI.4 Identificación de las cepas de *C. pseudotuberculosis* mediante PCR

La identificación de las cepas de *C. pseudotuberculosis* aislamiento 2J-L y 43926 (ATCC), se realizó mediante la amplificación múltiple de fragmentos de tres genes específicos *16s rRNA*, *rpoB* y *pld*. La técnica de PCR multiplex se realizó según el protocolo establecido por Pacheco *et al.* (2007) (Tabla 1), en un volumen final de 25µl conteniendo 12.5 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 1µl de cada cebador (100pmol/µL) y 2µl de DNA (30ng/µL). El programa de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC 512 Prime, USA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 40s y 68°C por 1 min 30s; y una extensión final de 68°C por 7 min. Como control negativo se incluyó una reacción con todos los componentes y agua libre de nucleasas en lugar de la muestra de ADN.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos para la identificación por PCR de las cepas *C. pseudotuberculosis* aislamiento 2J-L y 43926 (ATCC).

Gen	Cebadores	Secuencias	pb	Producto
<i>16s RNAr</i>	16s-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	20	816pb
	16s-R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT	20	
<i>rpoB</i>	rpoB-F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	20	446pb
	rpoB-R	TCCATTTGCGCCAAGCGCTG	20	
<i>pld</i>	Pld-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	20	203pb
	Pld-R	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG	23	

### VI.5 Amplificación de los genes *pld* y *cp40* mediante PCR

El diseño de los cebadores para la amplificación de los genes *pld* y *cp40* se realizó teniendo en cuenta las secuencias reportadas en la base de datos del GenBank de los genes *pld* (número de acceso: L16587.1 y *cp40* (número de acceso: JF299259).

También se adicionó la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, que se emplearan en las etapas de clonaje. Para el diseño de los oligonucleótidos se emplearon los programas Primer 3 Plus (<https://primer3plus.com/>) y Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes *cp40* y *pld*.

GenBank	Cebadores	Secuencias	Enzima	TM	pb	Producto
CP40: JF299259	CP40-F	<u>CCATGGGTCCA</u> ACTCGCCTCGGC	<i>NcoI</i>	60.8	23	1479
	CP40-R	CTCGAGCGTGCAGTGGTGGGC	<i>XhoI</i>	59	22	
PLD: L16587.1	Pld-F	<u>CCATGGCTTTT</u> GTTGCTCTATTTATCGAA	<i>NcoI</i>	55.7	29	1074
	Pld-R	CTCGAGCTCGTAGTCATTCCAACCG	<i>XhoI</i>	54.2	25	

Las reacciones de PCR para la obtención de los genes *pld* y *cp40* se realizaron en un termociclador (Techne TC 512 Prime, USA) en un volumen final de 25µL conteniendo 12.5µL 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 1µL de cada cebador (100pmol/µL) y 2µL de DNA (30ng/µL). Para la amplificación del gen *pld* se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min y 72°C por 2min; y una extensión final de 72°C por 7 min. Para la amplificación del gen *cp40* el programa empleado consistió en: etapa de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 66°C por 1 min y 72°C por 1 min 30s; y una extensión final de 72°C por 5 min. En cada reacción se incluyó un control negativo con todos los reaccionantes excluyendo el ADN.

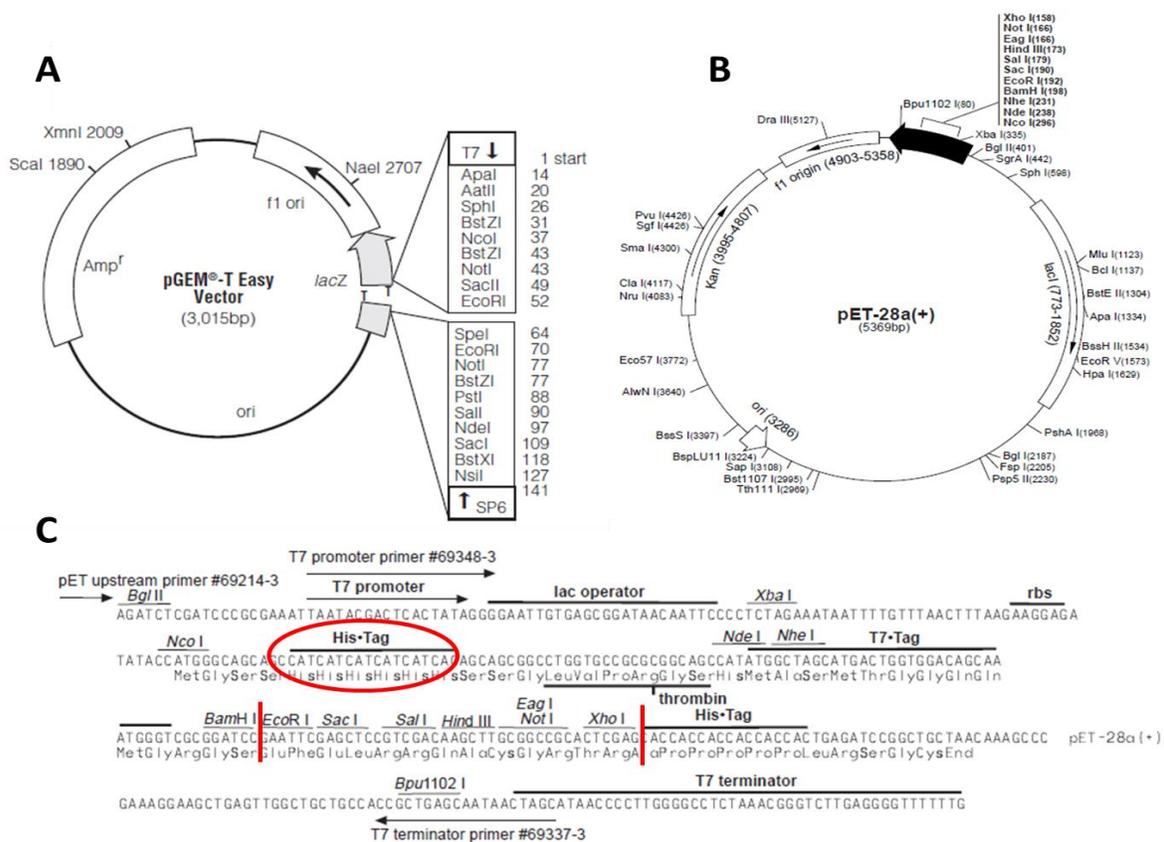
### VI.6 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de 0.8, 1 y 1.5% de agarosa fueron utilizadas en la detección y visualización de los fragmentos amplificados de ADN (*16S rRNA*, *pld*, *rpoB*), genes completos *pld* y *cp40*, así como los plásmidos recombinantes. Los geles se sometieron durante 45 min a 110V en una fuente de poder (AAHoefer, USA) para la separación de las moléculas de ADN. Los geles teñidos con bromuro de etidio permitieron la visualización del ADN utilizando luz UV en un trasiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-

imagen System, USA). Se emplearon marcadores de peso molecular de 100pb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, USA) y de 1Kb O'GeneRuler (Fermentas, USA).

### VI.7 Plásmidos y estrategia de clonaje

El plásmido comercial lineal pGEM-T Easy (Promega, USA) se empleó en el clonaje de los genes amplificados mediante PCR. Este contiene una timina en cada extremo 3', lo que facilita la inserción de fragmentos de ADN amplificados con la enzima Taq polimera, ya que esta genera fragmentos poliadenilados. En este plásmido los promotores para la transcripción *in vitro* T7 y SP6 flanquean un sitio múltiple de clonación dentro de la región codificante del péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ - galactosidasa, lo que permite la selección de los clones recombinantes mediante la discriminación entre colonias blancas y azules. También cuenta con un gen de resistencia a ampicilina que permite el crecimiento de las cepas transformadas en medio de cultivo de selección con antibiótico (Figura 8A).



**Figura 8.** Plásmidos empleados en el clonaje de los genes y la expresión de las proteínas. (A) Plásmido replicativo pGEM-T Easy empleado en el clonaje de los genes de interés. (B) Plásmido pET28a para la expresión de las proteínas en *Escherichia coli*. (C) Diseño del clonaje en el vector de expresión pET28a. La secuencia del gen de interés queda insertada en la posición franqueada por la secuencia de

las enzimas de restricción *EcoRI/XhoI* señaladas en rojo. La cola de 6 histidinas quedará insertada en el extremo N-terminal de la proteína.

El plásmido pET28a (Novagen, Alemania) fue utilizado para la expresión de proteínas en *E. coli* BL21 (DE3) bajo la regulación del promotor T7 (Figura 8B). Este plasmido presenta un sitio múltiple de clonaje con un amplio rango de sitios de reconociendo de enzimas de restricción, así como un gen de resistencia a kanamicina que se emplea en la selección de clones recombinantes. Además, posee dos regiones que codifican una cola de seis histidinas que puede ubicarse en el extremo N-terminal o C-terminal de las proteínas recombinantes, para el marcaje y procesos de purificación mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (Figura 8C).

#### **VI.8 Purificación de los genes *pld* y *cp40* a partir del gel de agarosa**

Los genes se purificaron de la mezcla del PCR usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). El producto del PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y las bandas correspondientes a los genes de interés se cortaron del gel de agarosa con bisturí estéril. Las bandas de agarosa se pesaron y se adiciono 10µL de buffer de unión a la columna por cada 10g de agarosa. Se incubó a 42°C por 10 min y durante este tiempo, se mezcló por vortex en intervalos de 2 min. Luego se transfirió el producto a la minicolumna, incubándose 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 16 000 g x 2 min. Se adicionó 700µL de solución de lavado de membrana, se centrifugó a 16 000 g x 2min y se desechó el sobrenadante. El lavado se repitió con 500µL de solución de lavado de membrana y nuevamente se centrifugó a 16 000 g x 5 min. Se realizó una centrifugación a 16 000 g x 1 min para eliminar restos de solución de lavado. La minicolumna se transfirió a un tubo limpio y se eluyó el ADN con 50µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, centrifugándose 16, 000 g durante 1 min. Los fragmentos purificados se almacenaron a -20°C. Se midió la concentración del DNA en un espectrofotómetro (UV- Vis QUAWELL 5000, USA) alcanzando una concentración de 35ng/µL para el gen *cp40* y de 40ng/µL para el gen *pld*.

#### **VI.9 Reacción de Ligazón de los genes *pld* y *cp40* en el plásmido de clonaje pGEM-T Easy**

Los genes extraídos del gel de agarosa se insertaron en el plásmido pGEM-T Easy. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µL, donde se añadió 1µL de la enzima T4 ADN ligasa (Promega, USA), 10µL del Buffer T4 ligasa 10x (Promega, USA), 1µL de plásmido pGEM-T Easy (Promega,

USA) y 5µL del gen. Las reacciones se incubaron a 16°C, durante 16 h. Se detuvo la reacción mediante incubación a 65°C por 10 min. La ligazón se almacenó a -20°C hasta su empleo para la transformación de células de *E. coli*.

#### **VI.10 Preparación de células *Escherichia coli* quimiocompetentes**

La preparación de las células de *Escherichia coli*, cepas DH5α y BL21 (DE3) quimiocompetentes se realizó según protocolo de Sambrook *et al.*, (2001). Se inocularon 100µL de células provenientes de un glicerol, en tubos con 5mL de medio estéril LB (sin antibiótico), incubándose a 37°C durante 16 h en agitación a 220 rpm. Luego se tomó 1mL del crecimiento celular y se re-cultivo en 10mL de medio LB estéril, el cual fue incubado a 37°C durante 4 h en agitación a 220 rpm. Se enfriaron en hielo tubos Falcon de 50mL a los cuales se transfirieron las bacterias y se centrifugaron a 3000 g x 10 min a 0°C. El sobrenadante se decantó y el pellet obtenido se re-suspendió con 1mL de CaCl<sub>2</sub> a 0.1 M y se centrifugó nuevamente por 10 min a 3000 g a temperatura de 0°C. Nuevamente se re-suspendió con 1mL de CaCl<sub>2</sub> a 0.1 M y en viales estériles se prepararon 10 alícuotas de células quimiocompetentes. Las alícuotas tuvieron 200µL volumen final de una suspensión de células preparada a partir de (100µL de células bacterianas y 100µL de una solución de CaCl<sub>2</sub> a 0.1 M y Glicerol 50% diluido (1:10). Posteriormente las alícuotas de células quimiocompetentes se conservaron a -80°C.

#### **VI.11 Transformación de *Escherichia coli* cepas DH5α y BL21 (DE3)**

Las células quimiocompetentes se transformaron con las reacciones de ligazón por el método de choque térmico establecido por Sambrook *et al.*, (2001). En un tubo estéril se mezclaron 10µL de las reacciones de ligazón y 100µL de células quimiocompetentes, incubándose 30 min en hielo. Luego se incubaron a 42°C (baño seco) por 45s. Se trasladaron a hielo durante 2 min y luego se adicionaron 900µL de medio LB estéril (sin antibióticos). Los viales se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación a 220rpm. Luego las cepas de *E. coli* DH5α transformadas con las ligazones del plásmido pGEM-T Easy se sembraron (500µL) en placas de agar Luria Bertani suplementado con ampicilina 100 µg/mL, isopropil-tio-β-D-galactósido (IPTG) 96 µg/mL y Xgal (5 bromo-4 cloro-3-indolil-β-D-galactósido) 40 µg/mL, en incubación a 37°C durante 24 h. Las colonias blancas correspondieron a los clones bacterianos recombinantes, que contienen los plásmidos transformados. Las cepas *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las ligazones del plásmido pET28a se sembraron (500µL -1000µL) en placas de

agar Luria-Bertani suplementado con kanamicina 50 µg/mL (LBK), con un periodo de incubación de 24 h a 37°C.

#### **VI.12 Banco de células de *Escherichia coli* DH5α y BL21 (DE3) transformadas**

Se emplearon colonias aisladas de *E. coli* transformadas con los plásmidos de clonaje y de expresión, crecidas en medio agar Luria Bertani (LB) selectivo con antibióticos, para el cultivo en 5mL de medio LB estéril (sin antibióticos) durante 16 h a 37°C en agitación a 220rpm. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3000 g durante 10 min y se re-suspendió el pellet con 1mL de medio LB. Se prepararon alícuotas añadiendo 500µL de célula y 500µL de glicerol al 50%. Las células se almacenaron a -80°C para su conservación.

#### **VI.13 Aislamiento y purificación de plásmidos**

La purificación de los plásmidos a partir de las cepas de *E. coli* transformadas se realizó mediante el empleo del Kit comercial High-Speed Plasmid Mini Kit (IBI Scientific, USA). La extracción se realizó a partir de 1.5mL de cultivo de *E. coli*, los cuales se centrifugaron a 14 000 g x 1 min. Luego se añadió 200µL de solución PD1 y se mezcló por vortéx. Posteriormente se adicionaron 200µL de buffer PD2 y se mezcló 10 veces por inversión del microtubo. Luego se añadió 300µL de buffer PD3, se mezcló por inversión del microtubo 10 veces y se centrifugó a 14 000 g x 3 min. Se añadió la muestra en una columna PD y se centrifugó a 14 000 g x 30s. Se realizó un lavado con 400µL de buffer W1 y luego con 600µL de buffer de lavado, centrifugándose a 14 000 g x 30s. Una etapa de centrifugación a 14 000 g x 3 min se realizó para eliminar los restos de buffer de lavado. La elusión final se realizó con 50µL de buffer de elusión proporcionado por el fabricante. El ADN plasmídico se conservó a -20°C.

#### **VI.14 Análisis de los plásmidos recombinantes por digestión enzimática**

Los plásmidos recombinantes se comprobaron a través de digestión enzimática. La reacción se realizó en un volumen final de 20µL, 5µL de DNA plasmídico, 0.5µL de cada una de las enzimas de restricción (*EcoRI/NcoI/XhoI*), 2µL de buffer D (10X) y 2µL de BSA 10X. La reacción de digestión se incubó a 37°C durante 3 h. El producto de la digestión enzimática se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, visualizando los fragmentos con tinción de bromuro de etidio en un trasiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-imagen System, USA).

## VI. 15 Análisis de la secuencia de los genes *pld* y *cp40*

Para la secuenciación de los plásmidos transformados con los genes *pld* y *cp40* se contrató el servicio de secuenciación automática por el método de Sanger, a la unidad de Servicios Genómicos del Centro LANGEBIO-CINVESTAV.

**Tabla 3.** Cepas empleadas para el estudio filogenético del aislado 2J-L, en base a las secuencias de los genes *pld* y *cp40*.

No. Acceso	Cepas	Biovar	Hospedero	Lesión	País	Referencias
CP002097.2	FRC 41	Ovis	Humano	Linfadenitis Necrotisante	Francia	Trost <i>et al.</i> , 2010
CP020356.1	Sigma E	Ovis	Cabra	Absceso	Brasil	Pacheco <i>et al.</i> , 2012
NZ_CP035678	OVIZ01	Ovis	Oveja	Nódulo Linfático	Brasil	Sá <i>et al.</i> , 2013
CP015100.2	T1	Ovis	Cabra	Lesión granulomatosa	Brasil	Almeida <i>et al.</i> , 2016
CP019769.1	MIC6	Ovis	Oveja	Absceso	Brasil	Direct Sub/Sousa <i>et al.</i> , 2017
NC_017300	1002	Ovis	Cabra	Absceso	Brasil	Sousa <i>et al.</i> , 2019
CP010795.2	29156	Ovis	Bovino	Lesión cutánea	Israel	Sousa <i>et al.</i> , 2019
NZ_LR590479.1	NCTC4681	Ovis	Oveja	-	Australia	Direct Submission/2019
CP017711.1	MEX1	Ovis	Cabra	Absceso retrofaríngeo	México	Parise <i>et al.</i> , 2019
CP046644.1	MEX2	Ovis	Cabra	-	México	Direct Sub/Araujo <i>et al.</i> , 2019
CP014543.1	MEX9	Ovis	Cabra	Absceso Pre-escapular	México	Parise <i>et al.</i> , 2019
CP013697.1	MEX25	Ovis	Oveja	Absceso paratiroideo	México	Parise <i>et al.</i> , 2019
CP016826.1	MEX29	Ovis	Oveja	Absceso retrofaríngeo	México	Parise <i>et al.</i> , 2019
NZ_CP017291.1	MEX30	Equi	Caballo	Musculo Pectoral	México	Muñoz <i>et al.</i> , 2016
NZ_CP017292.1	MEX31	Equi	Caballo	Musculo Pectoral	México	Muñoz <i>et al.</i> , 2016
CP012022.2	262	Equi	Bovino	Linfangitis ulcerosa	Bélgica	Araujo <i>et al.</i> , 2016
CP003652.3	Cp162	Equi	Camello	Absceso de cuello	Reino Unido	Hassan <i>et al.</i> , 2012
CP003421.4	Cp31	Equi	Búfalo	Absceso	Egipto	Silva <i>et al.</i> , 2012
KY041980.1	Endo CP40 gene	Ovis	Oveja	Tejido Linfoide	Alemania	Shadnezhad <i>et al.</i> , 2016
AB304286.1	<i>Corynebacterium ulcerans</i> , <i>pld</i>	-	Humano	-	Japón	Seto <i>et al.</i> , 2008
AF296340.1	<i>Streptococcus pyogenes</i> , EndoS	-	Humano	-	USA	Collin y Olsen, 2011
AY376354.1	<i>Enterococcus faecalis</i> , EndoE	-	Humano	-	USA	Collin y Fischetti, 2004
L06331.1	<i>Flavibacterium meningosepticum</i> EndoF2	-	-	-	-	Tarentino <i>et al.</i> , 1993

Las secuencias de ADN se analizaron mediante los programas de computación MEGAX (v10.0), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), “Gene Runner” v3.05 (Hastings Software Inc., EE.UU) y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>). Para el análisis filogenético se realizó una búsqueda BLAST de la base de datos GenBank disponible en NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se escogieron las secuencias de los genes de cepas aisladas de diferentes hospederos (Tabla 3), estas fueron incluidas en el MEGAX y posteriormente se realizó un alineamiento clásico ClustalW, para obtener una matriz resultante. La construcción de los árboles filogenéticos basados en la secuencia de los genes *pld* y *cp40* se realizó mediante el empleo del método UPGMA, donde se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama. El número de cada nodo representa el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio.

#### **VI.16 Fermentación de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*, para la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes PLD y CP40**

Las fermentaciones se realizaron a partir de colonias aisladas de las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas (mediante choque térmico y permeabilización con CaCl<sub>2</sub>, Sambrook *et al.*, 2001) con los plásmidos pET28a-*pld*, pET28a-*cp40* y pET28a nativo, inoculadas en pre-cultivos de 20mL de medio LBK incubados a 37°C durante 16 h en agitación a 220 rpm. Posteriormente los cultivos se transfirieron a 300mL de medio LBK fresco y se incubaron a 37°C en agitación de 220 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO (600 nm) de 0,8 se tomaron 100µL de cada cultivo (tiempo 0) y se procedió a la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición de IPTG 1mM. Posteriormente los cultivos se incubaron a 37°C durante 5 h y luego se centrifugaron a 6 000 g x 30 min. Los productos celulares obtenidos de la centrifugación de los cultivos se re-suspendieron en PBS, para posteriormente determinar la expresión de las proteínas recombinantes mediante electroforesis SDS-PAGE al 15% (m/v).

### **VI.17 Electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

La separación de proteínas según su talla molecular se realizó mediante SDS-PAGE en condición reductora. Para ello, se utilizó la solución de aplicación 2X [SDS 6% (p/v), bromofenol azul 0.05% (p/v), glicerol 20% (v/v), Tris-HCl 125mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v), pH 6.8], la cual se calentó a 95°C junto a 10 $\mu$ L de la muestra, durante 5 min, según lo descrito por Laemmli, (1970). En todos los análisis por SDS-PAGE se emplearon geles al 15% (m/v). Las electroforesis se realizaron a 80V y se empleó el tampón de corrida de proteínas [Glicina 1.92 M, Tris base 0.25 M, SDS 0.1% (p/v), pH 8.3]. La visualización de las bandas se logró mediante la incubación del gel en solución de tinción [azul de Comassie 0.05% (p/v), metanol 10% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] durante 20 min a temperatura ambiente, con agitación lenta. Posteriormente, se hicieron lavados sucesivos con solución de destinción [metanol 10% (v/v), ácido acético 10% (v/v)], también con agitación lenta hasta obtener un contraste apropiado de las bandas.

### **VI.18 Caracterización *in silico* de las proteínas recombinantes PLD y CP40: Características físico-químicas, predicción de estructura y potencial inmunogénico**

Las secuencias de aminoácidos deducidos de la secuencia de nucleótidos se utilizaron para la caracterización *in silico* de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L con el empleo de técnicas bioinformáticas. Las secuencias de las proteínas se analizaron mediante el empleo de BLAST-X (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>) para estimar el porciento de homología de las proteínas en comparación con las secuencias disponible en la base de datos del NCBI. También se establecieron los dominios conservados y sitios activos, con el análisis de los residuos de aminoácidos involucrados en la actividad enzimática, mediante la búsqueda de dominios conservados del NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=GF48E0UZ01R & mode =all](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=GF48E0UZ01R&mode=all)). Los parámetros físico-químicos fueron estimados por el programa ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) incluyendo el peso molecular, punto isoeléctrico teórico (pI), composición de aminoácidos, coeficiente de extinción, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropática (GRAVY). El portal web Phyre2 se utilizó para el modelado, predicción y análisis de las estructuras de las proteínas. Este portal web incluye diferentes programas como HHpred 1.51 para la detección de

plantillas, Psi-pred 2.5 para la predicción de estructuras secundarias, Disopred 2.4 para la predicción de desorden en las estructuras, Memsat\_SVM para la predicción de dominios de transmembrana, modelado de múltiples plantillas, Poing 1.0 *ab initio* para el modelado de estructuras sin plantillas y la versión independiente de Jmol visor utilizado en el sitio Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). El programa BepiPred-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), se utilizó para la predicción de epítomos de células B, así como una estimación de la estructura secundaria de los epítomos y su exposición a la superficie, para un valor de corte de 0.5. La interface web IEDB (<http://www.iedb.org.com>) se empleó para la identificación de epítomos lineales de células B [de unión a anticuerpos (valor corte:0.5), de mayor accesibilidad a la superficie (valor corte:1.0), y de mayor antigenicidad (valor corte:0.5)], así como la predicción de epítomos de células T en el contexto del MHC I de modelo murino (alelos: H-2-Kb, H-2-Kd, H-2-Kk, H-2-Db, H-2-Qa1) para un valor de corte de 0.5. Los epítomos de células B y T fueron evaluados por la herramienta ECV (por sus siglas en inglés, *Epitope Conservancy Patterns*) disponible en la página web IEDB, en busca de patrones conservados en comparación con las secuencias de las proteínas PLD y CP40 de las cepas de origen mexicano (MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29). El programa ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>), se empleó para la predicción de epítomos lineales y conformacionales de células B, en base a las estructuras 3D de las proteínas, en formato PDB. Los epítomos lineales y conformacionales de células B fueron visualizados en el programa Jmol. El programa VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen>) se utilizó para estimar la capacidad antigénica de las proteínas, como una fracción de unidad, para su clasificación como antígeno probable o antígeno no probable candidato para el desarrollo de vacunas, para un valor de corte de 0.4. También se utilizó Vaxign (<http://www.violinet.org/vaxign/>), para predecir la localización celular de las proteínas, dominios de transmembrana y posible función, empleando un valor de corte de 0.5.

## VII. RESULTADOS: PUBLICACIONES

1. **Artículo científico:** Characterization and structure prediction of PLD and CP40 from a Mexican isolate of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Autores: Rodríguez Domínguez María Carla, Montes de Oca Jiménez Roberto\*, Varela Guerrero Jorge Antonio, Tenorio Borroto Esvieta, Efrén Díaz Aparicio, Humberto González Díaz.

Revista: Current Topic in Medicinal Chemistry

12/10/2020

Gmail - Submission Acknowledgement | BMS-CTMC-2020-200



María Carla Rodríguez Domínguez <mariacarlarodriguezdominquez@gmail.com>

### Submission Acknowledgement | BMS-CTMC-2020-200

1 mensaje

Current Topics in Medicinal Chemistry <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

12 de octubre de 2020, 17:23

Responder a: Current Topics in Medicinal Chemistry <ctmc@benthamscience.net>

Para: romojimenez@yahoo.com

Cc: ctmc@benthamscience.net, yasirmaqsood@benthamscience.net, mariacarlarodriguezdominquez@gmail.com

**Reference#: BMS-CTMC-2020-200**

Submission Title: Characterization and structure prediction of proteins PLD and CP40, from a Mexican isolate of *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*

Dear Dr. Montes De Oca Jiménez,

Thank you for your submission to "Current Topics in Medicinal Chemistry(CTMC)". It will be sent to the Editor-in-Chief for his initial provisional approval. Once this is obtained it will be sent for peer-review. The manuscript is being processed on the clear understanding that it contains original work that has neither been published earlier nor has it been simultaneously been submitted for publications elsewhere. In case this is not so, then kindly let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **Cross Check's iThenticate** software to check for similarities between the submitted and already published material to minimize any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science Ethical Guidelines for Publication, all manuscripts are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed on the Journal's website.

**Articles which are well referenced (100 or more references) may have high chances of acceptance by referees and they are likely to attract a greater number of citations. The recommended number of references as per norm (<https://clarivate.com/essays/impact-factor/>) for Review Articles is approximately 100 or more, for Research Articles 75 or more, for Mini Reviews 75 or more & for Letter Articles 50 or more.**

In case of any doubt or conflict please contact us.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager to whom all correspondence may kindly be addressed:

Name: Allen B. Reitz

Affiliation: Fox Chase Chemical Diversity Center, Fox Chase Chemical Diversity Center

Country: USA

Email: ctmc@benthamscience.net

**Few tips to enhance the visibility & citations of your article:**

- If you don't already have an ORCID ID please create one at <https://orcid.org/>
- **Selection of Appropriate Keywords:** Please choose important and relevant keywords that researchers in your field could be searching for so that your paper can appear in many database searches. In biomedical fields, MeSH terms are a good 'common vocabulary' source to draw keywords from: see <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>

*Vo. Bo. J. Jiménez*  
*Dra. Adriana C. Gutiérrez C.*

<https://mail.google.com/mail/u/1?ik=ede52567fe&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1680386437856666989&simpl=msg-f%3A16803864378...> 1/2

**2. Artículo de Revisión Bibliográfica:** Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas.

Autores: Rodríguez Domínguez María Carla, Montes de Oca Jiménez Roberto\*, Varela Guerrero Jorge Antonio.

Revista: Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias



REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS



([HTTPS://CIENCIASPECUARIAS.INIFAP.GOB.MX/INDEX.PHP/PECUARIAS/AUTHOR/SUBMISSIONREVIEW/5699](https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/pecuarias/author/submissionreview/5699))

([HTTPS://CIENCIASPECUARIAS.INIFAP.GOB.MX/INDEX.PHP/PECUARIAS/AUTHOR/SUBMISSIONEDITING/5699](https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/pecuarias/author/submissionediting/5699))

**Envío**

**Autores/as:** Maria Carla Rodríguez Domínguez, Roberto Montes de Oca Jiménez, Jorge Antonio Varela Guerrero  
(<https://redirectUrl=https%3A%2F%2Fcienciaspecuarias.inifap.gob.mx%2Findex.php%2Fpecuarias%2Fauthor%2Fsubm>)  
**Título:** Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas  
**Sección:** Revisiones bibliográficas  
**Editor/a:** Elizabeth Loza-Rubio  
(<https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/user/email?redirectUrl=h>)

**Evaluación por pares**

**Ronda 1**

**Versión de la revisión:** 5699-15638-1-RV.DOCX  
([HTTPS://CIENCIASPECUARIAS.INIFAP.GOB.MX/INDEX.PHP/PECUARIAS/AUTHOR/DOWNLOADFILE/5699/15638/1](https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/pecuarias/author/downloadfile/5699/15638/1)) 2020-06-08  
**Iniciado:** 2020-06-22  
**Modificado por última vez:** 2020-09-02  
**Archivo cargado:** Revisor/a A: 5699-15975-1-RV.DOCX  
([HTTPS://CIENCIASPECUARIAS.INIFAP.GOB.MX/INDEX.PHP/PECUARIAS/AUTHOR/DOWNLOADFILE/5699/15975/1](https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/pecuarias/author/downloadfile/5699/15975/1)) 2020-08-13  
Revisor/a B: 5699-15951-1-RV.DOCX  
([HTTPS://CIENCIASPECUARIAS.INIFAP.GOB.MX/INDEX.PHP/PECUARIAS/AUTHOR/DOWNLOADFILE/5699/15951/1](https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/pecuarias/author/downloadfile/5699/15951/1)) 2020-08-11

**Decisión del editor/a**

**Decisión:** Publicable con modificaciones 2020-09-17

**Notificar al editor/a**

(<https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/author/emailEditorDecisionComment?articleId=5699>)  
Registro de correo electrónico del editor/a o autor/a  
2020-09-17

**Versión del editor/a:** Ninguno

**Versión del autor/a:** Ninguno

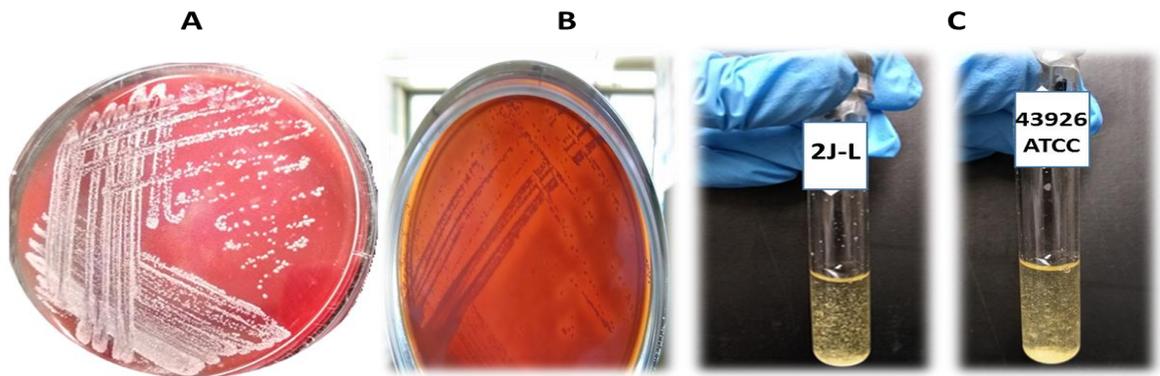
**Cargar la versión del autor/a:** Ningún archivo seleccionado

Ns. Bo  
*[Handwritten Signature]*  
Dra. Adriana Q. Gutiérrez

## VII. RESULTADOS

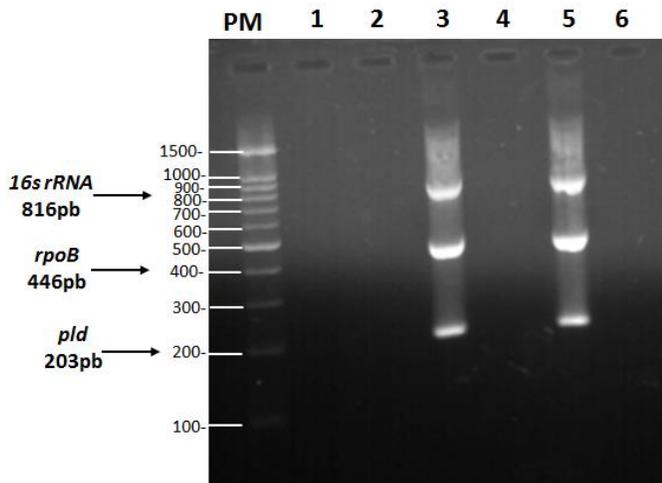
### VII.1 Identificación de *C. pseudotuberculosis* aislado de origen mexicano (2J-L)

El cultivo de las cepas de *C. pseudotuberculosis* en medio agar sangre, en condiciones de anaerobiosis, permitió la identificación de colonias color crema (Figura 9A), rodeadas de una zona de  $\beta$ -hemólisis (Figura 9B). La tinción de Gram permitió la observación de bacilos Gram positivos cortos y curvo. Las colonias aisladas se sembraron en medio BHI, obteniéndose un crecimiento bacteriano seco y escamoso (Figura 9C).



**Figura 9.** Cultivo de *C. pseudotuberculosis*. (A-B) Medio agar sangre. (C) Medio líquido BHI. La identidad molecular de las cepas de *C. pseudotuberculosis* 43926 (ATCC) y aislado 2J-L, se realizó mediante la amplificación de fragmentos de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *pld* mediante PCR Multiplex.

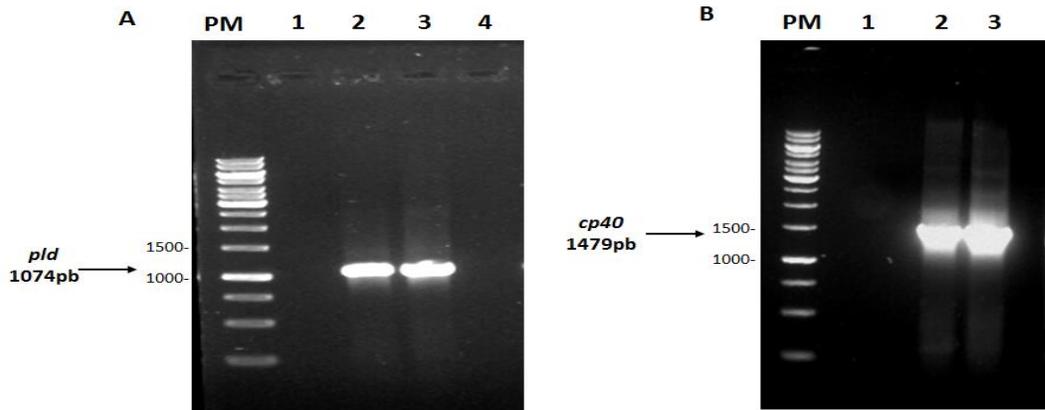
La electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) permitió la visualización de los fragmentos de los genes amplificados (Figura 10).



**Figura 10.** Identificación molecular de las cepas de *C. pseudotuberculosis* mediante la amplificación de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *pld* por PCR Multiplex. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v). **PM:** Marcador de peso molecular 100pb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, USA). **Línea 1 - 2:** Controles negativos. **Línea 3:** Genes de la cepa 43926 (ATCC). **Línea 5:** Genes del aislado 2J-L.

## VII.2 Amplificación por PCR de los genes *pld* y *cp40* de *C. pseudotuberculosis* (2J-L)

La secuencia completa de los genes *pld* (Figura 11A) y *cp40* (Figura 11B) se amplificaron mediante el empleo de la técnica de PCR. Los genes amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v), presentando un patrón electroforético según la talla esperada.



**Figura 11.** Amplificación de los genes *pld* (A) y *cp40* (B) mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v). **PM:** Marcador de peso molecular de 1Kb O'GeneRuler (Fermentas, USA). **Línea 1:** Control negativo. **Línea 2:** Genes de la cepa 43926 (ATCC). **Línea 3:** Genes del aislado 2J-L.

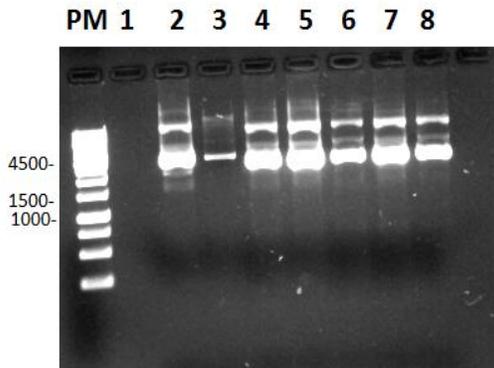
## VII.3 Clonaje de los genes *pld* y *cp40* en el plásmido replicativo pGEM-T Easy

Los genes *pld* y *cp40* se insertaron en el plásmido replicativo pGEM-T Easy mediante reacción de ligazón con la enzima T4 ligasa. Las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformadas con las reacciones de ligazón entre el plásmido pGEM-T Easy y los genes *pld* y *cp40*, se identificaron mediante el empleo de medio de cultivo de selección LBA-IPTG-Xgal. Este sistema de clonaje generó colonias azules y blancas, siendo estas últimas indicativas de colonias transformadas con los genes de interés (Figura 12).



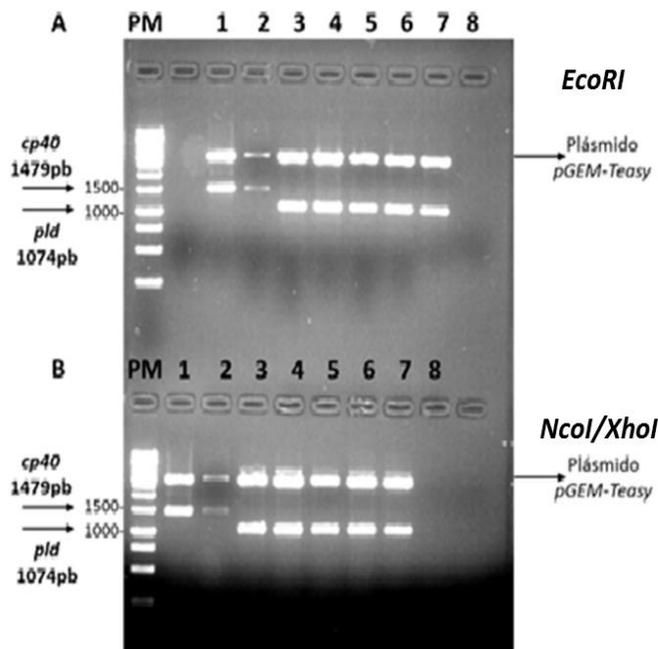
**Figura 12.** Cultivo en medio selectivo agar LBA-IPTG-Xgal de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con las reacciones de ligazón entre el plásmido pGEM-T Easy y los genes de interés. Las colonias azules corresponden a células transformadas con el plásmido sin el gen de interés. Las colonias blancas se encuentran transformadas con el plásmido religado con el gen de interés.

Las colonias blancas de *E. coli* DH5 $\alpha$  se emplearon para la obtención y purificación de los plásmidos recombinantes (Figura 13).



**Figura 13.** Purificación de plásmidos a partir de colonias blancas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con las reacciones de ligazón. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v). **PM:** Marcador de peso molecular de 1Kb O'GeneRuler (Fermentas, USA).

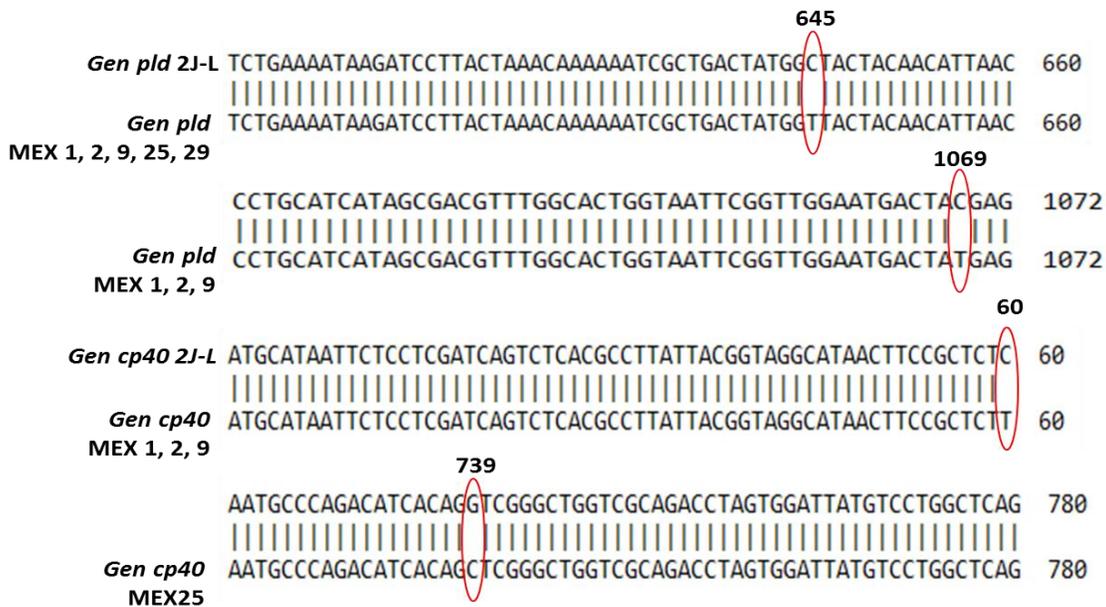
Los plásmidos recombinantes se identificaron mediante el análisis por digestión enzimática (Figura 14). La electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) permitió visualizar los plásmidos digeridos, así como los genes *pld* y *cp40* como productos de la digestión enzimática. La digestión se realizó con la enzima *EcoRI*, que cortó en los plásmidos, a ambos extremos del sitio múltiple de clonaje, liberando los genes de interés (Figura 14A). También se realizó digestión enzimática doble con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, ya que en el diseño de los oligonucleótidos el sitio de reconocimiento para estas enzimas fue incorporado en los extremos 5' y 3' de los genes de interés (Figura 14B). Los plásmidos recombinantes se purificaron a escala masiva y se enviaron a secuenciar para el análisis de las secuencias de los genes.



**Figura 14.** Digestión enzimática de los plásmidos pGEM-T Easy modificados con los genes *pld* y *cp40*. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v). **(A)** Digestión con enzima *EcoRI* de corte doble en el plásmido. **(B)** Digestión doble con enzimas *NcoI/XhoI*, corte en los extremos de la secuencia de los genes. **PM:** Marcador de peso molecular de 1Kb O'GeneRuler (Fermentas, USA). **Línea 1-2:** Plásmidos modificados con el gen *cp40* de las cepas 43926 y 2J-L. **Línea 3-4:** Plásmidos modificados con el gen *pld* cepa 43926. **Línea 5-6-7:** Plásmidos modificados con el gen *pld* del aislado 2J-L.

#### VII.4 Análisis de la secuencia de los genes *pld* y *cp40* de *C. pseudotuberculosis* (2J-L)

El análisis de las secuencias de los genes con el empleo del programa BLAST permitió establecer que el gen *pld* de *C. pseudotuberculosis* aislado 2J-L, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 99.91% en comparación con las secuencias de las cepas de origen mexicano MEX25 (CP013697.1) y MEX29 (CP016826.1) con un cambio en la posición 645 con una Citosina en vez de Timina. Con respecto a las cepas MEX1 (CP017711.1), MEX2 (CP046644.1) y MEX9 (CP014543.1) el porcentaje de similitud fue de 99.81% con dos variaciones en las posiciones 645 (C/T) y 1069 (C/T) (Figura 15A, Tabla 4A). El gen *cp40* resultó idéntico, con un 100% de similitud con respecto a la secuencia de *cp40* de la cepa MEX29 y 99,91% en comparación con MEX1, MEX2, MEX 9 con una variación en la posición 60 (C/T) y en MEX25 una variación en la posición 739 (G/C) (Figura 15B, Tabla 4B).



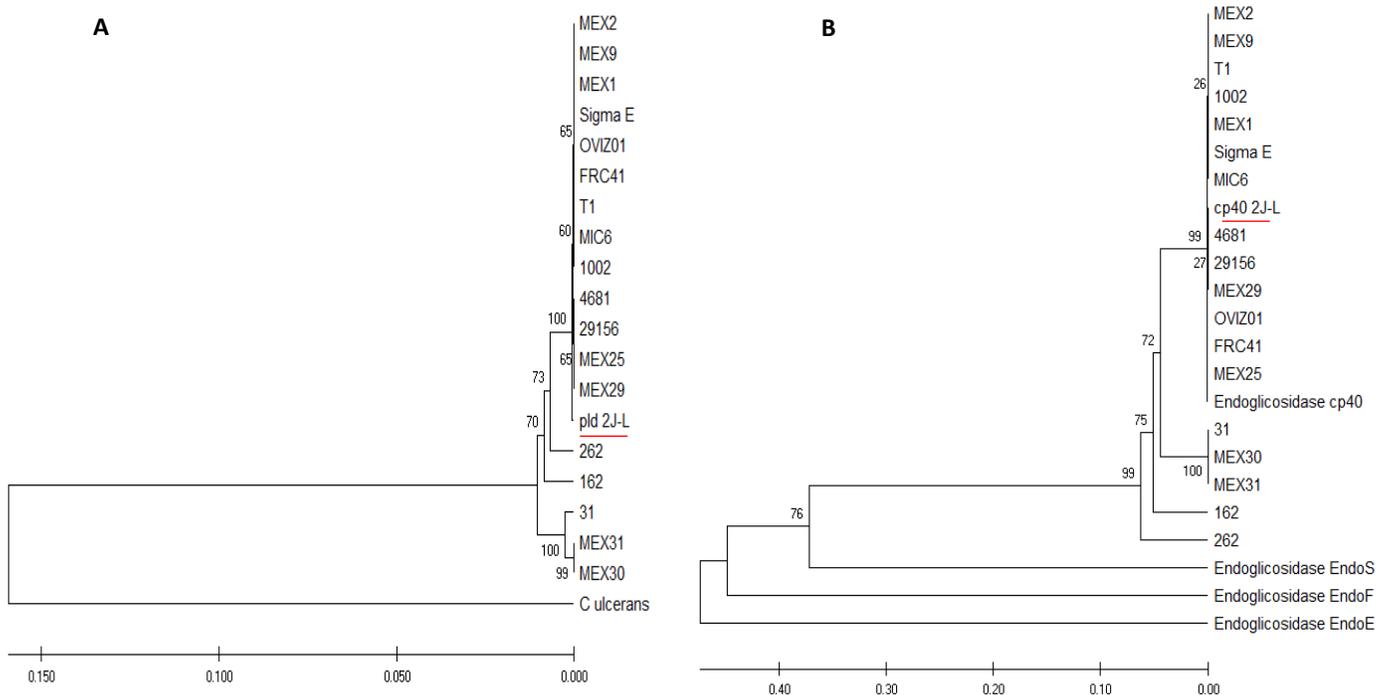
**Figura 15.** Alineamiento de las secuencias de los genes *pld* y *cp40* del aislado 2J-L en comparación con las secuencias de las cepas mexicanas informadas en la base de datos del GenBank, mediante el empleo del programa BLAST. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *pld* 2J-L presenta un cambio con respecto a la secuencia de MEX25 y MEX29, en la posición 645 (C/T) y dos variaciones con respecto a las cepas MEX1, MEX2 y MEX9 en las posiciones 645 (C/T) y 1069 (C/T). El gen *cp40* 2J-L presenta un cambio con respecto a las cepas MEX1, MEX2, MEX9 en la posición 60 (C/T) y en MEX25 en la posición 739 (G/C).

**Tabla 4.** Porcentajes de similitud de la secuencia de los genes *pld* (A) y *cp40* (B) de *C. pseudotuberculosis* (2J-L) en comparación con secuencias informadas en la base de datos GenBank (NCBI).

<b>A. Descripción, gen <i>pld</i></b>	<b>Max Score</b>	<b>Total Score</b>	<b>Cover</b>	<b>% Ident</b>
<i>C. pseudotuberculosis</i> 29156, genoma completo	1975	1975	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> NCT4681,cromosoma1	1975	1975	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX29, genoma completo	1975	1975	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX25, genoma completo	1975	1975	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> 1002, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> T1, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX2, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> FRC41, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> OVIZ01, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> SigmaE, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> MIC6, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX1, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX9, genoma completo	1969	1969	100%	99.81
<i>C. pseudotuberculosis</i> 262, genoma completo	1892	1892	100%	98.51
<i>C. pseudotuberculosis</i> Cp162, genoma completo	1881	1939	100%	98.32
<i>C. pseudotuberculosis</i> I37, genoma completo	1881	1939	100%	98.32
<i>C. pseudotuberculosis</i> 31, genoma completo	1844	1902	99%	97.76
<b>B. Descripción, gen <i>cp40</i></b>	<b>Max Score</b>	<b>Total Score</b>	<b>Cover</b>	<b>% Ident</b>
<i>C. pseudotuberculosis</i> 29156, genoma completo	2108	2108	100%	100
<i>C. pseudotuberculosis</i> NCT4681,cromosoma1	2108	2108	100%	100
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX29, genoma completo	2108	2108	100%	100
<i>C. pseudotuberculosis</i> 1002, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> T1, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX2, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> SigmaE, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MIC6, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX1, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX9, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX25, genoma completo	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> 3/99, serine proteasa	2102	2102	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> endoglicosidasa cp40	2100	2100	100%	99.91
<i>C. pseudotuberculosis</i> FRC41, genoma completo	2097	2097	100%	99.82
<i>C. pseudotuberculosis</i> OVIZ01, genoma completo	2089	2089	100%	99.74
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX31, genoma completo	1592	1592	100%	91.85
<i>C. pseudotuberculosis</i> MEX30, genoma completo	1592	1592	99%	91.85

### VII.5 Análisis filogenético del aislado 2J-L basado en las secuencias de los genes *pld* y *cp40*

Las relaciones filogenéticas entre el aislado 2J-L y diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* reportadas en la base de datos GenBank, se establecieron basados en las secuencias de *pld* y *cp40*, con la construcción de dos árboles filogenéticos (Figura 16).



**Figura 16.** Árboles filogenéticos construidos mediante el empleo del programa MEGAX con el método UPGMA, basado en las secuencias de (A) *pld* y (B) *cp40*, *C. pseudotuberculosis* (2J-L), en comparación con secuencias relacionadas reportadas en la base de datos GenBank. El árbol óptimo para *pld* se estimó con la suma de la longitud de la rama = 0.348 y para *cp40* la longitud de la rama = 1.927. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. Los árboles se estimaron teniendo en cuenta una escala, donde la longitud de las ramas presenta las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir cada árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Maximum Composite Likelihood y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio.

El análisis filogenético permitió agrupar el aislamiento 2J-L junto a cepas del biovar *ovis*, con 99% y 100% de repetición (bootstrap) *cp40* y *pld* respectivamente. Ambos análisis filogenéticos revelaron

que el aislado 2J-L es considerablemente más cercano a las cepas mexicanas MEX29 y MEX25, incluidas en un subgrupo junto con las cepas 4681 y 29156.

### VII.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de PLDr y CP40r derivado de la secuencia de nucleótidos de los genes *pld* y *cp40* de *C. pseudotuberculosis* (2J-L)

La secuencia de aminoácidos de la proteína PLDr del aislado 2J-L presentó un 100% de similitud en comparación con las secuencias de las cepas MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29 y 98.69% con respecto a PLD (WP\_048588395.1) (Figura 17A). El análisis de la secuencia de CP40r 2J-L permitió establecer que estas proteínas es 100% idéntica a las secuencias de las cepas mexicanas evaluadas, excepto por MEX25 con un 99.47% de similitud y CP40 (WP\_014522771.1) con 99.73% (Figura 17B).

A

```

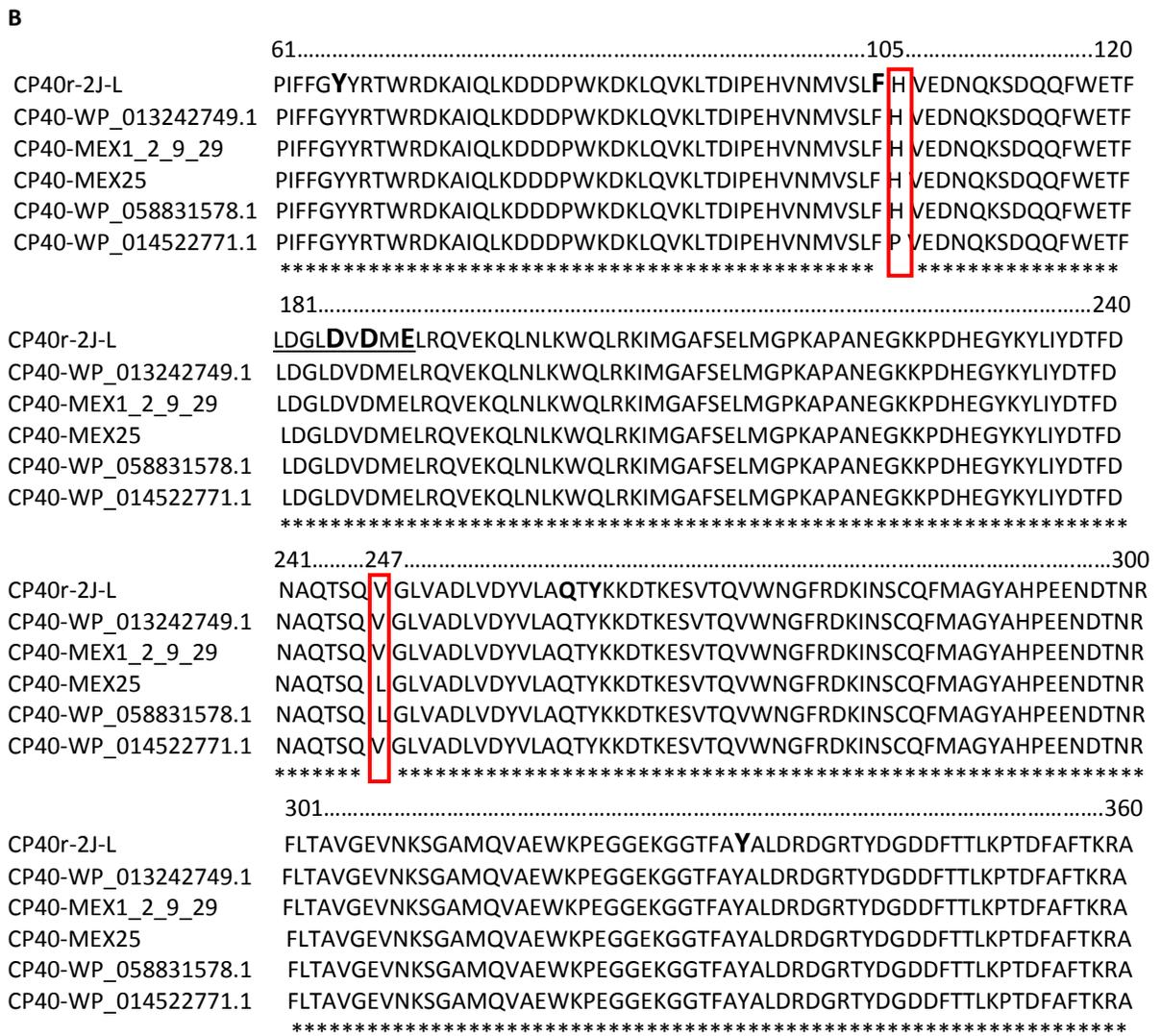
1.....28.....60
PLDr-2J-L      MREKVVFLSIIMAIMLPVGNAAPV V HNPASTANRPVYIAIAHRVLTQGVDDAVAIGA
PLD-MEX1_2_9_25_29 MREKVVFLSIIMAIMLPVGNAAPV V HNPASTANRPVYIAIAHRVLTQGVDDAVAIGA
PLD-WP_013240889.1 MREKVVFLSIIMAIMLPVGNAAPV V HNPASTANRPVYIAIAHRVLTQGVDDAVAIGA
PLD-WP_048588395.1 MREKVVFLSIIMAIMLPVGNAAPV S HNPASTANRPVYIAIAHRVLTQGVDDAVAIGA
*****

61.....120
PLDr-2J-L      NALEIDFTAWGRGWWADHDGIPTSAGATAEEIFKHIADKRKQGANITFTWLDIKNPDYCR
PLD-MEX1_2_9_25_29 NALEIDFTAWGRGWWADHDGIPTSAGATAEEIFKHIADKRKQGANITFTWLDIKNPDYCR
PLD-WP_013240889.1 NALEIDFTAWGRGWWADHDGIPTSAGATAEEIFKHIADKRKQGANITFTWLDIKNPDYCR
PLD-WP_048588395.1 NALEIDFTAWGRGWWADHDGIPTSAGATAEEIFKHIADKRKQGANITFTWLDIKNPDYCR
*****

181.....198.....205.....240
PLDr-2J-L      VLNDFARSENKILTKQKIADYGYN INQFGNCYGTWNRTCDQLRKSSEARDQGKLGKTF
PLD-MEX1_2_9_25_29 VLNDFARSENKILTKQKIADYGYN INQFGNCYGTWNRTCDQLRKSSEARDQGKLGKTF
PLD-WP_013240889.1 VLNDFARSENKILTKQKIADYGYN INQFGNCYGTWNRTCDQLRKSSEARDQGKLGKTF
PLD-WP_048588395.1 VLNDFARSENKILTKQKVDYGYD INQFGNCYGTWNRTCDQLRKSSEARDQGKLGKTF
*****

241.....287.....300
PLDr-2J-L      GWTIATGQDARVNDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRHADTENSFKAIK RWVDKHSATHHLA
PLD-MEX1_2_9_25_29 GWTIATGQDARVNDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRHADTENSFKAIK RWVDKHSATHHLA
PLD-WP_013240889.1 GWTIATGQDARVNDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRHADTENSFKAIK RWVDKHSATHHLA
PLD-WP_048588395.1 GWTIATGQDARVNDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRHADTENSFKAIQ RWVDKHSATHHLA
*****

```



**Figura 17.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) de *C. pseudotuberculosis* (2J-L), en comparación con las secuencias de las proteínas de las cepas mexicanas MEX1 (CP017711.1), MEX2 (CP046644.1), MEX9 (CP014543.1), MEX25 (CP013697.1), MEX29 (CP016826.1) y secuencias tipo para ambas proteínas, mediante el empleo de ClustalW. (A) Alineamiento de las secuencias PLDr 2J-L, proteínas PLD de las cepas mexicanas, PLD-WP\_013240889.1 y PLD-WP\_048588395.1. La figura señala los residuos involucrados en el dominio conservado de PLDr 2J-L compuesto por: el sitio catalítico conformado por los residuos H (44-78), los residuos de unión a Mg<sup>2+</sup> E-D posición (64-66) y D posición (112), la hendidura del sitio activo que implica los residuos H (44) -E (64) -D (66) -H (78) -D (112) -K (114) -W (242) y el lazo catalítico que se muestra subrayado en la posición 76-83 / 86-90. (B) Alineamiento de la secuencia de CP40r 2J-L, proteínas CP40 de las cepas mexicanas, CP40-WP\_013242749.1, CP40-WP\_058831578.1 y CP40-WP\_014522771.1. El sitio activo conservado está compuesto por los residuos Y (66) -F (104) -D (185) -D (187) -E (189) -Q (260) -Y (262) -Y (332). El motivo de quitinasa en la proteína CP40r 2J-L se

indica subrayado en la secuencia (LDGLDVDME). La identificación de los residuos implicados en el dominio conservado y los sitios catalíticos se determinó mediante la búsqueda de Dominios conservados del NCBI. Todos los residuos que componen el sitio conservado de las enzimas se indican en negrita. Las similitudes en los residuos de aminoácidos se indican con un asterisco y los espacios representan cambios en la secuencia, encerrados en cuadros rojos.

El dominio de tipo Glicerofosfodiéster fosfodiesterasa (GDPD) se identificó en la secuencia de PLDr 2J-L. El sitio catalítico de la enzima para la hidrólisis de la esfingomielina, a través del mecanismo ácido-base dependiente de  $Mg^{2+}$ , involucra dos residuos de histidinas los cuales fueron identificados en PLDr 2J-L, en la posición (44-78). También se establecieron los residuos que participan en la unión del  $Mg^{2+}$ , aminoácidos E-D en la posición (64-66) y D en la posición (112). La composición del sitio activo está completamente conservada en las isoformas de las esfingomielinasa D, conformada en PLDr 2J-L por los residuos H (44) - E (64) - D (66) - H (78) - D (112) - W (242). Además, se identificó el lazo (loop) catalítico constituido por las secuencias conservadas en la posición 77-DHDGIPTS-84/86-GATAE-90 (Figura 17A). La proteína CP40r 2J-L presentó el sitio activo del dominio conservado de la familia de proteínas GH18\_EndoS-like compuesto por los residuos Y (66) -F (104) - D (185) - D (187) - E (189) - Q (260) - Y (262) - Y (332). También se identificó en la proteína CP40r 2J-L el motivo de quitinasa LDGLDVDME (Figura 17B).

### VII.7 Características físico-químicas de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L

Los parámetros físico-químicos de ambas proteínas se determinaron utilizando ProtParam (Tabla 5). La composición de aminoácidos, el número de residuos y su porcentaje de representación en las proteínas se muestran en la Tabla 5. El peso molecular de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se estimó en 33.884 kDa y 42.957 kDa, el número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu) 32 y 55, así como el número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys) 37 y 53. Se estimó el punto isoelectrico (IP) para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L con valores de 8.91 y 6.48, los cuales corresponden al valor de pH donde la carga total de la molécula de proteína es 0. También se estimó que la vida media de las proteínas corresponde a 30 h en células de mamíferos, 20 h en levadura y 10 h en *E. coli*. El índice de estabilidad se estimó en 28.64 para PLDr 2J-L y 21.20 para CP40r 2J-L, lo que indica que ambas proteínas son estables. El índice alifático fue de 81.79 y 68.94 para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, mientras que el valor de (GRAVY) estuvo entre -0.28 / -0.692 respectivamente. El alto índice alifático indica la

estabilidad de las proteínas a cambios de temperaturas, mientras que los valores GRAVY negativos muestran que las proteínas son hidrofílicas y presentan fuertes interacciones con la molécula de agua.

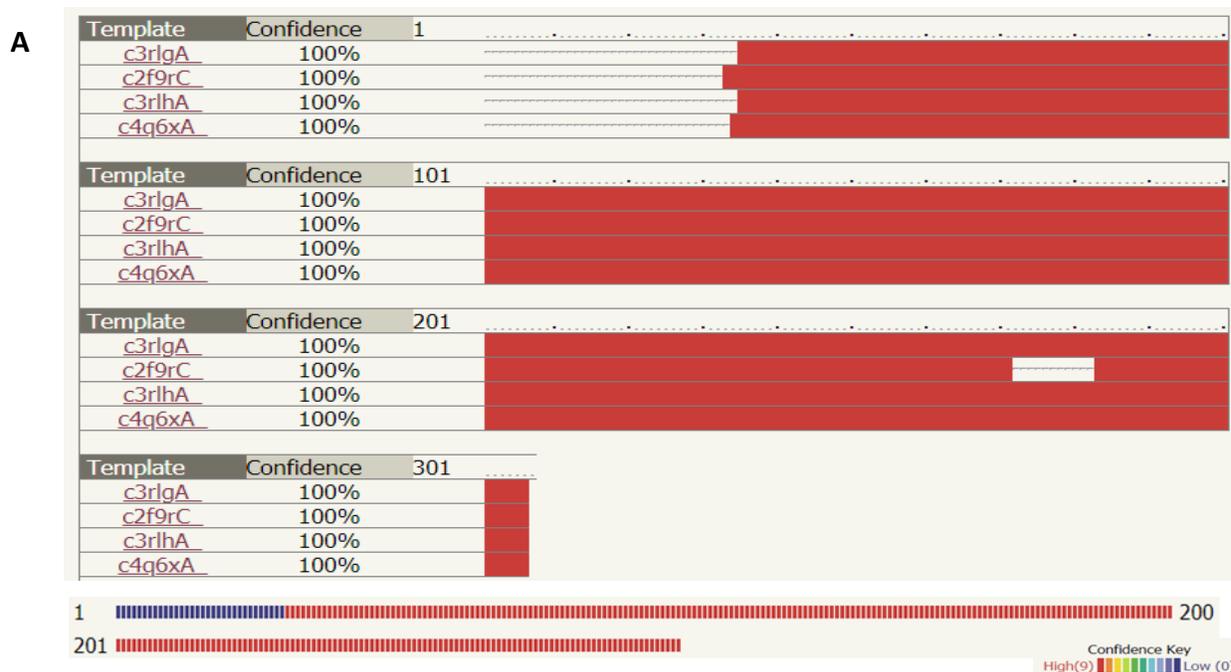
**Tabla 5.** Composición y características físico-químicas de las proteínas PLDr 2J-Ly CP40r 2J-L.

Proteínas	PLDr 2J-L		CP40r 2J-L	
	No. Residuos	%	No. Residuos	%
Ala (A)	40	13.03%	27	7.12%
Arg (R)	18	5.9%	19	5.00%
Asn (N)	17	5.50%	16	4.22%
Asp (D)	23	7.50%	31	8.20%
Cys (C)	4	1.30%	2	0.50%
Glu (E)	9	2.90%	24	6.30%
Gln (Q)	8	2.60%	17	4.50%
Gly (G)	25	8.10%	26	6.90%
His (H)	9	2.90%	8	2.10%
Ile (I)	20	6.50%	11	2.90%
Leu (L)	20	6.50%	29	7.70%
Lys (K)	19	6.20%	34	9.00%
Met (M)	3	1.00%	7	1.80%
Phe (F)	12	3.90%	16	4.20%
Pro (P)	10	3.30%	14	3.70%
Ser (S)	11	3.60%	20	5.30%
Thr (T)	21	6.80%	29	7.70%
Trp (W)	9	2.90%	6	1.60%
Tyr (Y)	10	3.30%	16	4.20%
Val (V)	19	6.20%	27	7.10%
Formula	C1517H2346N432O439S7		C1908H2967N525O588S9	
Número de aa	307		379	
Peso Molecular	33.884 kDa		42.957	
pI teórico	8.91		6.48	
Coefficiente de extinción	64650 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>		56965 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	
Vida media	30 h Células de mamíferos		30 hours Células de mamíferos	
	20 h Levaduras		20 h Levaduras	
	10 h <i>E. coli</i>		10 h <i>E. coli</i>	

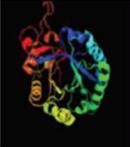
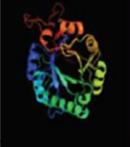
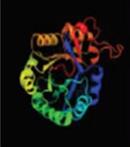
### VII.8 Modelado de la estructura 3D de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L

La predicción de la estructura de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se realizó utilizando el portal web Phyre2, que produce modelos potenciales en 3D de las proteínas, basados en el alineamiento de secuencias y estructuras de proteínas conocidas.

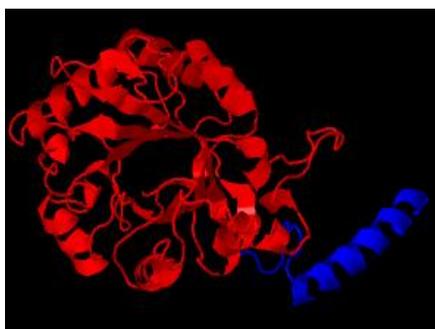
Las secuencias de aminoácidos de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se emplearon para el escaneo de una biblioteca actualizada de secuencias de proteínas no redundantes, utilizando PSI-BLAST, con la detección de 1000 homólogos para cada proteína. La estructura de PLDr 2J-L se infirió en función de la comparación de la secuencia de aminoácidos de cuatro plantillas, que cubrieron el segmento intermedio y el extremo C-terminal con un 100% de confianza, mientras que para el extremo N-terminal no se encontraron coincidencias confiables. El gráfico con un código de color representa en qué lugar de la secuencia se realizó la coincidencia con alta confianza (Figura 18A). La información de las plantillas se proporciona a continuación (Figura 18B), donde cada fila indica la plantilla utilizada para el modelo y su representación en la secuencia de la proteína. El porcentaje más alto de identidad para PLDr 2J-L fue proporcionado por la plantilla c2fr9c, perteneciente a la estructura cristalina del estado inactivo de la enzima Smase I, cadena: C de la Esfingomielinasa d1 a2 del veneno de araña *Loxosceles laeta*. El porcentaje de identidad (i.d) entre PLDr 2J-L y la plantilla fue de un 21%, con un 89% de cobertura en el alineamiento de ambas secuencias, incluyendo los residuos desde la posición 33 a 309 (Figura 18B).



**B**

No. Template	Alignment coverage	3D Model	Confidence	% i.d	Template information
1	 Alignment <i>c3rlgA_</i>		100.0	20	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> sphingomyelin phosphodiesterase d llicitox-alpha1a; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of loxosceles intermedia phospholipase d isoform 12 h12a mutant
2	 Alignment <i>c4q6xA_</i>		100.0	20	<b>PDB header:</b> lyase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> phospholipase d stictox-beta1c1; <b>PDBTitle:</b> structure of phospholipase d beta1b1 from sicarius terrosus venom at 2.14 a resolution
3	 Alignment <i>c2f9rC_</i>		100.0	21	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> C; <b>PDB Molecule:</b> sphingomyelinase d 1; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of the inactive state of the smase i, a2 sphingomyelinase d from loxosceles laeta venom
4	 Alignment <i>c3rlhA_</i>		100.0	20	<b>PDB header:</b> hydrolase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> sphingomyelin phosphodiesterase d llicitox-alpha1a; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of a class ii phospholipase d from loxosceles2 intermedia venom

**C**

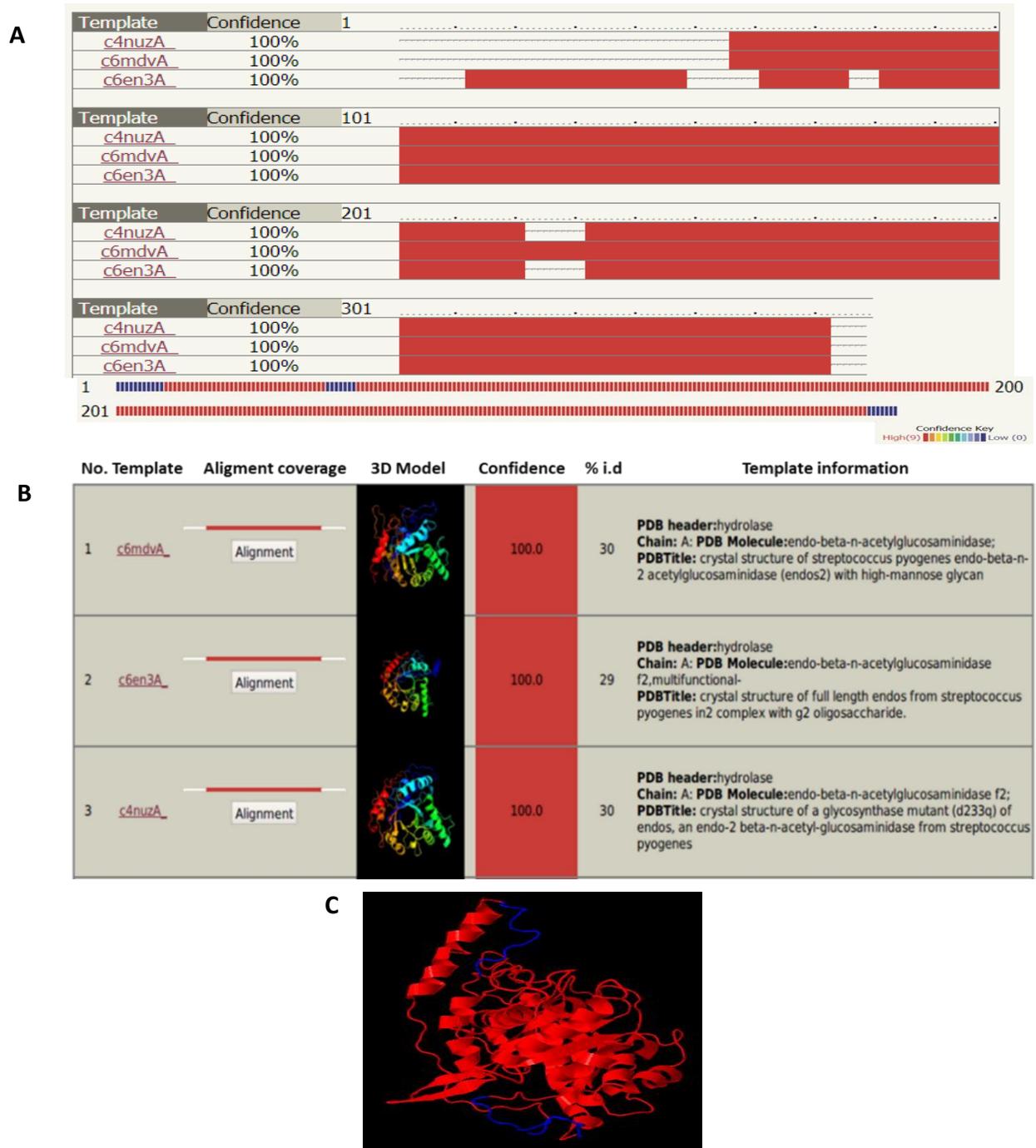


**Figura 18.** Predicción de la estructura 3D de PLDr 2J-L. (A) Modelado de la estructura de PLDr 2J-L basado en la comparación de la secuencia de aminoácidos con cuatro plantillas de proteínas con estructura conocida. La secuencia cubierta por cada plantilla está representada por un código de colores, que indica la confianza de la coincidencia con esa plantilla en general. Las regiones modeladas por el enfoque *ab initio* de Phyre2 están coloreadas en azul, lo que indica una confianza mínima. Las coincidencias seguras se han indicado con color rojo. (B) Información detallada de las plantillas utilizadas en el modelaje y construcción de la estructura de PLDr 2J-L. (C) Modelado **X**:43.199 **Y**:50.846 **Z**:83.286 y estructura propuesta para la proteína PLDr 2J-L, mostrada como una superficie coloreada de rojo a azul según la confianza de la predicción de Phyre2.

La estructura completa de PLDr 2J-L fue modelada en base a 276 residuos (90%) y 32 residuos fueron modelados sin plantilla (*ab initio*), para una precisión superior al 90% (Figura 18C).

La estructura de la proteína CP40r 2J-L se modeló utilizando los valores de confianza, el porcentaje de identidad y la alineación de secuencia de tres plantillas de proteínas con estructura conocida. Estas

plantillas cubrieron el extremo N- terminal de manera parcial y el segmento intermedio de la proteína, así como el extremo C-terminal con un 100% de confianza (Figura 19A).



**Figura 19.** Predicción de la estructura 3D de CP40r 2J-L. (A) Modelado de la estructura de CP40r 2J-L basado en la comparación con tres plantillas de proteínas de estructura conocida. La secuencia cubierta por cada plantilla está representada por un código de colores, que indica la confianza de la

coincidencia con esa plantilla en general. Las regiones modeladas por el enfoque *ab initio* de Phyre2 están coloreadas en azul, lo que indica una confianza mínima. Las coincidencias seguras se han indicado con color rojo. **(B)** Información detallada de las plantillas utilizadas en el modelaje y construcción de la estructura de CP40r 2J-L. **(C)** Modelado X:70.969 Y:60.535 Z:54.438 y estructura propuesta para la proteína CP40r 2J-L, mostrada como una superficie coloreada de rojo a azul según la confianza de la predicción de Phyre2

La plantilla c6en3A correspondiente a la estructura cristalina de la cadena de longitud completa: A de Endo-beta-n-acetilglucosaminidasa f2 de *Streptococcus pyogenes*, representó el enfoque máximo para CP40r 2J-L, con un 100% de confianza, 30% de i.d y 94% de cobertura de alineación (residuos 12 a 372) (Figura 19B). Se predijo la estructura completa de CP40r 2J-L en base a 352 residuos (93%) y 25 residuos inferidos sin plantilla (*ab initio*), para una precisión mayor al 90% (Figura 19C).

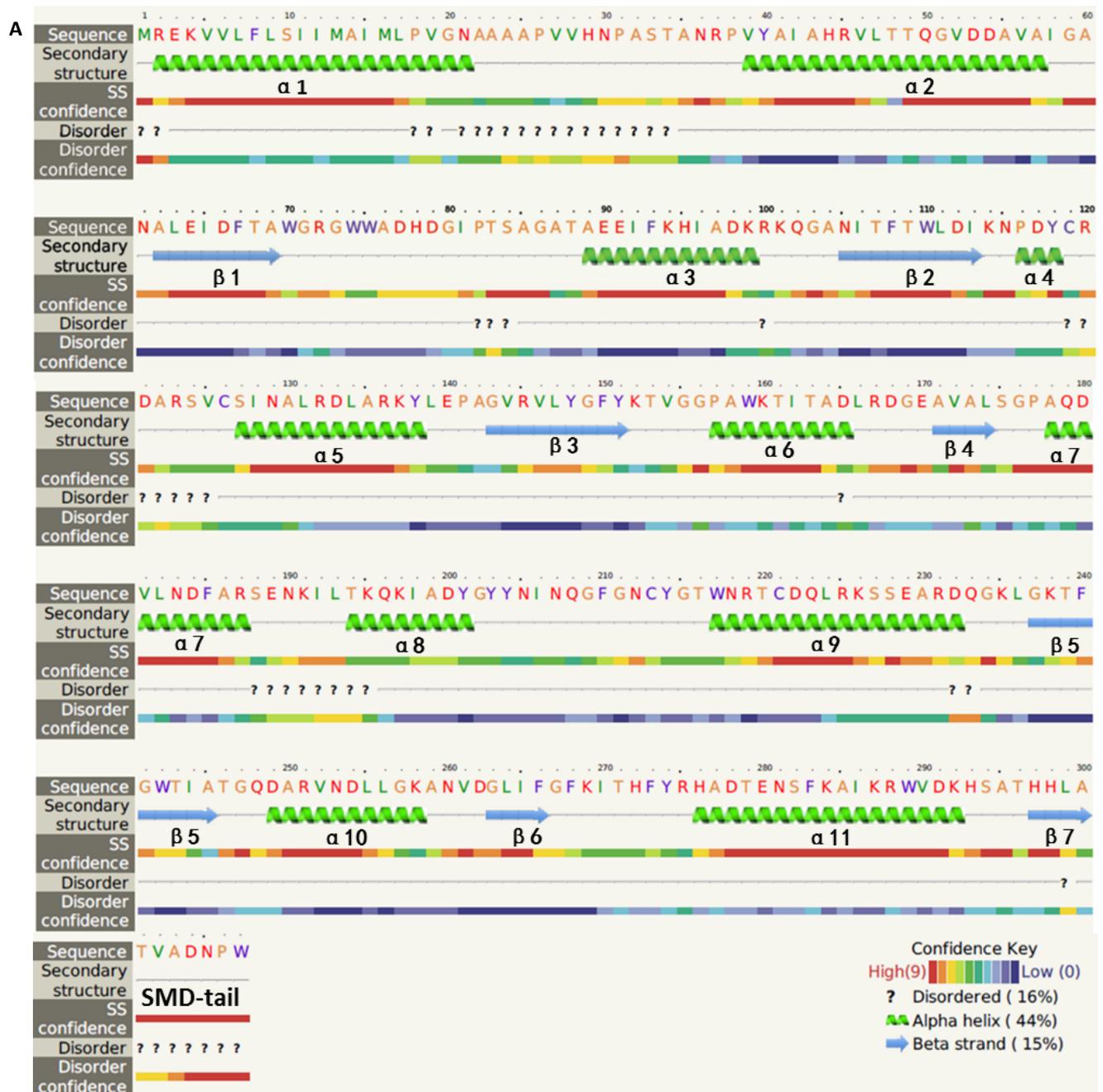
El programa generó las estructuras de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L modeladas en 3D, en formato PDB, los cuales fueron utilizados en la visualización de las estructuras y posterior análisis de los epítomos conformacionales de células B.

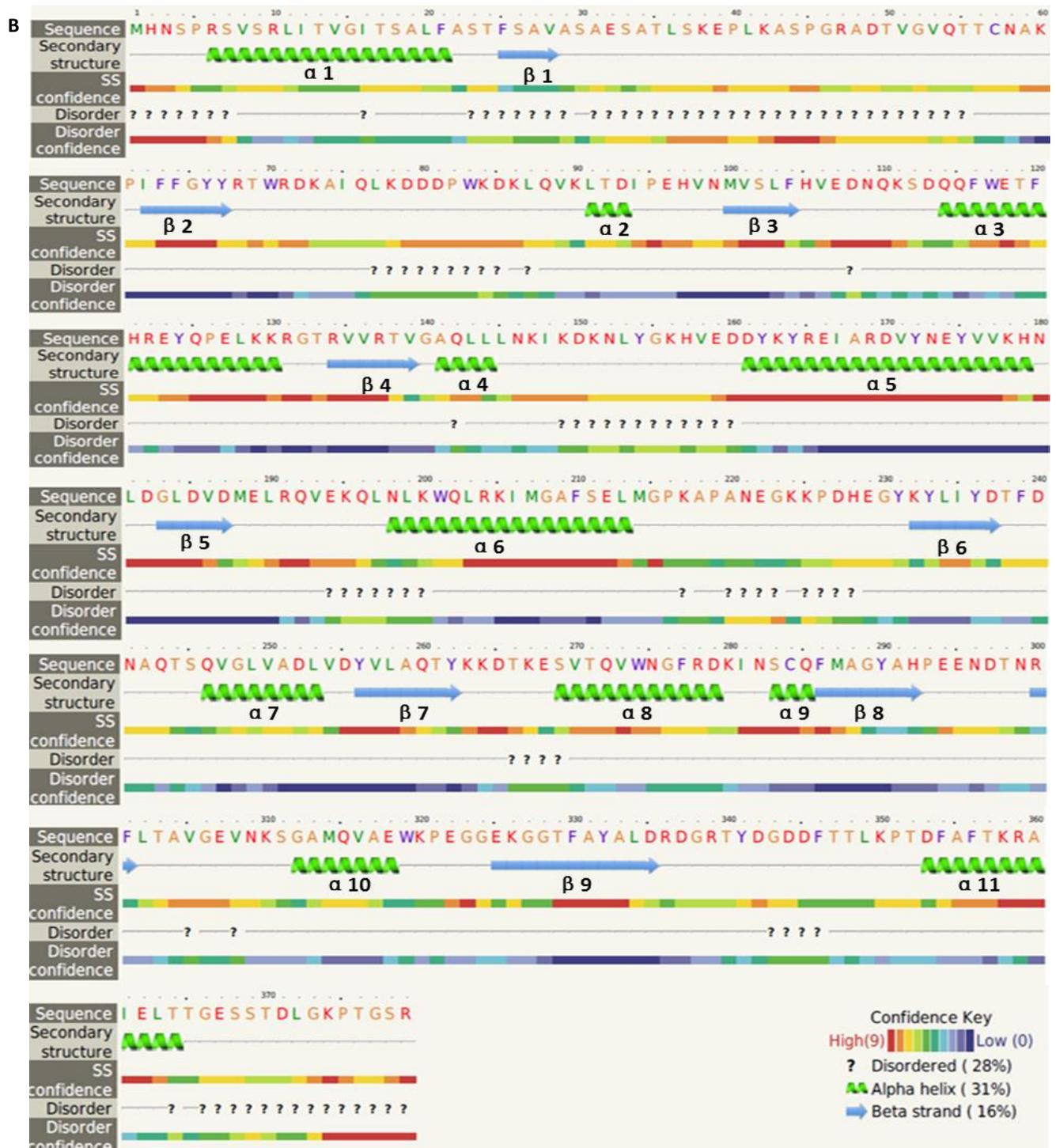
## VII. 9 Análisis de la estructura secundaria de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L

La estructura secundaria de las proteínas se predijo basado en el análisis de las matrices generadas por PSI-BLAST, mediante la comparación de 1000 secuencias homologas para cada proteína, lo que corresponde con una precisión de un 78-80%. Las estructuras de ambas proteínas se predijeron con menos del 30% de desorden, lo que sugiere que las secuencias (en su mayoría) se encuentran modeladas en su conformación correcta. El programa no es capaz de predecir vueltas  $\beta$  ni curvas  $\beta$ , las cuales son identificadas como regiones de enrollado. Tampoco predice las  $\pi$ -hélices ni 310-hélices, siendo estimadas como hélices- $\alpha$ . Las coincidencias en las secuencias se clasifican según una puntuación de alineación (dato no mostrado por el programa) que se basa en el número de residuos alineados y la calidad de la alineación. Esto a su vez se basa en la similitud de las distribuciones de probabilidad de residuos para cada posición, la similitud de la estructura secundaria y la presencia o ausencia de inserciones y deleciones. La estructura secundaria de PLDr 2J-L presentó un total de 44% de hélices- $\alpha$ , 15% de hojas  $\beta$  y 16% de regiones desordenadas (Figura 20A).

La estructura del extremo N-terminal de PLDr 2J-L se predijo mediante *ab initio* como una hélice- $\alpha$ , con alta confianza, representada por el color rojo en la línea de confianza SS y el extremo C-terminal presentó una combinación de hoja  $\beta$  y estructura de enrollado con alta confianza, aunque la secuencia final fue representada como una región de desorden. La estructura secundaria se modeló con 11

regiones hélices- $\alpha$  y 7 hojas  $\beta$ , la mayoría determinadas con elevada confianza, excepto por la hélice- $\alpha 7$  y las hojas  $\beta 3$  y  $\beta 5$ . El barril TIM ( $\beta\alpha$ ) y la cola-SMD de la región C- terminal, son estructuras características de las enzimas Esfingomielinasas, y fueron identificadas en la estructura secundaria de PLDr 2J-L (Figura 20A).





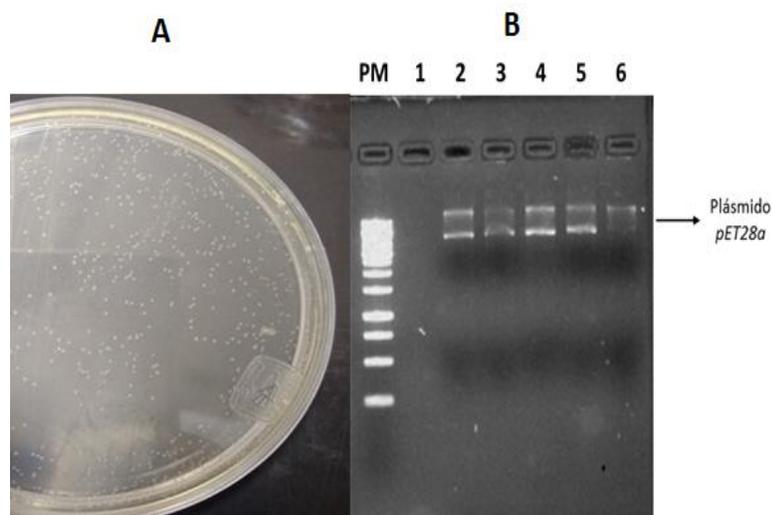
**Figura 20.** Predicción de la estructura secundaria de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B). La secuencia se representa con los residuos de aminoácidos coloreados: (A, S, T, G, P: pequeños / polar) son amarillos, (M, I, L, V: hidrofóbicos) son verdes, (K, R, E, N, D, H, Q: cargado) son rojos y (W, Y, F,

C: aromático + cisteína) son morados. La predicción de la estructura secundaria comprende las topologías de: hélice- $\alpha$  (verde), hoja  $\beta$  (flechas azules) y bobina o enrollado (líneas grises). Los signos de interrogación indican regiones desordenadas. La confianza de cada predicción se indica con color rojo para una confianza alta y azul para una confianza baja. (A) Estructura de barril TIM ( $\alpha\beta$ ) y cola-SMD de la proteína PLDr 2J-L. (B) Estructura de barril TIM ( $\alpha\beta$ ) de endoglicosidasas, representado en la secuencia de la proteína CP40r 2J-L.

La estructura secundaria de CP40r 2J-L presentó 31% de hélice- $\alpha$ , 16% de hojas  $\beta$  y 28% de regiones desordenadas. Las estructuras hélice- $\alpha$ 1 y la hoja  $\beta$ 1 del extremo N-terminal se predijeron con una confianza baja con una región de desorden. El extremo C-terminal presentó una estructura de espiral predicha como una región desordenada. La estructura secundaria se modeló con 11 regiones hélices- $\alpha$  y 9 hojas  $\beta$ , la mayoría determinadas con elevada confianza, excepto por la hélice- $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4 y las hojas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 6. La estructura secundaria de barril TIM ( $\beta\alpha$ ) característico en las endoglicosidasas se detectó en la estructura de CP40r 2J-L, con la topología típica de la familia de las proteínas GH18 (Figura 20B).

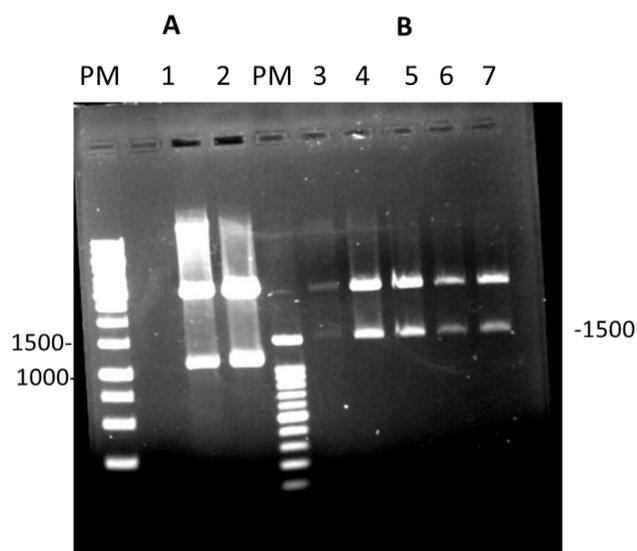
#### VII. 10 Obtención de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos recombinantes pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*

La producción del plásmido de expresión pET28a se realizó en las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas por choque térmico y permeabilización con CaCl<sub>2</sub> (Figura 21A). Los plásmidos se purificaron y se obtuvieron a una concentración de 30ng/mL (Figura 21B).



**Figura 21.** (A) Cultivo de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pET28a, en medio de cultivo agar LBK. (B) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v). Purificación del plásmido de expresión pET28a.

Los genes *pld* y *cp40* se extrajeron de los plásmidos recombinantes pGEM-T Easy-*pld* y pGEM-T Easy-*cp40* mediante digestión doble con enzimas de restricción (*EcoRI/XhoI*). La reacción de ligazón entre los genes y el plásmido de expresión pET28a digerido con las mismas enzimas, se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). Los plásmidos recombinantes pET28a-*pld* y pET28a-*cp40* se identificaron mediante el análisis con enzimas de restricción (*EcoRI/XhoI*), comprobándose la inserción de los genes de interés en los plásmidos de expresión (Figura 22).

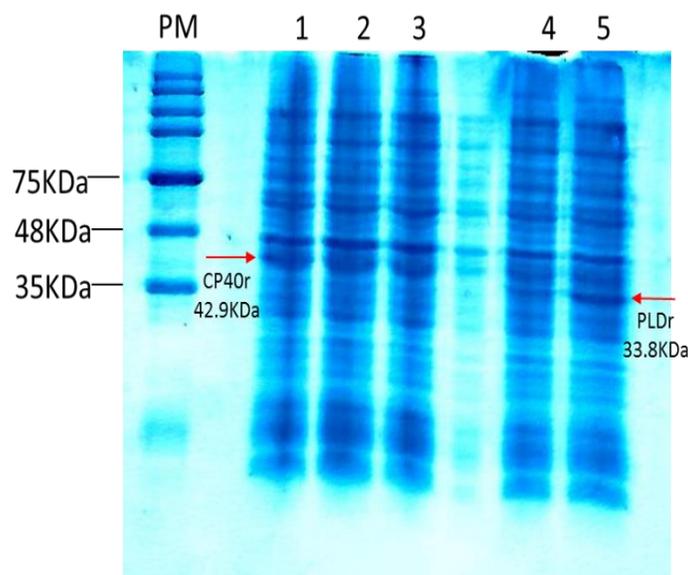


**Figura 22.** Identificación de los plásmidos recombinantes pET28a-*pld* y pET28a-*cp40* mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v). **PM-A:** Marcador de peso molecular de 1Kb O'GeneRuler (Fermentas, USA). **Líneas 1-2:** Plásmidos recombinantes con el gen *pld* de aproximadamente 1074pb. **PM-B:** Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega, EE.UU). **Líneas 3-7:** Plásmidos recombinantes con el gen *cp40* de aproximadamente 1479pb.

### VII.11 Expresión de las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

La expresión de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se indujo en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*, con la adición de IPTG 1mM en 300mL de medio de cultivo LBK, en agitación a 220rpm. Transcurridas 5 horas de inducción se comprobó la expresión e identidad de las proteínas recombinante por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. El análisis de la expresión de las proteínas mostró dos bandas reforzadas, con patrones de

peso molecular según la talla esperada de aproximadamente 33.8KDa para PLDr 2J-L y 42.9KDa para CP40r 2J-L (Figura 23).



**Figura 23.** Expresión de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*. El cultivo se realizó en 300 mL de medio LBK, con IPTG 1mM como inductor de la expresión de las proteínas. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, para la resolución de las proteínas con tinción de azul de Coomassie. **PM:** Bluestain 5-245KDa (Goldbio, USA). **Línea 1-3:** perfil de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET28a-*cp40*. **Línea 4-5:** perfil de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET28a-*pld*.

## VII.12 Caracterización *in silico* de las propiedades inmunogénicas de las proteínas recombinantes PLD y CP40 del aislado 2J-L:

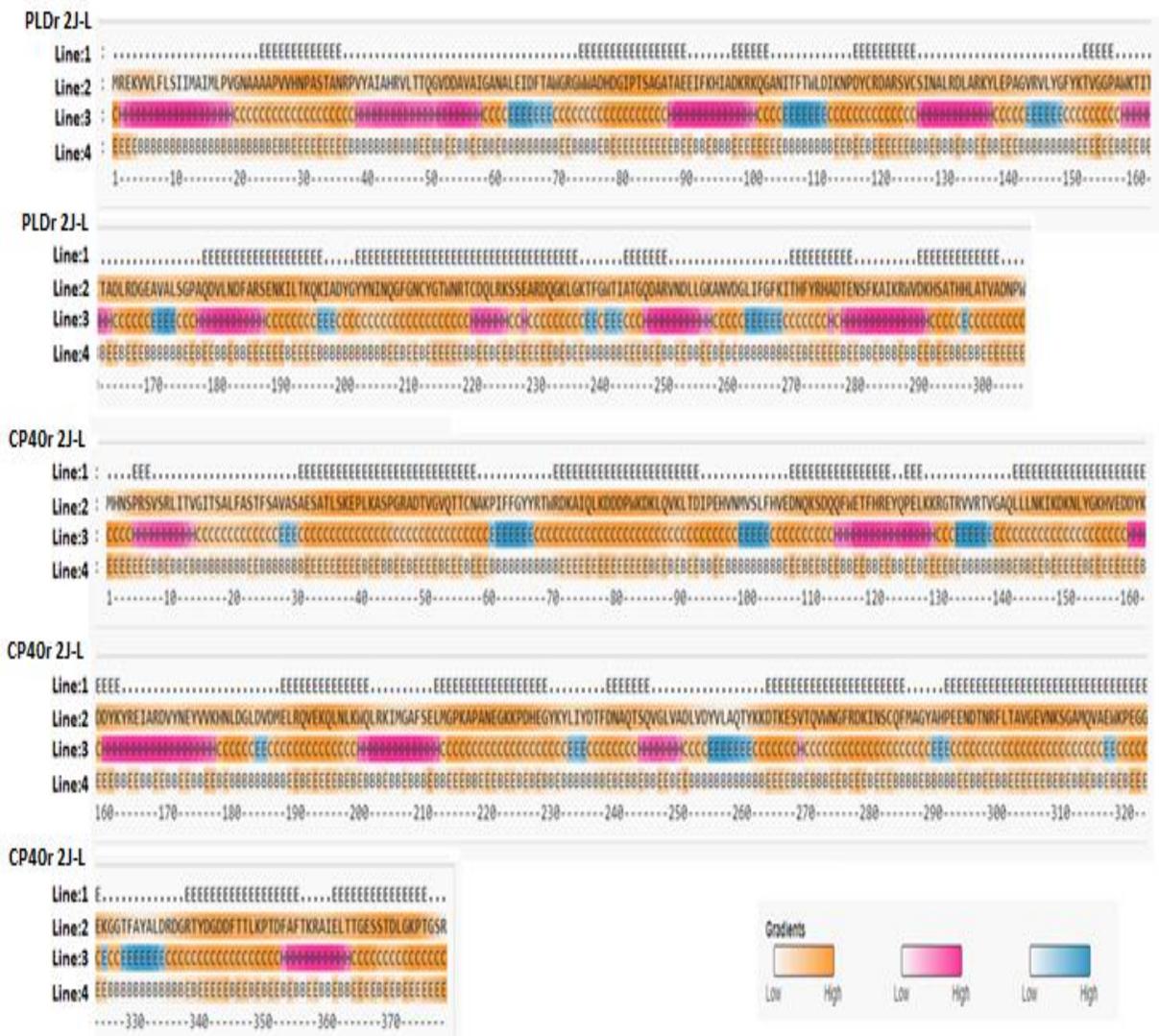
### VII.12.1 Predicción de Epítomos de células B

La capacidad de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de los linfocitos B (Tabla 6), así como la predicción de la estructura secundaria de los residuos de aminoácidos que componen los epítomos lineales de células B (Figura 23), se realizó mediante el empleo de Bepipred 2.0. Los péptidos con puntuaciones por encima del valor de corte: 0.5, fueron estimados como posibles epítomos de células B (Tabla 6).

**Tabla. 6** Predicción de Epítomos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L mediante Bepipred 2.0.

Proteína	No.	Epítomos	aa	Tamaño	Estructura	Score min-max
PLDr 2J-L	1	AAPVVHNPASTAN	24-36	13	Enrollado(Enro)	0.511-0.639
	2	WWADHDGIPTSAGATAE	74-90	17	Enrollado	0.510-0.656
	3	DKRKQG	98-103	6	Hélice (H)	0.519-0.538
	4	DYCRDARSVC	117-126	10	Enrollado	0.515-0.552
	5	TVGGP	153-157	5	Enrollado	0.509-0.527
	6	QDVLNDFARSENKILTKQK	179-197	19	H/ Enro	0.502-0.582
	7	YYNINQGFNGCYGTWNRTCDQLRKSSEARDQGKLG	203-237	34	Enro/ H/Enro	0.505- 0.622
	8	ATGQDAR	245-251	7	Enro/ H	0.501-0.549
	9	THFYRHADTE	271-280	10	Enro/ H	0.507-0.591
	10	DKHSATHHLATVA	291-303	13	H/Enro	0.518-0.551
CP40r 2J-L	1	PRSVS	5-9	5	Hélice	0.498-0.526
	2	AESATLSKEPLKASPGRADTVGVQTTCN	31-58	28	Enrollado	0.508-0.670
	3	RDKAIQLKDDDPWKDKLQVKLTD	71-93	23	Enrollado	0.508-0.644
	4	DNQKSDQQFWETFHRE	108-123	16	Enro/H	0.532-0.594
	5	LLNLIKDKNLYGKHVEDDYK	143-163	21	Enro/H	0.508-0.634
	6	ELRQVEKQLNLKWQ	189-202	14	Enro/H	0.501-0.644
	7	LMGPKAPANEGKPDHEG	213-230	18	Enrollado	0.506-0.638
	8	DNAQTSQ	240-246	7	Enro/H	0.504-0.552
	9	DTKESVTQVWNGFRDKINSCQF	265-286	22	Enrollado	0.510-0.589
	10	PEENDTNRFLTAVGEVNKSGAMQVAEWKPEGGE	293-325	33	Enrollado	0.502-0.640
	11	RTYDGGDDFTLLKPTDFAF	339-356	18	Enro/H	0.501-0.620
	12	ELTTGESSTDLGKPT	362-376	15	H/ Enro	0.515-0.639

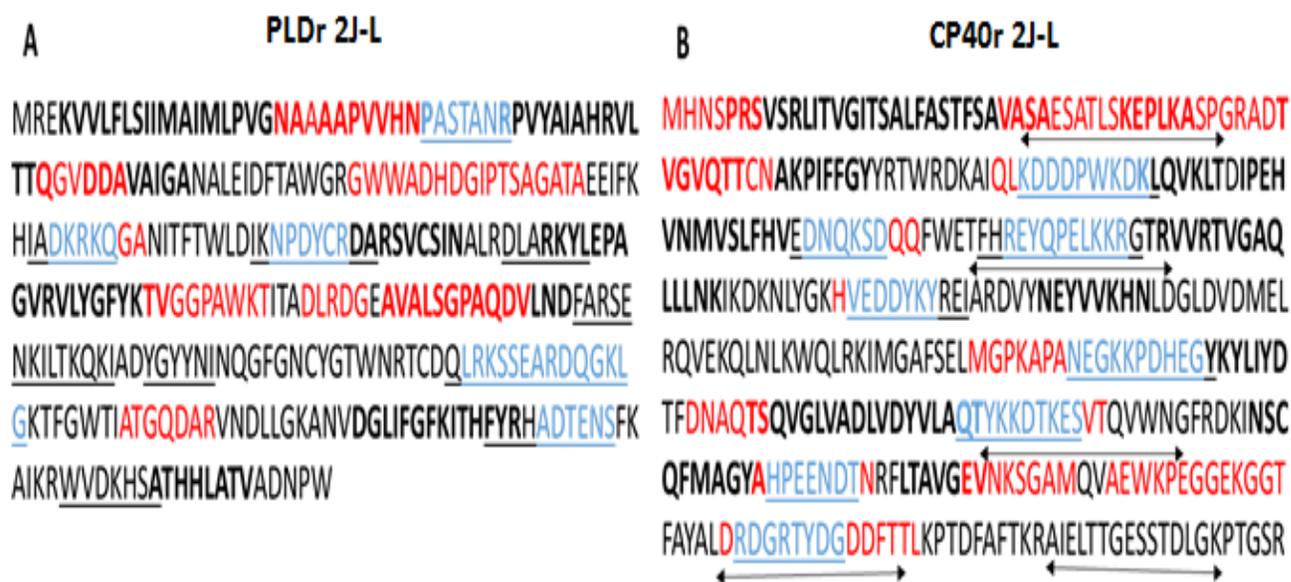
Los epítomos de células B de PLDr 2J-L se conservaron en todas las cepas mexicanas analizadas. Los epítomos número 1 y 7 incluyeron secuencias que son diferentes para PLD-WP\_048588395.1. El epítomo 2 de PLDr 2J-L está conformado por la secuencia del lazo catalítico, siendo una región conservada. Todos los epítomos de células B de CP40r 2J-L se conservaron en las cepas mexicanas, incluido el epítomo número 8, cuya secuencia está cerca de la posición 247, correspondiente a la variación de aminoácidos (V-L) que presenta la proteína CP40 del aislado 2J-L con respecto a MEX25 (Figura 24).



**Figura 24.** Epítomos lineales de células B y estructura secundaria de los epítomos de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) predichos por Bepipred 2.0. **Línea 1:** Posibles epítomos con valor de puntuación (E)> 0.5. **Línea 2:** Secuencia de proteínas mostrada en gradiente naranja que representa la confianza de la predicción. **Línea 3:** Estructura secundaria predicha por el programa NetSurfP, incluido en el servidor Bepipred 2.0, representada por una escala de color: Hélice (H: gradiente de probabilidad rosa), Hoja beta (E: gradiente de probabilidad azul) y Enrollado (C: gradiente de probabilidad naranja). **Línea 4:** Accesibilidad a la superficie de los residuos de aminoácidos representados por un degradado naranja y las letras B (aa: enterrados) y E (aa: expuestos).

La predicción y análisis de los epítomos de células B también se realizó mediante el empleo de la página web IEDB. Los epítomos de células B se determinaron mediante el análisis de diferentes propiedades

inmunogénicas como: unión de anticuerpos, exposición a la superficie y antigenicidad. Se analizó una gama de péptidos compuestos de 5 a 35 residuos de aminoácidos y, teniendo en cuenta el valor de corte establecidos para cada criterio, se eligieron las secuencias que conforman los epítomos de células B para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. Los péptidos se mapearon en las secuencias de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, indicando qué epítomos de células B tienen la mayor probabilidad de interactuar con anticuerpos (Ab), de encontrarse en la superficie y ser más antigénicos. Además, se identificaron las secuencias que comparten la propiedad de unión de Ab y exposición superficial. También se identificaron las secuencias de CP40r 2J-L que interactúan con el receptor Toll-Like 2 (Figura 25).



**Figura 25.** Epítomos de células B para PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) de *C. pseudotuberculosis* aislado 2J-L, mediante el empleo de IEDB. Los epítomos con mayor probabilidad de interactuar con los anticuerpos están coloreados en rojo, los epítomos de superficie están indicados por una secuencia subrayada, los epítomos antigénicos se indican en letras en negrita y la secuencia que comparte la capacidad de unirse a los anticuerpos y está más expuesta a la superficie se muestra en azul. Las flechas indican secuencias en CP40 que interactúan con el receptor Toll Like 2.

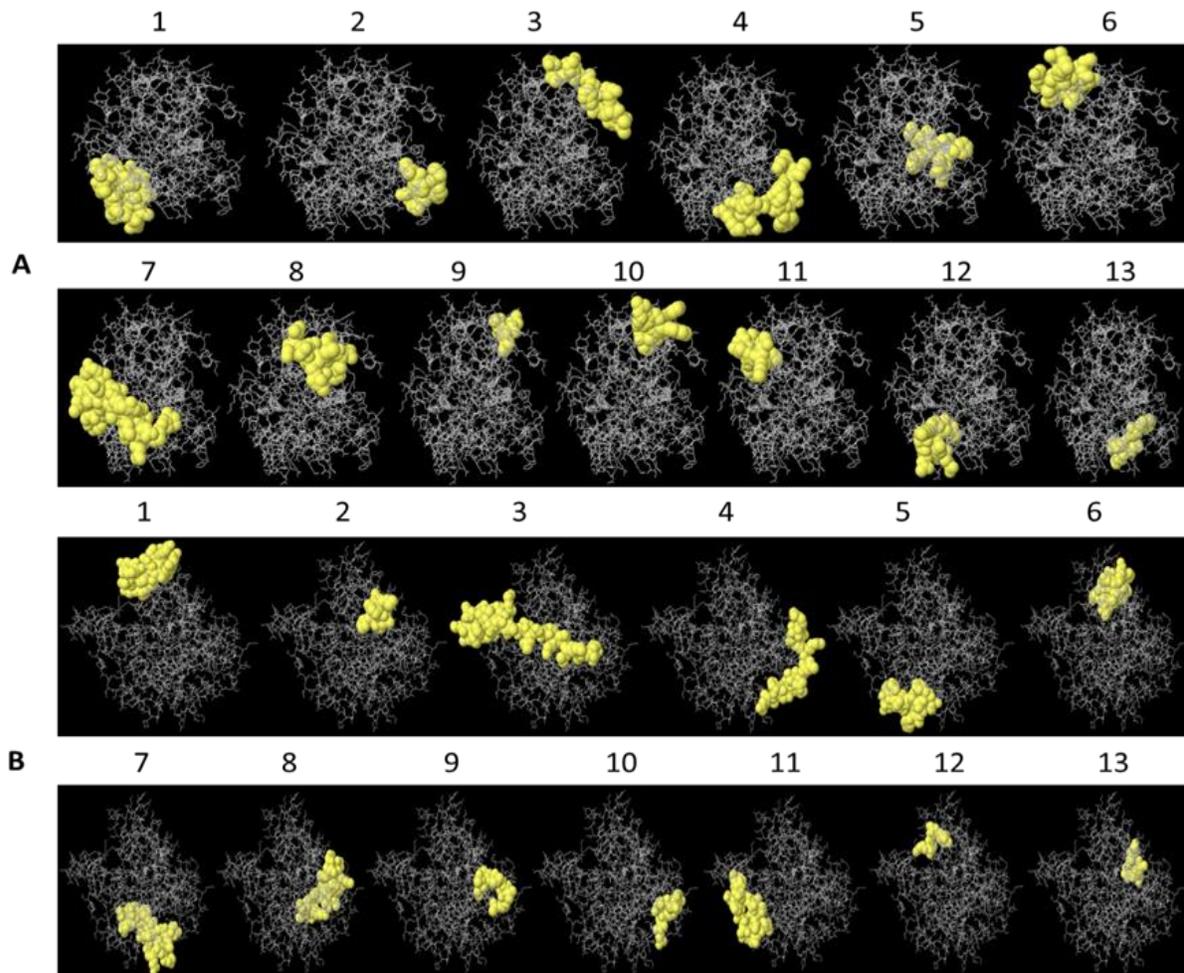
Los epítomos lineales y discontinuos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, fueron estimados mediante el programa ElliPro, teniendo en cuenta el formato PDB de la estructura tridimensional de las proteínas (Tabla 7 y Tabla 8).

**Tabla 7.** Epítomos lineales de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L determinados por ElliPro.

Proteínas	No.	aa	Epítomos	Tamaño	Score
PLDr 2J-L	1	9-33	MREKVVFLSIIIMAILPVGNAAPVVHNPAS	33	0.856
	2	244-250	IATGQDA	7	0.721
	3	78-91	HDGIPTSAGATAEE	14	0.698
	4	211-226	GNCYGTWNRTCDQLRK	16	0.689
	5	275-285	RHADTENSFKA	11	0.684
	6	175-201	SGPAQDVLNDFARSENKILTQKIADY	27	0.656
	7	132-142	RDLARKYLEPA	11	0.655
	8	116-125	PDYCRDARSV	10	0.642
	9	47-50	LTTQ	4	0.613
	10	69-76	AWGRGWWA	8	0.612
	11	160-168	KTITADLRD	9	0.583
	12	229-236	EARDQGKL	8	0.550
	13	289-292	WVDK	4	0.535
CP40r 2J-L	1	151-166	KNLYGKHVEDDYKYRE	16	0.807
	2	220-229	ANEGKKPDHE	10	0.797
	3	9-46	MHNSPRSVSRLITVGITSALFASTFSAVASAESATLSKEPLKASPG	46	0.749
	4	362-379	ELTTGESSTDLGKPTGSR	18	0.719
	5	337-355	DGRTYDGDDFTTLKPTDFA	19	0.707
	6	193-205	VEKQLNLKWQLRK	13	0.702
	7	294-315	EENDTNRFLTAUGEVNKSGAMQ	22	0.660
	8	262-281	YKKDTKESVTQVWNGFRDKI	20	0.638
	9	48-56	ADTVGVQTT	9	0.613
	10	318-326	EWKPEGGEK	9	0.604
	11	72-89	DKAIQLKDDDPWKDKLQV	18	0.588
	12	145-149	LNKIK	5	0.544
	13	240-245	DNAQTS	6	0.531

Se identificaron un total de 13 epítomos lineales para cada proteína, donde las puntuaciones superiores al valor de corte fueron tomadas en cuenta para la selección de los péptidos. Los epítomos fueron identificados con un tamaño mínimo de 4 y 5 residuos y un tamaño máximo de 33 y 46 para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L respectivamente. Los epítomos con mayor score presentaron 0.856 en PLDr 2J-L y 0.807 en CP40r 2J-L.

La representación tridimensional de los epítomos lineales de células B para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, se realizó mediante el empleo del programa para visualización de estructuras JMol (Figura 26).



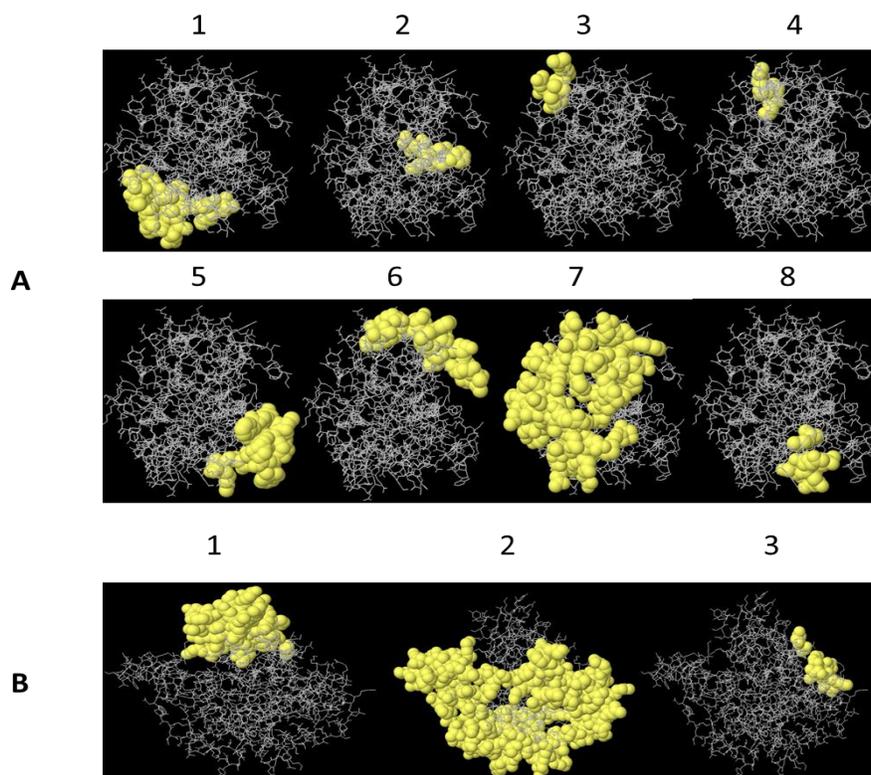
**Figura 26.** Visualización esquemática de los epítopos lineales de células B de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) estimados por ElliPro, basado en la estructura 3D de las proteínas. Los números representan los epítopos de la Tabla 7.

Los epítopos discontinuos o conformacionales de células B, compuestos por residuos de aminoácidos no contiguos en la secuencia primaria de la proteína, pero juntos por la estructura de plegamiento, se predijeron basados en el modelo 3D de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L. Los análisis de las estructuras permitieron identificar 8 epítopos para PLDr 2J-L y 3 para CP40r 2J-L (Tabla 8). Los epítopos 1 y 7 de la proteína PLDr 2J-L constituyen los de mayor tamaño con valores de score de 0.822 y 0.609. El epítopo 2 de CP40r 2J-L fue estimado con un valor de 0.683 abarcando 171 residuos de la proteína, lo que incluye gran parte de la molécula como posible epítopo conformacional de unión a células B.

**Tabla 8.** Epítomos discontinuos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L determinados por ElliPro.

Proteínas	No.	Epítomos	Tamaño	Score
PLDr 2J-L	1	_:M1, _:K4, _:V5, _:V6, _:L7, _:F8, _:L9, _:S10, _:I11, _:I12, _:M13, _:A14, _:I15, _:M16, _:L17, _:P18, _:V19, _:G20, _:N21, _:A22, _:A23, _:A24, _:A25, _:P26, _:V27, _:V28, _:H29, _:N30, _:P31, _:A32, _:S33, _:V290, _:D291, _:K292	34	0.822
	2	_:H276, _:A277, _:D278, _:T279, _:E280, _:N281, _:S282, _:F283	8	0.796
	3	_:A135, _:R136, _:L139, _:E140, _:P141, _:A142	6	0.726
	4	_:K101, _:Q102, _:G103	3	0.686
	5	_:F210, _:G211, _:N212, _:C213, _:Y214, _:G215, _:T216, _:W217, _:N218, _:R219, _:T243, _:I244, _:A245, _:T246, _:G247, _:Q248, _:D249, _:A250, _:D254, _:G257, _:K258	21	0.675
	6	_:L47, _:T48, _:T49, _:Q50, _:W75, _:A76, _:D77, _:D79, _:G80, _:I81, _:P82, _:T83, _:S84, _:A85, _:G86, _:A87, _:T88, _:E90, _:E91, _:D133, _:K137, _:Y138	22	0.662
	7	_:A69, _:W70, _:G71, _:R72, _:G73, _:W74, _:N115, _:P116, _:D117, _:Y118, _:R120, _:D121, _:A122, _:S124, _:V125, _:I128, _:N129, _:R132, _:K152, _:T153, _:V154, _:G155, _:G156, _:P157, _:K160, _:T161, _:I162, _:T163, _:A164, _:D165, _:L166, _:R167, _:D168, _:S175, _:G176, _:P177, _:A178, _:Q179, _:D180, _:L182, _:N183, _:D184, _:A186, _:R187, _:S188, _:E189, _:N190, _:K191, _:I192, _:L193, _:T194, _:K195, _:Q196, _:K197, _:I198, _:A199, _:D200, _:Y201, _:G202, _:Y203, _:E229, _:A230, _:D232, _:Q233, _:G234, _:K235, _:L236	67	0.609
	8	_:Q208, _:T220, _:C221, _:D222, _:Q223, _:R225, _:A259	7	0.529
CP40r 2J-L	1	_:L145, _:N146, _:K147, _:I148, _:K149, _:D150, _:K151, _:N152, _:L153, _:Y154, _:G155, _:K156, _:H157, _:V158, _:E159, _:D160, _:D161, _:Y162, _:K163, _:Y164, _:R165, _:E166, _:R169, _:V193, _:E194, _:K195, _:Q196, _:L197, _:N198, _:L199, _:K200, _:W201, _:Q202, _:R204, _:K205, _:S245	36	0.721
	2	_:M1, _:H2, _:N3, _:S4, _:P5, _:R6, _:S7, _:V8, _:S9, _:R10, _:L11, _:I12, _:T13, _:V14, _:G15, _:I16, _:T17, _:S18, _:A19, _:L20, _:F21, _:A22, _:S23, _:T24, _:F25, _:S26, _:A27, _:V28, _:A29, _:A31, _:E32, _:S33, _:A34, _:T35, _:L36, _:S37, _:K38, _:E39, _:P40, _:L41, _:K42, _:A43, _:S44, _:P45, _:G46, _:R47, _:A48, _:D49, _:T50, _:V51, _:G52, _:V53, _:Q54, _:T55, _:T56, _:C57, _:D72, _:K73, _:A74, _:I75, _:Q76, _:L77, _:K78, _:D79, _:D80, _:D81, _:P82, _:W83, _:K84, _:D85, _:K86, _:L87, _:Q88, _:V89, _:Q110, _:K111, _:D113, _:Q114, _:R122, _:A220, _:N221, _:E222, _:G223, _:K224, _:K225, _:P226, _:D227, _:H228, _:E229, _:F239, _:D240, _:N241, _:A242, _:Q243, _:K263, _:K264, _:D265, _:T266, _:K267, _:E268, _:S269, _:V270, _:T271, _:Q272, _:V273, _:N282, _:P293, _:E294, _:E295, _:N296, _:D297, _:T298, _:N299, _:R300, _:F301, _:L302, _:T303, _:A304, _:V305, _:G306, _:E307, _:V308, _:N309, _:K310, _:S311, _:G312, _:M314, _:Q315, _:E318, _:W319, _:K320, _:P321, _:E322, _:G323, _:G324, _:E325, _:D337, _:G338, _:R339, _:T340, _:Y341, _:D342, _:G343, _:D344, _:D345, _:F346, _:T347, _:T348, _:L349, _:K350, _:P351, _:T352, _:D353, _:F354, _:A355, _:R359, _:T365, _:G366, _:E367, _:S368, _:S369, _:T370, _:D371, _:L372, _:G373, _:K374, _:P375, _:T376, _:G377, _:S378, _:R379	171	0.683
	3	_:G248, _:L249, _:N275, _:G276, _:R278, _:D279, _:K280, _:I281	8	0.634

La representación esquemática de la disposición de los epítomos discontinuos de células B, se realizó tanto para PLDr 2J-L como para CP40r 2J-L, permitiendo la visualización y disposición espacial de estos epítomos antigénicos (Figura 27).



**Figura 27.** Visualización esquemática de los epítomos discontinuos de células B de PLDr 2J-L (A) y CP40r 2J-L (B) estimados por ElliPro, basado en la estructura 3D de las proteínas. Los números representan cada epítomo de la Tabla 8.

Un total de cincuenta epítomos de células B para PLDr 2J-L y cuarenta y siete para CP40r 2J-L (9-12 según BepiPred 2.0, 9-8 según la escala de accesibilidad superficial Emini, 11-11 según la escala de antigenicidad de Kolaskar - Tongaonkar y 13-13 lineales y 8-3 discontinuos utilizando como base las estructuras de las proteínas en formato PDB) fueron estimados mediante el empleo de herramientas bioinformáticas. El conjunto de datos resultante representa los epítomos de células B para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L estimados por diferentes predictores. La predicción de epítomos por diferentes programas no es idéntica, por lo que se identificaron las regiones que se superponen en cada predicción de epítomos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Epítomos de células B de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, haciendo énfasis en las secuencias que se superponen, con el empleo de diferentes programas de predicción.

Residuos aa PLDr 2J-L	Bepidred 2.0	Escala Emini surface	Escala de Antigenicidad	ElliPro (Lineal)	ElliPro (Discontinuos)
1 - 50	NP	NP	4 KVVLFLSIIMAIM LPVGNA 22	1 <b>MREKVVLFSLIIMAIMLP VGNAAAPVVHNPAS</b> 33	1 <b>MKVVLFSLIIMAIMLPVGNAAAPVVH NPASVDK 292</b>
	24 <b>AAPVVHNPAS TAN 36</b>	<b>31 PASTANRP 38</b>	24 <b>AAPVVHNP</b> 31 36 <b>NRPVYIAHRVL TTQ 50</b>	47 <b>LTTQ 50</b>	47 <b>LTTQWADDGIPTSAGATEEDKY 138</b>
51-100	NP	NP	53 DDAVAIGANALE ID 66	NP	NP
	74 <b>WWADHDGIP TSAGATAE 90</b>	NP	NP	69 <b>AWGRGWWA 75</b>	69 <b>AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKT ITADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKI ADYGYEADQGKL 236</b>
		NP	NP	78 <b>HDGIPTSAGATAEE 91</b>	47 <b>LTTQWADDGIPTSAGATEEDKY 138</b>
91-130	98 <b>DKRKQG 103</b>	96 <b>IADKRKQ 102</b>	NP	NP	101 <b>KQG 103</b>
	117 <b>DYCRDARSVC 126</b>	113 <b>IKNPDYCRD A 122</b>	116 <b>PDYCRDARSVCS IN 129</b>	116 <b>PDYCRDARSV 125</b>	69 <b>AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKT ITADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKI ADYGYEADQGKL 236</b>
131-160	NP	133 <b>DLARKYL 139</b>	131 <b>LRDLARKYLEPA GVRVLYGFYKTV GGP 157</b>	132 <b>RDLARKYLEPA 142</b>	47 <b>LTTQWADDGIPTSAGATEEDKY 138</b>
	153 <b>TVGGP 157</b>	NP		NP	135 <b>ARLEPA 142</b> 69 <b>AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKT ITADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKI ADYGYEADQGKL 236</b>
161-240	NP	NP	NP	160 <b>KTITADLRD 168</b>	69 <b>AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKTI TADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKI ADYGYEADQGKL 236</b>

161-240	NP	NP	NP	160 <b>KTITADLRD</b> 168	69 AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKTIT <b>ADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKIAD</b> YGYEADQGKL 236
	179 <b>QDVLNDFARS</b> <b>ENKILTKQK</b> 197	185 <b>FARSENKILT</b> <b>KQKI</b> 198	171 AVALSGPAQDVL <b>ND</b> 184	175 <b>SGPAQDVLNDFARSEN</b> <b>KILTKQKIADY</b> 201	69 AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKTIT ADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKIAD YGYEADQGKL 236
	203 <b>YYNINQGFGN</b> <b>CYGTWNRTCD</b> <b>QLRKSSEARD</b> <b>QGKLG</b> 237	201 <b>YGYINI</b> 206	198 <b>IADYGY</b> 204	NP	NP
		223 <b>QLRKSSEAR</b> <b>DQGKLG</b> 237	NP	211 <b>GNCYGTWNRTCDQLRK</b> 226	208 <b>QTCQRA</b> 259 210 <b>FGNCYGTWNRTIATGQDADGK</b> 258
			229 <b>EARDQGKL</b> 236	69 AWGRGWNPDYRDASVINRKTVGGPKTIT ADLRDSGPAQDLNDARSENKILTKQKIAD YGYEADQGKL 236	
240-260	245 <b>ATGQDAR</b> 251	NP	NP	244 <b>IATGQDA</b> 250	210 <b>FGNCYGTWNRTIATGQDADGK</b> 258
	NP	NP	252 <b>VNDLLGKA</b> 259	NP	210 <b>FGNCYGTWNRTIATGQDADGK</b> 258
261-290	271 <b>THFYRHADTE</b> 280	273 <b>FYRHADTEN</b> <b>S</b> 282	261 VDGLIFGFKITHF <b>YRH</b> 276	275 <b>RHADTENSFKA</b> 285	276 <b>HADTENSF</b> 283
291-307	291 <b>DKHSATHHLA</b> <b>TVA</b> 303	289 <b>WVDKHA</b> 295	295 <b>ATHHLATVA</b> 303	289 <b>WVDK</b> 292	1 MKVVFLFSIIMAIMLPVGNAAAAPVVHNP <b>ASVDK</b> 292
<b>Residuos aa CP40r 2J-L</b>	<b>Bepired 2.0</b>	<b>Escala Emini surface</b>	<b>Escala de Antigenicidad</b>	<b>ElliPro (Lineal)</b>	<b>ElliPro (Discontinuos)</b>
1-70	5 <b>PRSVS</b> 9	NP	5 <b>PRSVSRLITVGIT</b> <b>SALFASTFSAVA</b> <b>SA</b> 31	1 MHNSPRSVSRLITVGITS <b>ALFASTFSAVASAESATL</b> <b>SKEPLKASPG</b> 46	1MHNSPRSVSRLITVGITSALFASTFSA <b>ESATLSKEPLKASPGRADTVGVQTTCDKA</b> <b>IQLKDDDPWKDKLQVQKQDRANEGKQP</b> DHEFDNAQKKTDESVTQVNPEENDTNR FLTAVGEVNKSGMQEKPEGGEDGRTYDG DDFTTLKPTDFARTGESSTDLGKPTGSR 379
	31 <b>AESATLSKEPL</b> <b>KASPGRADTV</b> <b>GVQTTCN</b> 58	NP	33 <b>SATLSKEPLKAS</b> 44		
		NP	50 <b>TVGVQTTCAK</b> PIFFGY 66	48 <b>ADTVGVQTT</b> 56	
71-170	71 <b>RDKAIQLKDD</b> <b>DPWKDKLQV</b> <b>KLTD</b> 93	78 <b>KDDDPWKD</b> <b>KL</b> 87	NP	72 <b>DKAIQLKDDDPWKDKL</b> <b>QV</b> 89	
		NP	86 <b>KLQVKLTDIPEH</b> VNMVSLFHVE 107		
71-170	108 <b>DNQSDQQF</b> <b>WETFHRE</b> 123	107 <b>EDNQSD</b> 113	NP	NP	

		120 <b>FHREYQPELK</b> KRG 132	NP	NP	
	143 <b>LLLNKIKDKNL</b> <b>YGKHVEDDYK</b> 163	NP	133 TRVVRTVGAQLL <b>LNK 147</b>	145 <b>LNKIK</b> 149	145 <b>LNKIKDKNLYGKHVEDDYKYRERVEKQL</b> <b>NLKWQRKS 245</b>
		158 <b>VEDDYKYREI</b> 167	NP	151 <b>KNLYGKHVEDDYKYRE</b> 166	
171-260	NP	NP	172 YNEYVVKHNL 181	NP	NP
	189 <b>ELRQVEKQLNL</b> <b>KWQ 202</b>	NP	189 <b>ELRQVEKQLNLK</b> 200	193 <b>VEKQLNLKWQLRK</b> 205	NP
	213 LMGPKAPANE <b>GKKPDHEG</b> 230	221 <b>NEGKKPDHE</b> <b>GY 231</b>	NP	220 <b>ANEGKKPDHE</b> 229	1MHNSPRSVSRLITVGITSALFASTFSAAAE SATLSKEPLKASPGRADTVGVQTTCDKAIQ LKDDDPWKDKLQVQKQDRANEGKKPDH <b>EFDNAQKKDTKESVTQVNPEENDTNRFLT</b> AVGEVNKSGMQEKPEGGEDGRTYDGGD FTTLKPTDFARTGESSTDLGKPTGSR 379
	NP	NP	231 YKLIYD 237	NP	
	240 <b>DNAQTSQ</b> 246	NP	244 <b>TSQVGLVADLVD</b> YVLAQT 261	240 <b>DNAQTS</b> 245	
261-325	265 <b>DTKESVTQVW</b> <b>NGFRDKINSC</b> <b>QF 286</b>	260 QTYKKDTKE <b>S 269</b>	NP 281 <b>INSCQFMAGYA</b> 291	262 <b>YKKDTKESVTQVWNGF</b> <b>RDKI 281</b>	248 <b>GLNGRDKI</b> 281
	293 <b>PEENDTNRFLT</b> <b>AVGEVNKSGA</b> <b>MQVAEWKPE</b> <b>GGE 325</b>	292 <b>HPEENDT</b> 298	NP 302 <b>LTAVGEV</b> 308	294 <b>EENDTNRFLTAVGEVNK</b> <b>SGAMQ 315</b>	1MHNSPRSVSRLITVGITSALFASTFSAAAE SATLSKEPLKASPGRADTVGVQTTCDKAIQ LKDDDPWKDKLQVQKQDRANEGKKPDH EFDNAQKKDTKESVTQVNPEENDTNRFL <b>TAVGEVNKSGMQEKPEGGEDGRTYDGD</b> <b>DFTTLKPTDFARTGESSTDLGKPTGSR</b> 379
		NP	NP	318 <b>EWKPEGGEK</b> 326	
326-379	339 <b>RTYDGGDFTL</b> <b>KPTDFAF 356</b>	336 <b>RDGRTYDG</b> 343	NP	337 <b>DGRTYDGGDFTLKPTD</b> <b>FA 355</b>	
	362 <b>ELTTGESSTDL</b> <b>GKPT 376</b>	NP	NP	362 <b>ELTTGESSTDLGKPTGSR</b> 379	

**NP:** No predicción en esa región de la secuencia. En negritas se representan las regiones en la secuencia de las proteínas que son identificadas como epítomos por diferentes programas de predicción.

Las mismas regiones en las proteínas fueron identificadas por diferentes programas como epítomos, con diferencias en la longitud de los epítomos y la presencia o ausencia de determinados aminoácidos. En la comparación de los diferentes epítomos identificados por diversos predictores, pudimos establecer

11 regiones en la secuencia de PLDr 2J-L y 12 en CP40r 2J-L, que fueron predichas por al menos dos criterios diferentes:

- PLDr 2J-L (<sup>24</sup>AAPVVHNP<sup>31</sup>, <sup>79</sup>DGIPTSAGATAE<sup>90</sup>, <sup>117</sup>DYCRD<sup>121</sup>, <sup>133</sup>DLARKYL<sup>139</sup>, <sup>153</sup>TVGGP<sup>157</sup>, <sup>179</sup>QDVLND<sup>184</sup>, <sup>185</sup>FARSENKILTKQKI<sup>198</sup>, <sup>211</sup>GNCYGTWNRT<sup>220</sup>, <sup>229</sup>EARDQGKL<sup>236</sup>, <sup>245</sup>ATGQDA<sup>250</sup>, <sup>276</sup>HADTE<sup>280</sup>).
- CP40r 2J-L (<sup>5</sup>PRSVSRLITVGITSALFASTFSAVASA<sup>31</sup>, <sup>33</sup>SATLSKEPLKAS<sup>44</sup>, <sup>50</sup>DTVGVQTTTCN<sup>58</sup>, <sup>70</sup>DKAIQLKDDDPWKDKLQVKLTD<sup>93</sup>, <sup>145</sup>LNKIK<sup>149</sup>, <sup>158</sup>VEDDYKYRE<sup>166</sup>, <sup>193</sup>VEKQLNLK<sup>200</sup>, <sup>221</sup>NEGKKPDHE<sup>229</sup>, <sup>240</sup>DNAQ<sup>243</sup>, <sup>294</sup>EENDTNRFLTAVGEVNKSG<sup>312</sup>, <sup>337</sup>DGRTYD<sup>342</sup>, <sup>366</sup>GESSTD LGKPT<sup>376</sup>).

#### VII.12.2 Predicción de epítomos de células T, contexto MHC I, para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

La respuesta inmune celular es de suma importancia, en especial la activación de los linfocitos T, para la resolución de las infecciones bacterianas intracelulares. Por tal motivo se identificaron los epítomos de células T en el contexto del MHC clase I de modelo murino, para ambas proteínas, mediante el empleo de las herramientas del portal web IEDB (Tabla 10). Las secuencias de la proteína de PLDr 2J-L con mayor potencial para activar las células T CD8<sup>+</sup> en el contexto de diferentes variedades del MHC I fueron: posición 56 **VAIGANAL** 63 (alelos H-2-Kb y H-2-Db), 139 **LEPAGVRV** 146 (alelos H-2-Kb, H-2-KK y H-2-Qa1) y la secuencia 202 **GYJNI** 206 (alelos H-2-Kb, H-2-KK). Para la proteína CP40 las secuencias que fueron reconocidas por más de un tipo de alelos fueron: las secuencias 137 **RTVGAQL** 143 (alelos H-2-Qa1 y H-2-Kb) y 205 **KIMGAFSEL** 213 (alelos H-2-Kb y H-2-Qa1).

Los epítomos de células B y T fueron evaluados por la herramienta ECV (por sus siglas en inglés, *Epitope Conservancy Patterns*) disponible en la página IEDB, en busca de patrones conservados en los epítomos en comparación con las secuencias de las proteínas PLD y CP40 de las cepas de origen mexicano. Todos los epítomos lineales de células B y los epítomos de células T, fueron conservados en un 100%, por las proteínas de las cepas de origen mexicano MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29.

**Tabla 10.** Epítomos de células T presentados en el contexto del MHC I de modelo murino, de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

Proteínas	Alelo	Inicio	Fin	Tamaño	Epítomos	Score
PLDr 2J-L	H-2-Kb	146	154	9	VLYGFYKTV	0.916
	H-2-Kk	279	286	8	TENSFKAI	0.87
	H-2-Kb	104	111	8	ANITFTWL	0.822
	H-2-Kk	89	96	8	AEEIFKHI	0.791
	H-2-Kd	39	47	9	VYAIAHRVL	0.77
	H-2-Db	56	65	10	VAIGANALEI	0.715
	H-2-Kk	139	147	9	LEPAGVRVL	0.715
	H-2-Kd	202	210	9	GYYNINQGF	0.628
	H-2-Kb	4	11	8	KVVLFLSI	0.62
	H-2-Kd	137	146	10	KYLEPAGVRV	0.609
	H-2-Kb	199	206	8	ADYGYNI	0.553
	H-2-Kk	139	146	8	LEPAGVRV	0.545
	H-2-Kk	63	70	8	LEIDFTAW	0.526
	H-2-Kb	56	63	8	VAIGANAL	0.524
	H-2-Kb	266	273	8	FGFKITHF	0.522
H-2-Qa1	138	146	9	YLEPAGVRV	0.516	
CP40r 2J-L	H-2-Kk	173	181	9	NEYVVKHNL	0.943
	H-2-Kk	294	302	9	EENDTNRFL	0.927
	H-2-Kk	158	167	10	VEDDYKYREI	0.694
	H-2-Kb	205	213	9	KIMGAFSEL	0.672
	H-2-Qa1	137	145	9	RTVGAQLLL	0.664
	H-2-Kb	206	213	8	IMGAFSEL	0.654
	H-2-Kk	228	235	8	HEGYKYLI	0.651
	H-2-Qa1	333	341	9	ALDRDGRTY	0.645
	H-2-Kk	172	181	10	YNEYVVKHNL	0.61
	H-2-Kd	163	171	9	KYREIARDV	0.58
	H-2-Kk	294	301	8	EENDTNRF	0.568
	H-2-Qa1	205	213	9	KIMGAFSEL	0.539
	H-2-Kb	339	349	11	RTYDGDDFTTL	0.53
	H-2-Kb	135	143	9	VVRTVGAQL	0.52
H-2-Kb	17	25	9	TSALFASTF	0.502	

### VII.12.3 Potencialidades de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como candidatos vacunales.

El programa Vaxign permitió identificar ambas proteínas como antigénicas, involucradas en la adhesión celular, con valores de 0.654 y 0.637 para PLDr 2J-L y CP40r 2J-L respectivamente.

La localización celular no fue estimada por el programa; sin embargo; se detectó un dominio de hélice de transmembrana en cada proteína. Las proteínas se evaluaron como posibles candidatos vacunales, teniendo en cuenta sus propiedades físico-químicas, mediante el empleo del programa VaxiJen. Este programa clasificó las proteínas teniendo en cuenta todo su conjunto, como antígenos Probables, con un valor de 0.439 para PLDr 2J-L y 0.566 para CP40r 2J-L.

## VIII. DISCUSIÓN

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta a los pequeños rumiantes, siendo causa de grandes pérdidas económicas para la industria ovina y caprina a nivel mundial (Odhah *et al.*, 2018; Faeza *et al.*, 2019). *C. pseudotuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa, Gram positiva, que presenta dos biovarios *equi* y *ovis*, siendo este último el patógeno agente causal de esta enfermedad (Dorella *et al.*, 2006).

México presenta afectaciones en las producciones ovinas y caprinas por la incidencia de esta enfermedad, para la cual no se comercializan vacunas en el país. Diversos estudios han permitido constatar la presencia *C. pseudotuberculosis* en diferentes regiones ganaderas del país (Varela *et al.*, 2018; Parise *et al.*, 2018). Aunque existen vacunas disponibles a nivel mundial para la profilaxis de esta enfermedad, su eficacia aún es incompleta en el control y protección de todos los animales vacunados (Windsor *et al.*, 2016). Las vacunas clásicas convencionales se asocian con una eficacia limitada y, por ello, la investigación continúa centrada en el estudio de candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas de nueva generación (Bastos *et al.*, 2012). Las proteínas PLD y CP40 se han evaluado en diferentes formulaciones de vacunas, mostrando elevados niveles de protección en los animales desafiados con cepas virulentas (Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta la función biológica que desempeñan estas proteínas durante la infección y diseminación bacteriana (Hodgson *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1994), una estrategia eficiente sería dirigir la respuesta del sistema inmune hacia su neutralización. Por tales motivos nos dimos a la tarea de obtener por vía recombinante y caracterizar las proteínas PLD y CP40 de un aislado de origen mexicano, para su empleo en futuras formulaciones de vacunas y medios diagnósticos.

### VIII.1 Identificación de *C. pseudotuberculosis* aislado 2J-L mediante PCR Multiplex

Para la obtención de las proteínas PLD y CP40 por vía recombinante se utilizó el material genético de un aislado de *C. pseudotuberculosis* obtenido en un estudio previo en el estado de Jalisco, municipio Zapotlanejo, localidad Tauquilla. *C. pseudotuberculosis* aislamiento 4-2.2LJ (345929), fue obtenido en un ovino, a partir de un absceso menor de 5cm, de constitución dura y seropurulento, de la cabeza de una hembra Pelifolk (Valdivia *et al.*, 2014; Hernández-León *et al.*, 2015). La identificación mediante pruebas bioquímicas, secuenciación de un segmento del gen *rpoB* y análisis filogenético, permitió la clasificación de este aislamiento (4-2.2LJ, en este artículo nombrado, C43) como *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. También se identificó en este aislamiento la presencia de los genes *fag*

*A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60* que codifican para factores de patogenicidad (Varela *et al.*, 2018). En el presente trabajo se renombró este aislamiento como 2J-L y se corroboró su identificación mediante la amplificación de fragmentos de los genes *16s rRNA*, *rpoB* y *pld* por PCR Multiplex, basados en el protocolo propuesto por Pacheco *et al.*, (2007). El gen *16S rRNA* es el componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas, y permite la unión de la secuencia líder de los ARNm (secuencia de Shine-Dalgarno) para el inicio de la traducción de los genes. La secuencia de este gen se encuentra altamente conservada y presenta bajas tasas de evolución, de ahí que se utilice para la reconstrucción de filogenia. El uso de este gen ha tenido una enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Cetinkaya *et al.*, 2002). El empleo de la secuencia del gen *16S rRNA* permite diferenciar *C. diphtheriae* de *C. pseudotuberculosis* con una similitud de un 97.8%, lo que indica que estas especies están estrechamente relacionadas, pero son diferentes. Sin embargo, entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* la similitud entre especies es de 99.7% por lo que este gen no permite la diferenciación entre ambas (Pascual *et al.*, 1995). Por tal motivo se realiza la amplificación simultánea de otros genes más específicos como *pld* y *rpoB*. El gen *rpoB* codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa y la amplificación de un fragmento de 434 a 452 pb permite la identificación a nivel de especie, ya que presenta un elevado polimorfismo. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies de *Corynebacterium spp.* ha sido de 95.9%, lo que posibilita una identificación certera a diferencia del 99.7% de semejanza que presentan las secuencias completas del *16S rRNA* (1.500 pb) (Khamis *et al.*, 2005; Renaud *et al.*, 2007). El gen *pld* codifica para la fosfolipasa D, factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis* (D'Afonseca *et al.*, 2008). Es un blanco de amplificación por PCR para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, especie genotípicamente muy relacionada (Pacheco *et al.*, 2007). La amplificación de estos genes permitió corroborar la identidad del aislamiento 2J-L como *C. pseudotuberculosis*. El PCR Cuadruplex (Almeida *et al.*, 2017), incluye la amplificación de los genes anteriormente citados, así como el gen *narG*, que codifica para la cadena  $\alpha$  de la enzima Nitrato reductasa. La presencia de este gen es indicativo de la cepa biovar *equi* y la ausencia del mismo permite identificar a la cepa como biovar *ovis*. Este nuevo sistema de diagnóstico por PCR permite establecer la identificación hasta biovar, por lo que tendremos en cuenta este protocolo para futuros estudios de identificación de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*.

### VIII.2-3 Amplificación de los genes y clonaje en el plásmido pGEM-T Easy

El diseño de los oligonucleótidos, así como los programas empleados para la amplificación de los genes mediante PCR, permitieron la obtención de los genes completos *pld* y *cp40*. El sistema de clonaje con el plásmido pGEM-T Easy facilitó la inserción de los genes, debido a que presenta diferentes mecanismos de selección para la identificación de los clones recombinantes. Este plásmido se encuentra lineal, abierto por el sitio múltiple de clonaje, presentando en ambos extremos residuos de Timina. Los genes obtenidos a partir de la amplificación por PCR, empleando la enzima Taq polimerasa, presentan en los extremos residuos de adenina generados por esta enzima. El uso de este plásmido facilita la inserción del gen de interés, ya que la unión se ve favorecida por la afinidad entre estas bases nitrogenadas. Además el plásmido presenta un gen que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa, la cual proporciona resistencia al antibiótico ampicilina y permite el crecimiento de las bacterias transformadas con el plásmido, en medio de cultivo selectivo con este antibiótico. También contiene el gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, enzima que si se expresa puede degradar galactósidos artificiales tales como el 5-bromo-4 cloro 3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal), tornando las colonias de color azul. El gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa se encuentra interrumpido por el sitio múltiple de clonaje, si se inserta el gen de interés en el plásmido de manera exitosa, no se expresa la enzima, y las células no pueden utilizar el Xgal como sustrato, tornándose las colonias de color blanco. El análisis mediante digestión con enzimas de restricción permitió identificar los plásmidos recombinantes. La inserción de las secuencias que son reconocidas por las enzimas *NcoI/XhoI*, en los extremos de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes, posteriormente permitió direccionar el clonaje de los genes en el plásmido de expresión final (Sambrook *et al.*, 2012).

### VIII.4-5 Análisis de la secuencia de los genes *pld* - *cp40* y estudio filogenético de *C. pseudotuberculosis* (2J-L).

Las secuencias de los genes *pld* y *cp40* del aislado 2J-L presentaron porcentajes de similitud elevados en comparación con las secuencias de otros aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, informadas en la base de datos GenBank (NCBI). Los resultados demuestran que estos genes son altamente conservados y presentan poca variación entre las cepas biovar *ovis*. La conservación en las secuencias de estos genes pueden deberse a la función que realizan estas proteínas como factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1994).

Las secuencias de los genes *pld* y *cp40* del aislado 2J-L presentaron los porcentos de identidad más elevados con respecto a las cepas de origen mexicanas MEX25 y MEX29, así como también con las cepas 4681 proveniente de un ovino de Australia y la cepa 29156 aislada de un bovino proveniente de Israel (Sousa *et al.*, 2019). El análisis filogenético permitió agrupar el aislado 2J-L más cercano a estas cepas anteriormente citadas. También se observó que las cepas MEX30 y MEX31, de origen mexicano, se encuentran más alejadas filogenéticamente del aislado 2J-L con 70-75%, debido a que estas pertenecen al biovar *equi*. El aislamiento 2J-L se agrupó con cepas mexicanas biovar *ovis*, sin encontrarse relación con respecto a la localización geográfica de los aislamientos. La cepa MEX1 (NZ\_CP017711.1) se aisló del absceso de una cabra en la región de Tlaxcala, MEX2 (CP046644.1) de una cabra de Puebla y la cepa MEX29 (NZ\_CP016826.1) de una oveja de Río Frío de Juárez, todas regiones con una distancia de 40-50 Km aproximadamente entre aislamientos. La cepa MEX25 (NZ\_CP013697.1) se aisló de oveja y MEX9 (NZ\_CP014543.1) de cabra, ambas cepas provenientes de la región de Guanajuato, con una distancia de 450 km con respecto a las cepas anteriores (Parise *et al.*, 2018). El aislamiento 2J-L se obtuvo en Jalisco con una distancia de 276 Km respecto a Guanajuato y 666 Km con respecto a Tlaxcala. A pesar de las diferencias en la ubicación geográfica de los aislamientos MEX25, MEX29 y 2J-L, todos derivados de ovejas, se agruparon en el mismo clado. El mismo comportamiento se observó para MEX1, MEX2 y MEX9, todos derivados de cabras, agrupados más cerca filogenéticamente. Los resultados previos obtenidos del análisis basado en la secuencia del genoma completo de las cepas mexicanas MEX1, MEX9, MEX25, MEX29, mostraron que estas se agruparon predominantemente según el tipo de hospederos y no debido a la proximidad geográfica. Pero al igual que en otros estudios, también se agruparon en el mismo clado con cepas biovar *ovis* aisladas de diferentes tipos de hospederos (Parise *et al.*, 2018). Este comportamiento también se observó en nuestros resultados donde *C. pseudotuberculosis* 2J-L se agrupó en un mismo clado con cepas biovar *ovis*, del mismo tipo de hospedero entre las cepas mexicanas y con otras cepas de diferentes hospederos, como la cepa 29156 aislada de un bovino proveniente de Israel. Diversos estudios indican que las cepas del biovar *ovis* contienen un alto grado de clonalidad, con más secuencias conservadas y capacidad de infectar diferentes tipos de hospederos (Connor *et al.*, 2000, Connor *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2013), pero no presentan el mismo grado de agrupación filogenética en los clados que las cepas biovar *equi* (Viana *et al.*, 2017). Mientras que las cepas del biovar *ovis* forman un grupo mixto con una representación de diferentes tipos de hospederos, las cepas pertenecientes al biovar *equi*,

son más variables, están bajo un proceso de mutación constante, presentando diferencias de cepas establecidas que hacen que su distribución en el árbol filogenético sea más específica y separada por grupos, incluso por tipo de hospederos (Soares *et al.*, 2013; Dorneles *et al.*, 2014). El aislamiento 2J-L se obtuvo de una oveja perteneciente a una granja con ovinos y caprinos coexistiendo juntos, donde esta granja podría tener diferentes fuentes de cepas del biovar *ovis* (Varela *et al.*, 2018). En el estudio previo de las cepas de origen mexicano se planteó que la estructura genética está más influenciada por el transporte de animales entre granjas que por la preferencia de hospederos. Por otra parte, se ha planteado que en los árboles filogenéticos donde se agrupan las cepas en dependencia del tipo de hospedero se debe a que las granjas de cabras y ovejas podrían tener diferentes fuentes de cepas de biovar *ovis*. También el agrupamiento de las cepas en el mismo clado según el tipo de hospedero, se ha visto en granjas donde solo se encuentra presente un solo tipo de hospedero o las poblaciones de animales estudiadas estaban ampliamente dispersas geográficamente. El traslado de animales infectados, así como el mayor contacto y transmisión de la enfermedad probablemente ocurre entre granjas de la misma especie de hospedero (Parise *et al.*, 2018). Otros autores explican las diferencias en la organización filogenética, proponiendo la teoría de que *C. pseudotuberculosis* puede estar bajo un proceso de anagénesis y especiación biológica, basándose en estudios realizados con la cepa 162 que pertenece al biovar *equi* y se agrupa filogenéticamente más cerca de las cepas del biovar *ovis* (Oliveira *et al.*, 2016), resultado que también fue constatado en nuestro estudio.

## VIII.6 Análisis de la secuencia de aminoácido de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.

### VIII.6.1 Fosfolipasa D, PLD

La fosfolipasa D es una exotoxina, esfingomielinasa (fosfatidilcolina fosfohidrolasa, EC 3.1.4.4), considerada el principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, cuyo papel en la patogénesis está bien determinado contribuyendo a la proliferación, permeabilidad y propagación celular (McNamara *et al.*, 1994). La proteína PLDr 2J-L conservó el dominio catalítico de la superfamilia de fosfodiesterasas de tipo fosfolipasa C. La superfamilia de fosfodiesterasas similares a PI-PLC representa los dominios catalíticos de la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol bacteriana, fosfolipasa C específica de fosfoinositido eucariota, fosfodiesterasas de glicerofosfodiéster (GP-GDE), esfingomielinasas D (fosfolipasa de araña) proteínas similares a D y fosfolipasa D (PLD) de varias bacterias patógenas. Las PI-PLC son enzimas ubicuas que hidrolizan los lípidos de la membrana para producir fosfatos de inositol y diacilglicerol (DAG). PLD corresponde a la subfamilia con dominio

similar a glicerofosfodiéster fosfodiesterasa (GDPD), presente en la esfingomielinasa D (SMasa D) del veneno de araña, *Ajellomyces capsulatus* H143 proteína similar a PLD de ascomicetos y PLD de *C. pseudotuberculosis* (Flores-Díaz *et al.*, 2016). Estas enzimas no pertenecen a la superfamilia de la fosfolipasa D (PLD), ya que carecen del motivo de secuencia HKD conservado, que caracteriza el centro catalítico de esta superfamilia (Flores-Díaz *et al.*, 2016). La esfingomielinasa D del veneno de araña y la fosfolipasa D bacteriana son proteínas similares, que catalizan la hidrólisis dependiente de  $Mg^{2+}$  de la esfingomielina (Dias-Lopes *et al.*, 2013). En presencia de  $Mg^{2+}$ , la SMasa D puede funcionar como lisofosfolipasa que hidroliza la lisofosfatidilcolina (LPC) a colina y ácido lisofosfatídico (LPA) alterando la morfología de la membrana diana (Murakami *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006). Los compuestos derivados de la degradación de la esfingomielina causan la agregación plaquetaria, hiper-permeabilidad endotelial y respuestas pro-inflamatorias (Hogdson *et al.*, 1990). A pesar de las variaciones presentes en la secuencia de nucleótidos del gen *pld* 2J-L, la secuencia de aminoácidos se conservó, siendo 100% idéntica en comparación con las proteínas PLD de todas las cepas mexicanas incluidas en el estudio. El lazo (loop) catalítico y el sitio activo están altamente conservados entre las fosfolipasas de todas las cepas. Encontramos variaciones en los residuos de aminoácidos de las cepas mexicanas, incluido el aislado 2J-L, con respecto a la secuencia de la proteína PLD-WP\_048588395.1 reportada como Fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis*. Los efectos de las variaciones de aminoácidos en la misma posición de la proteína se pueden explicar analizando las propiedades físicas, químicas y estructurales de los residuos sustituidos. Los factores con mayores implicaciones son el tamaño de la cadena lateral seguido de su hidrofobicidad (Betts y Russell, 2003). La primera variación se identificó en la posición 28 con un residuo de valina (V) mientras que la misma posición presenta serina (S) para PLD-WP\_048588395.1. La valina es un aminoácido no polar, neutro y alifático cuya cadena lateral está ramificada con un grupo isopropilo. Los residuos hidrofóbicos generalmente no son reactivos y rara vez participan en la función de las proteínas. Este residuo suele encontrarse enterrado en núcleos hidrófobos de las proteínas. Por el contrario, la serina es un residuo polar, neutro e hidrofílico, con un grupo hidroxil-metilo como cadena lateral y suele participar en enlaces de hidrógeno con otras cadenas laterales. La serina puede formar parte tanto del interior de una proteína como de la superficie, su pequeño tamaño le permite encontrarse dentro de giros cerrados en la superficie de las proteínas, donde es posible que el oxígeno hidroxilo de su cadena lateral forme un enlace de hidrógeno con el esqueleto proteico (Betts y Russell, 2003). Este cambio de secuencia se

puede clasificar como una variación no conservadora debido a las diferencias entre ambos aminoácidos. También en las posiciones 198 y 205 se observó otro cambio de aminoácidos, de isoleucina (I) a valina (V) y de asparagina (N) a ácido aspártico (D). Ambos constituyeron variaciones conservadoras o reemplazos conservadores debido a un intercambio entre dos aminoácidos separados por una pequeña distancia fisicoquímica. La isoleucina puede ser sustituida por otros aminoácidos hidrofóbicos, como la valina, ya que ambos contienen dos sustituyentes que no presentan hidrógeno unido al esqueleto de carbono. Estos aminoácidos presentan mucho más volumen cerca de la estructura de la proteína, siendo más restringidas las conformaciones que la cadena principal puede adoptar. El ácido aspártico puede ser sustituido por otros aminoácidos polares, en particular la asparagina, solo diferenciándose por la presencia de un grupo amino en lugar de uno de los oxígenos que se encuentran en el ácido aspártico (Betts y Russell, 2003). Finalmente, en la posición 287 detectamos un cambio no conservador de isoleucina en la PLD de las cepas mexicanas y glutamina (Q) en la secuencia tipo PLD. Al ser un residuo hidrofóbico, la cadena lateral de isoleucina es poco reactiva y, por lo tanto, rara vez participa directamente en las funciones de las proteínas. Por lo general se encuentra enterrada en núcleos hidrófobos de proteínas y las glutaminas están involucradas con bastante frecuencia en sitios de unión o activos de proteínas, con una cadena lateral polar que puede interactuar con otros átomos polares o cargados (Betts y Russell, 2003). Sin embargo, ninguno de estos cambios detectados involucró residuos del sitio activo o del lazo catalítico de PLD, por lo que podemos inferir que no deben afectar la función enzimática de la proteína. La esfingomielina es uno de los principales fosfolípidos presentes en las membranas plasmáticas de células de los mamíferos y se ha comprobado que esta puede ser hidrolizada por enzimas SMasa D de diferentes organismos patógenos, como arañas, bacterias, garrapatas, ácaros y hongos (Dias- Lopes *et al.*, 2013; Flores-Díaz *et al.*, 2016). La evaluación de las características de las SMasa D de diferentes organismos basados en la estructura de la enzima de *Loxosceles laeta*, permitió identificar el sitio catalítico conservado involucrando los residuos H (12) y H (47) homólogos a H (44) y H (78) de PLD en *C. pseudotuberculosis*. En la toxina de araña los residuos E (32), D (34) y D (91) coordinan la unión del ion  $Mg^{2+}$ , y los residuos homólogos se encontraron en PLDr 2J-L en las posiciones E (64), D (66) y D (112). Otros estudios han sugerido que el sitio catalítico de la SMasa D está soportado por una red de enlaces de hidrógeno entre D (34), D (52), W (230), D (233) y N (252), presentando sus homólogos en PLD de *C. pseudotuberculosis* en la posición W (242), T (246), G (268). Los residuos D (52), D (233) y N (252) no se conservaron entre

las SMasa D de los diferentes organismos, porque la contribución del enlace de hidrógeno de los grupos carboxilo de estos aminoácidos puede ser reemplazada por cualquier otro grupo donador / aceptor (Murakami *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006). Diferentes ensayos han demostrado qué sustitución de residuos de aminoácidos pueden inactivar las funciones enzimáticas de PLD. Un ejemplo corresponde a Toxminus, una cepa atenuada de *C. pseudotuberculosis*, cuyo gen *pld* cromosómico fue inactivado mediante un evento de recombinación doble (Hodgson *et al.*, 1992). Esta cepa atenuada se transformó con un plásmido modificado con el gen *pld* con una mutación sitio específica en el nucleótido C129, lo cual ocasionó la producción de una toxina PLD no funcional (Hodgson *et al.*, 1994). Según los autores, la variación de este nucleótido produjo un cambio en el residuo de His-20, sustituido por tirosina (Y), lo que modificó el sitio activo de la enzima y redujo en gran medida la cantidad de PLD secretada por la cepa Toxminus. Para mejorar la sobreexpresión y secreción de la toxina PLD inactivada, se evaluaron diferentes sustituciones de aminoácidos para la posición His-20, donde la mayoría de los cambios inactivaron la PLD, excepto por lisina, arginina y glutamina, ya que la toxina conservó actividad enzimática medible (Tachedjian *et al.*, 1995). Este residuo denominado His-20, coincide con el primer residuo de Histidina de PLD presente en la secuencia YAIAHRVL (Murakami *et al.*, 2005) por lo que una modificación del nucleótido C129, influye directamente en la histidina en la posición 44, la cual está involucrada en el sitio catalítico (H44-H78).

#### VIII.6.2 Endoglicosidasa, CP40

La proteína CP40 fue caracterizada como una proteasa de serina, con potencialidades inmunogénicas para el desarrollo de vacunas (Walker *et al.*, 1994). Posteriormente se reclasificó como una endoglicosidasa con capacidad para hidrolizar la región Fc de los anticuerpos IgG (Shadnezhad *et al.*, 2016). Las endo-beta-N-acetilglucosaminidasas son quitinasas que hidrolizan el núcleo de quitina de varios glicanos y glicoproteínas enlazados con asparagina (N). La Familia GH18 (Glicosil hidrolasa) está constituida por enzimas que hidrolizan la quitina, un polímero abundante de enlace beta-1,4 al N-acetilglucosamina (GlcNAc), componente principal de las paredes celulares (van Aalten, 2001). La identificación del dominio catalítico de la proteína CP40r 2J-L, permitió clasificarla como enzima endo-beta-N-acetilglucosaminidasa perteneciente a la Familia GH18 (archler-Bauer *et al.*, 2017). Algunos de los miembros de esta familia son endo-beta-N-acetilglucosaminidasa (Endo S) de *Streptococcus pyogenes* (Collin y Olsen, 2001), Endo F1 (Tarentino *et al.*, 1991), Endo F2 (Trimble

*et al.*, 1991) y Endo F3 (Giddens *et al.*, 2016) de *Flavobacterium meningosepticum*, Endo E de *Enterococcus faecalis* (Goda *et al.* 2008) y Endo H de *Streptomyces plicatus* (Rao *et al.*, 1999). Se han caracterizado dos enzimas de esta familia de proteínas, en organismos eucariotas, como Endo T de *Trichoderma reesei* (Stals *et al.*, 2012) y Endo FV del basidiomiceto *Flammulina velutipes* (Hamaguchi *et al.*, 2010). Todas las secuencias de CP40 de las cepas de origen mexicano comparten el mismo sitio activo de endoglicosidasa. Solo se encontraron variaciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a MEX25 y CP40-WP\_058831578.1 en la posición 247, con un residuo de leucina (L) donde el resto de las cepas presentan valina (V). Esta variación corresponde a un cambio conservativo debido a que ambos aminoácidos son hidrofóbicos y normalmente están enterrados en el núcleo estructural de las proteínas. Además, se detectó un cambio en la posición 105, donde todas las cepas mexicanas conservan el mismo aminoácido histidina (H), mientras que la proteína CP40-WP\_014522771.1 de la cepa PAT10 (absceso pulmonar de una oveja de Argentina) (Cerdeira *et al.*, 2011), tiene una prolina (P). La histidina es un aminoácido polar; sin embargo, es único con respecto a sus propiedades químicas, lo que significa que no se sustituye particularmente bien con ningún otro aminoácido. La prolina presenta la cadena lateral conectada a la estructura de la proteína dos veces, formando un anillo de cinco miembros, contiene un grupo  $\text{NH}_2^+$  en lugar de  $\text{NH}_3^+$ . A pesar de ser alifático, se plantea que pueden encontrarse en la superficie de las proteínas, como los residuos polares (Betts y Russell, 2003). Estos cambios no constituyen modificaciones que afecten la actividad enzimática de la proteína CP40. La modificación del gen *ndoS*, dirigida mediante mutagénesis sitio específica, permitió la obtención de la proteína recombinante Endo S con una variación en el residuo 235 de ácido glutámico. Esta proteína recombinante modificada presentó una pérdida de función enzimática, ya que no pudo mediar la hidrólisis de anticuerpos IgG humanos. Además, el uso de N-bromosuccinimida, compuesto que reacciona con el grupo indol de los triptófanos y con los grupos SH de las cisteínas, afectó la actividad enzimática de la Endo S. Para confirmar la influencia de ambos tipos de residuos de aminoácidos en la actividad enzimática, se aplicaron tratamientos con yodoacetamida (IAA) o N-etilmaleimida (NEM), bloqueando solo los residuos de cisteínas, y se verificó que la proteína EndoS conservó su actividad enzimática. Además, la modificación de los residuos de lisinas usando formaldehído, no alteró la función enzimática. Estos resultados indicaron que el residuo 235 de ácido glutámico y los residuos de triptófanos son esenciales para la actividad hidrolizante de la Endo S (Allhorn *et al.*, 2008). También se ha demostrado en quitinasas de

*Streptomyces griseus* que los triptófanos situados en los lazos extendidos fuera del sitio catalítico tienen una función esencial para la unión del sustrato y la actividad enzimática (Itoh *et al.*, 2006; Kezuka, *et al.*, 2006). El bloqueo químico de los triptófanos en una  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa del molusco *Batillus cornutus* inhibió la actividad de la quitinasa (Lin *et al.*, 2003). El análisis del sitio activo de Endo T, teniendo en cuenta los residuos D (129) como estabilizador del estado de transición en el mecanismo de catálisis asistida por sustrato y E (131) como donador de protones, evidenció que estos residuos se encuentran en posiciones casi idénticas y ampliamente conservadas en las proteínas GH18 de bacterias: Endo H, Endo F1, Endo F3 y Endo BT (Stals *et al.*, 2012). Las proteínas Endo F3 y Endo S exhiben un gran parecido en sus sitios catalíticos, donde los residuos D (126), E (128) e Y (213) se encuentran en posiciones equivalentes a D (233), E (235) e Y (305) en Endo S (Stals *et al.*, 2012), los cuales también se conservan en las posiciones D (187), E (189) e Y (262) para CP40r 2J-L.

#### VIII.7 Características físico-químicas de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L

Se determinaron diferentes parámetros físicoquímicos como parte de la caracterización de las proteínas PLDr y CP40r del aislado 2J-L de *C. pseudotuberculosis*. Los primeros ensayos para la obtención de PLD como proteína recombinante establecieron que el ORF tenía aproximadamente 1100 pb y codificaba para una molécula de 31.4 KDa (Hogdson *et al.*, 1990). Encontramos diferencias en cuanto al peso molecular estimado *in silico* para la proteína PLDr 2J-L, siendo de 33.8 KDa, en comparación con los datos reportados por Hogdson *et al.*, (1990). El peso molecular depende del número y tipo de residuos de aminoácidos, donde cada aminoácido contribuye aportando valor al peso neto de la proteína. En el trabajo de Hogdson *et al.*, (1990) no se tuvo en cuenta la secuencia completa de la proteína y el peso molecular fue determinado a partir de 259 residuos de un total de 307 aminoácidos. Para la estimación del peso molecular de PLDr 2J-L se empleó toda la secuencia de la proteína, por lo que obtuvimos un valor de peso molecular mayor. La proteína CP40 ha sido caracterizada con un peso molecular de 42.9 KDa, conformada por 379 aminoácidos y codificada por un gen que presenta 1.137 pb (Walker *et al.*, 1995), lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio para esta proteína. Ambas proteínas son ricas en alanina (A), ácido aspártico (D), leucina (L), lisina (K) y treonina (T), en su mayoría residuos polares que contribuyen con una estructura predominantemente hidrofílica, lo que concuerda con lo establecido para estas proteínas por otros autores (Hogdson *et al.*, 1990; Hogdson *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995). El punto isoeléctrico se encuentra entre las

propiedades más ampliamente determinadas y reportadas, que informan sobre el valor de pH al cual la carga neta de las proteínas se vuelve cero (Novák y Havlíček, 2016). El punto isoelectrico proporciona información sobre el tipo de carga que prevalece, las cuales están determinadas por el número de residuos ácidos y básicos, describiendo si la superficie de las proteínas es en general más ácida o más básica. Cuando el pH de la solución coincide con el punto isoelectrico, la solubilidad de las proteínas se afecta, ya que las cargas negativas y positivas están equilibradas, provocando agregación y precipitación (Shimura *et al.*, 2018). Estos resultados deben tenerse en cuenta para futuros ensayos de obtención y purificación de las proteínas.

El coeficiente de extinción indica cuánta luz absorbe una proteína a una determinada longitud de onda y la estimación de este valor es útil para darle seguimiento a la proteína por espectrometría durante el proceso de purificación. Generalmente estos valores son bastante fiables, se desvían mucho menos (<10%) para las proteínas que contienen residuos de triptófano, porque este aminoácido contribuye más al coeficiente de extinción global, en comparación con tirosina y cisteína (Gilla y von Hippela, 1989).

Los valores de vida-media se determinaron en función de la "regla del extremo N", predicción que estima el tiempo hipotético que tardarán en degradarse las proteínas después de su síntesis en células humanas, levaduras y *E. coli*. Esta propiedad se descubrió por primera vez en base a experimentos que estaban dirigidos a determinar la función de la enzima  $\beta$ -galactosidasa obtenida por vía recombinante, con modificaciones en los aminoácidos del extremo N-terminal. En este estudio se constató que en dependencia de los tipos de residuos de aminoácidos incorporados en el extremo N-terminal de la enzima, ocurrían variaciones en el tiempo de vida de estas proteínas en las células. Por lo que permitió establecer la importancia de los residuos del extremo N-terminal en la determinación de la estabilidad de las proteínas *in vivo* (Bachmair *et al.*, 1986).

Las proteínas PLD (Fontaine *et al.*, 2006; Moussa *et al.*, 2016b; Silva *et al.*, 2018, Leal *et al.*, 2018) y CP40 (Droppa-Almeida *et al.*, 2018) se han obtenido por vía recombinante en sistemas de expresión que utilizan *E. coli* como células hospederas, garantizando la integridad de las proteínas y elevados niveles de expresión. Sin embargo, hasta la fecha estas proteínas no se han obtenido empleado sistemas de expresión con células eucariotas. La experiencia más cercana a la obtención de PLD en células eucariotas corresponde al empleo de un plásmido con el gen *pld* mutado (boCTLA-4-HIg- $\Delta$ PLD) que ha sido utilizado como vacuna de ADN desnudo en la inmunización de ovinos (Chaplin *et al.*, 1999).

El índice de inestabilidad estimado para ambas proteínas fue inferior a 40, por debajo de ese valor, las proteínas se consideran estables, para ser utilizadas en estudios *in vitro* (Gamage *et al.*, 2019).

El índice alifático de una proteína se define como el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas de los aminoácidos alanina, valina, isoleucina y leucina. Estos valores indican la capacidad termoestable de las proteínas, siendo PLDr 2J-L y CP40r 2J-L proteínas que pueden resistir variaciones de temperatura (Gamage *et al.*, 2019). Un puntaje positivo creciente de GRAVY (Gran Promedio de Hidropatía) indica una mayor hidrofobicidad, no siendo el caso de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, que presentaron un valor negativo, lo que concuerda con los estudios que han clasificado a estas proteínas como hidrofílicas. Estas proteínas son secretadas al medio extracelular en los cultivos de *C. pseudotuberculosis*, siendo estables en medios hidrofílicos, lo cual está relacionado con su función biología y participación en los procesos de patogénesis (Hogdson *et al.*, 1994). Estas proteínas son solubles y se han obtenido del sobrenadante de cultivo de células de *E. coli*, facilitando los procesos de purificación.

#### **VIII.8-9. Predicción de la estructura de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L.**

La predicción de las estructuras secundarias y modelos 3D para ambas proteínas se realizó mediante la comparación con secuencias de proteínas de estructuras conocidas reportadas en la base de datos PDB (Berman *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2017). Las estructuras reportadas en PDB se han obtenido a través de difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) o por microscopía electrónica. Estas son técnicas complejas y costosa por lo que el número de estructuras reportadas en el PDB es escaso y aun deficiente en la representación de la mayoría de las proteínas (Markosian *et al.*, 2018). Hasta la fecha no existe ninguna estructura resuelta para PLD o CP40 de *C. pseudotuberculosis*.

##### **VIII.8-9.1 Predicción de la estructura de PLDr 2J-L**

La predicción del modelo de la estructura de PLDr 2J-L se resolvió tomando como referencia la plantilla de la estructura de la SMasa D del veneno de araña *Loxosceles laeta*. Esta enzima cataliza la hidrólisis ácido-base dependiente de Mg<sup>2+</sup> de la esfingomielina y es considerada la toxina responsable de la dermonecrosis y hemólisis dependiente del complemento, inducida por el veneno de araña (Correa *et al.*, 2016). La toxina PLD bacteriana y la SMasa D del veneno de araña poseen masas moleculares similares (31-35kDa) y comparten el dominio típico de glicerofosfodiéster

fosfodiesterasas (GDPD) (Cordes y Binford, 2006). El veneno de las arañas *Loxosceles spp.* presenta dos tipos de enzimas SMasa D, divididas en Clase I y Clase II en dependencia de su actividad bioquímica (Ullah *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2006). Las enzimas de clase I hidrolizan eficazmente los lípidos y han sido renombradas como PLD capaces de generar LPA y desencadenar cascadas de señalización en el organismo hospedero, incluida la agregación plaquetaria y la respuesta inflamatoria (Murakami *et al.*, 2006). Las enzimas de clase II exhiben actividad SMasa D, con capacidad disminuida hacia la degradación de los fosfolípidos. La resolución de las estructuras cristalinas de las enzimas SMasa D clase I y clase II de *Loxosceles spp.* permitió identificar diferencias en la hendidura catalítica, lo que explica la selectividad de estas enzimas por el tipo de sustrato (de Santi Ferrara *et al.*, 2009). La estructura de la PLDr 2J-L de *C. pseudotuberculosis* fue representada por la estructura de la SMasa D, Clase I, de *Loxosceles laeta* (Murakami *et al.*, 2006).

La estructura secundaria de la SMasa D del veneno de araña comienza con una topología de hoja  $\beta$ ; sin embargo, el programa predijo que PLDr 2J-L presenta una estructura de hélice- $\alpha$  en el extremo N-terminal. El análisis de la estructura secundaria de diferentes secuencias del extremo N-terminal de esfingomielinasas, ha establecido que la secuencia NRRPIWNLAHM que involucra el residuo H (12) de la SMasa D del veneno de araña (H44 de *C. pseudotuberculosis*), forma directamente la primera hoja  $\beta$  (Flores-Díaz *et al.*, 2016). Nuestro estudio moduló esta región NRPVYAIHR en PLDr de *C. pseudotuberculosis* 2J-L, como una estructura de hélice- $\alpha$ , la cual fue predicha por los programas Phyre2 y Bepipred 2.0. La secuencia en el extremo N-terminal se determinó sin plantilla, *ab initio*, con una región de desorden predominante, pero la secuencia que incluye el residuo H (44), se predijo en el rango de la zona roja con alta confianza, por lo que asumimos que esta es la estructura correcta para PLDr 2J-L. La secuencia con los residuos conservados E (64) - D (66) conforman una hoja  $\beta$  y el residuo H (78) corresponde al lazo 2, lo cual concuerda con las estructuras secundarias de otras SMasa D (Flores-Díaz *et al.*, 2016). El lazo catalítico de la SMasa D de *Loxosceles spp.* se estabiliza mediante un puente de disulfuro entre las cisteínas 51-57 (Murakami *et al.*, 2006; Flores-Díaz *et al.*, 2016). La proteína PLD no presenta residuos de cisteína cerca de la H (78), por lo que el lazo catalítico debe estabilizarse mediante otro mecanismo. Aunque existen dos residuos de cisteínas presentes en la posición C (119) y C (126) de PLDr 2J-L, no se ha reportado la formación de enlaces de disulfuro en esta posición. Los enlaces de disulfuro son importantes para la estabilidad y función de muchas proteínas secretadas, y un estudio reciente ha planteado la hipótesis de las posibles vías para la

formación de enlaces de disulfuros en bacterias Gram positivas, utilizando *C. diphtheriae* como modelo (Reardon-Robinson *et al.*, 2016). La secuencia de PLDr 2J-L en la posición 206 **INQGFGN** 212 es homóloga a la secuencia 196 **LSDGLTN** 200 de la SMasa D de *Loxosceles spp.*, la cual contribuyen a la formación de un lazo flexible (Murakami *et al.*, 2006). La estructura de barril TIM ( $\alpha\beta$ ) se identificó en PLDr 2J-L formada por 7 hojas  $\beta$  con una región de hélice- $\alpha$  consecutiva ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ). El lazo flexible se predijo entre las hélices  $\alpha 8$ -  $\alpha 9$ , y los residuos W (242) y T (246) se han asociado con la formación de enlaces de hidrógeno análogos a los formados en SMasa D de *Loxosceles spp.* (Murakami *et al.*, 2006). El efecto de los lazos en el ensamblaje de las proteínas se ha estudiado particularmente en las hélices de transmembrana (TM). Basado en la relación de flexibilidad del lazo se realizó el análisis de 41 proteínas, identificándose el 53% de los lazos como estirados, donde un lazo estirado limita la distancia entre las dos hélices conectadas. Cuando los lazos (en su mayoría estirados) se cortaron, eliminaron o reemplazaron mediante mutación, la estabilidad de las proteínas disminuyó en la mayoría de los casos evaluados. Además, se evidenció que los enlaces de hidrógenos entre hélices de TM consecutivas pueden potencialmente mantener juntas las hélices (Tastan *et al.*, 2009). Por esa razón suponemos que  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ , los lazos y los enlaces por puente de hidrogeno podrían ser importantes para la estabilidad de PLDr 2J-L. También se detectó en el extremo C-terminal de PLD la región cola-SMD, que contiene el motivo **ATXXDNPW**, altamente conservado en la mayoría de las secuencias de las esfingomielinasas. Estos residuos establecen un número significativo de contactos directamente con los residuos ubicados en las hojas  $\beta$  internas de la estructura del barril TIM, todos en el lado de la proteína opuesto al sitio catalítico. Se ha propuesto que la cola-SMD está involucrada en la estabilidad de la estructura, jugando un papel funcional o estructural importante. Además, podría considerarse como un sello distintivo en combinación con los residuos del sitio activo conservado, para la caracterización de estas enzimas (Flores-Díaz *et al.*, 2016).

*Streptomyces chromofuscus* secreta una fosfolipasa D de 57 kDa, con similitud significativa con respecto a la proteína PLD de *C. pseudotuberculosis*. Ambas enzimas secretadas exhiben actividades dependientes de cationes divalentes y funcionan como factores de virulencia que hidrolizan la esfingomielina presentes en las membranas plasmáticas de las células del organismo hospedero (Zambonelli *et al.*, 2003; Zambonelli y Roberts, 2005).

Las proteínas PLD de *Arcanobacterium haemolyticum* y *C. pseudotuberculosis* son únicas en sí mismas, sin dominios conservados entre si más allá de un tramo con baja homología con el dominio

de unión al sustrato de la glicero-3-fosfato deshidrogenasa (Cuevas *et al.*, 1993). A pesar de que PLD de *C. pseudotuberculosis* no es miembro de la superfamilia PLD, debido a la falta del motivo conservado HKD que caracteriza a esta superfamilia (Flores-Díaz *et al.*, 2016), diferentes estudios han utilizado la PLD recombinante de bacterias para analizar los efectos de la eliminación del motivo HKD. Los primeros estudios de obtención y caracterización de la PLD de *C. pseudotuberculosis* realizaron comparaciones con otras enzimas de la superfamilia PLD, donde se reveló cierta similitud con la Fosfolipasa A2 (Hogdson *et al.*, 1990). La fosfolipasa D2 de mamíferos (PLD2), es una enzima dual que lleva el intercambio de nucleótidos de guanina; así como, la actividad de lipasa. La estructura de esta proteína fue predicha utilizando el programa Phyre2, basados en el análisis del 71% de los residuos con una confianza superior al 90%. Estos resultados fueron considerados relevantes, con valores adecuados para la predicción de la estructura de esta proteína, que al igual que PLD de *C. pseudotuberculosis* no presenta estructuras en las bases de datos de proteínas (Mahankali *et al.*, 2015). Por lo que podemos afirmar que los valores alcanzados durante la predicción, aseguran el modelaje y la estimación de las estructuras secundarias de PLDr 2J-L.

#### VIII.8-9.2 Predicción de la estructura de CP40r 2J-L

La estructura de CP40 se modeló con una cobertura del 94% a partir de la plantilla del dominio f2 de Endo-beta-N-acetilglucosaminidasa de *Streptococcus pyogenes*, una proteína de 108 kDa con cinco dominios, uno con actividad endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa que hidroliza específicamente los glicanos de la IgG humana (Collin y Olsen, 2001). Existen depositadas en el PDB 49 estructuras resultas de proteínas de la familia GH18, entre las que se encuentran algunas endoglicosidasas bacterianas: Endo H [código de acceso PDB 1EDT], Endo F1 [2EBN], Endo F3 [1EOM], Endo BT [3POH] (Rao *et al.*, 1999) y Endo S [6E58] (Trastoy *et al.*, 2014). Análisis anteriores han indicado que las enzimas Endo S y CP40 presentan similitud en cuanto al sitio de escisión en los glicanos (Shadnezhad *et al.*, 2016).

La estructura de Endo S ha sido analizada basados en el contexto de la familia de endoglicosidasas GH18, identificando cómo esta enzima reconoce los anticuerpos IgG. La estructura del dominio GH18 se ha caracterizado como un barril TIM ( $\beta\alpha$ ) de ocho hebras con una hendidura pronunciada en el sitio activo (Rao *et al.*, 1999; Allhorn *et al.*, 2008). Los dominios de glicósido hidrolasa adoptan una topología ( $\beta/\alpha$ ), con una serie de lazos que definen la especificidad del sustrato (Van Roey *et al.*,

1994; Trastoy *et al.*, 2014). Cinco endoglicosidasas de orígenes diferentes fueron previamente comparadas con la enzima Endo S. En ese trabajo los autores establecieron las semejanzas, secuencias conservadas y las variaciones entre las estructuras de las endoglicosidasas (Stals *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos se utilizaron como modelo para analizar la estructura de la CP40r 2J-L. Ambas topologías de los extremos terminales de CP40r 2J-L fueron difíciles de determinar con alta confianza, pero la supuesta estructura de bobina en espiral (residuos 30-90) predicha en CP40r 2J-L en el extremo N-terminal como una región de desorden, ha sido identificada en el dominio endoglicosidasa de la Endo S de *Streptococcus pyogenes*, en los residuos 37-97, como secuencia involucrada en el aumento de la velocidad de hidrólisis de la enzima (Allhorn *et al.*, 2008). El extremo N-terminal se predijo como una región de alto desorden y propone que la estructura secundaria de CP40r 2J-L comienza con una hélice- $\alpha$  a diferencia de lo establecido para Endo F, Endo H, Endo T y Endo BT (Stals *et al.*, 2012). Se detectaron dos hojas  $\beta$  consecutivas ( $\beta$ 1- $\beta$ 2) en la zona de poca confianza en la predicción, sin embargo, la horquilla  $\beta$  (estructura formada por dos hojas  $\beta$  cortas) es una característica común en las proteínas de la familia GH18. Las principales variaciones entre diferentes endoglicosidasas se han encontrado en la longitud de los lazos ( $\beta/\alpha$ ) que forman la hendidura de unión al sustrato. El lazo  $\beta$ 3a3 es relativamente largo en todas las estructuras comparadas y se encuentran junto a los aminoácidos catalíticos, mostrando variación entre las cinco estructuras de endoglicosidasas que se han analizado en otros estudios (Stals *et al.*, 2012). El lazo  $\beta$ 4a4 y  $\beta$ 5a5 interactúa con el sustrato de la glicoproteína. El sitio activo de la familia GH18 contiene dos residuos D (187) – E (189) altamente conservados ubicados en la hoja  $\beta$ 5 de CP40r 2J-L, los cuales han sido identificados en el extremo de la hoja  $\beta$ 4 en la enzima Endo S. Los lazos que rodean el sitio activo en Endo S y Endo F3, presentan diferencias sustanciales que influyen en el tipo de sustratos (glicoproteína) que serán reconocidos e hidrolizados por las enzimas (Trastoy *et al.*, 2014). La proteína CP40 no es una endoquitinasa general, y su sitio activo tiene la capacidad de unir glicofomas biantenarias de IgG humana y ovina, pero no glicanos bisectantes (Shadnezhad *et al.*, 2016). Los residuos de triptófano en Endo S son importantes tanto para la especificidad del sustrato como para la actividad enzimática. Varios de estos residuos se encuentran en una disposición más expuesta a la superficie que rodea la hendidura del sitio activo (Allhorn *et al.*, 2008). Suponemos que para CP40r 2J-L los residuos de triptófano también desempeñen un rol importante en el posicionamiento del sustrato en el sitio activo, teniendo en cuenta que en estudios previos la

comparación de los cromatogramas (HPLC) de los glicanos liberados por la actividad de CP40 y Endo S, indicó que el sitio de escisión en los glicanos, en ambas enzimas es idéntico (Shadnezhad *et al.*, 2016). En todas las proteínas de la familia GH18, hay un residuo de tirosina conservado, que se identificó al comienzo del lazo  $\beta 7a8$  (Y262), y ha sido reportado en el lazo  $\beta 6a6$  en la posición 195 en Endo T. La estructura  $\beta 9\alpha 11$  se predijo con alta confianza y los 15 residuos finales se han identificado también en la estructura de otras endoglicosidasas bacterianas como Endo H, Endo F1 y Endo BT con 8, 15 y 25 aminoácidos respectivamente. Los residuos del extremo C-terminal forman un lazo que se ha estudiado en Endo F1 y Endo BT, el cual se extiende hacia el sitio activo a través de varios enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, manteniendo el lazo en una posición específica que confiere estabilidad a la estructura de la proteína (Stals *et al.*, 2012). Otros estudios han relacionado la secuencia de la proteína CP40 con la de Endo E (Shadnezhad *et al.*, 2016), endoglicosidasa de *Enterococcus faecalis*, que hidroliza los glicanos de la RNasa B humana (Garbe *et al.*, 2014).

El programa Phyre2 empleado en el modelaje de las proteínas se basa en la comparación de homología o el modelado comparativo, que utiliza como plantilla la estructura atómica de una proteína conocida. Es uno de los métodos más poderosos para predecir la estructura terciaria de las proteínas (Deng *et al.*, 2018). El método *ab initio* (de-novo) se basa en principios fisicoquímicos fundamentales, donde se estima para la proteína o secuencia que se esté analizando, la conformación que sea termodinámicamente y estereoquímicamente más favorables, asumiendo que la estructura nativa de la proteína siempre adopta una conformación que requiere un mínimo de energía. Usando este método, se modelaron las secuencias de ambas proteínas que no tenían estructuras de plantillas confiables informadas en la base de datos PDB. Incluso el diseño con *ab initio* se ha utilizado para crear pequeñas proteínas estables que sean viables como objetivos terapéuticos (Chevalier *et al.*, 2017). La confianza de los modelos predichos fue  $> 90\%$ , lo que significa que las proteínas adoptan el pliegue general mostrado y que el núcleo de la proteína está modelado con alta precisión. Las plantillas que aportan alta precisión tienen un rango de i.d entre un 30-40%, los resultados obtenidos emplearon plantillas entre el 20-30% considerados buenos modelos (Kelley *et al.*, 2015). Incluso con identidades de secuencia muy bajas ( $< 15\%$ ), los modelos pueden ser muy útiles siempre que la confianza sea alta. A pesar del alto porcentaje de homología encontrado en estructuras reportadas en comparación con las proteínas PLD y CP40, así como el uso de algoritmos modernos optimizados, el estudio debe continuar

para determinar experimentalmente las estructuras de PLD y CP40. El conocimiento de las estructuras 3D de las proteínas permite realizar otros estudios como el análisis de las vías de interacción de estas proteínas.

#### **VIII.10-11. Obtención de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L en células de *E. coli*.**

Existen números sistemas disponibles para la producción de proteínas heterólogas; sin embargo, el empleo de la bacteria *E. coli* junto a los plásmidos específicos para este hospedero, constituyen uno de los sistemas más eficientes en la obtención de proteínas recombinantes. Este sistema de expresión proporciona numerosas ventajas como: crecimiento rápido logrando una elevada densidad en medios de cultivos económicos, genética bien caracterizada, y disponibilidad de una gran variedad de plásmidos para los procesos de clonaje y expresión (Guevara-Hernández *et al.*, 2013; González y Fillat, 2018). En los últimos años el número de proteínas recombinantes utilizadas con fines farmacológicos ha aumentado drásticamente. Estas demandas impulsaron el desarrollo de una variedad de estrategias para lograr aumentar los niveles de expresión de proteínas en *E. coli*. La optimización de los plásmidos de expresión, los promotores (regulación de transcripción), sitios de inicio y terminación de la traducción, así como la modificación de las cepas de *E. coli* ha permitido mejorar la producción de las proteínas. El sistema de clonaje (*E. coli* DH5 $\alpha$  y el plásmido pGEM-T Easy) permitió la selección de las colonias transformadas (color blanco) mediante el empleo de un medio de cultivo selectivo LBK-IPTG-XGal.

Para la expresión de las proteínas se empleó el sistema *E. coli* BL21 (DE3) + plásmido pET28a. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) es ampliamente utilizada en el ámbito industrial debido a que carece de las proteasas Lon y Omp-t, lo cual reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante en la bacteria. También produce bajas cantidades de acetato, subproducto metabólico altamente indeseable en la producción de proteínas recombinantes. Esta cepa contiene el profago  $\lambda$ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG (Phue *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014). El sistema de expresión T7 se basa en el uso de la ARN polimerasa y el promotor del bacteriófago T7. Esta ARN es menos compleja, se compone por una sola subunidad y es capaz de realizar todo el proceso de transcripción, como su homóloga en organismos superiores. Los plásmidos pET presentan el sistema T7 acoplado y se han empleado para la obtención de proteínas con una elevada expresión y rendimiento. Se utilizó el plásmido pET28a el cual ofrece resistencia a la kanamicina y permite la incorporación de una cola de seis histidinas para el marcaje

de la proteína recombinante, lo que facilita los procesos de identificación y purificación de las proteínas heterólogas. Para expresar el gen de interés en este sistema es necesario una fuente de T7 ARN polimerasa en la célula hospedera, lo que se logra con el uso de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). La T7 ARN polimerasa no reconoce los promotores de *E. coli*, solo reconoce su promotor T7, el cual a su vez no es reconocido por las ARN polimerasas de la bacteria. Esta enzima es capaz de transcribir los genes cinco veces más rápido que la ARN polimerasa de *E. coli*. El gen que codifica la T7 ARN polimerasa presente en la cepa BL21 (DE3) está bajo el control del promotor lacUV5, por lo que su expresión es básicamente controlada por los mismos mecanismos del operón lactosa. El promotor Lac se reprime en presencia de glucosa y se induce en presencia de lactosa o su análogo isopropil-tiogalactosido (IPTG) el cual es muy eficiente y ampliamente utilizados a escala de laboratorio (Studier *et al.*, 1990; Angius *et al.*, 2018). El IPTG es un reactivo sumamente costoso, por lo que su uso no es rentable para el escalado en la producción de las proteínas. En este sentido el sistema empleado permite realizar la auto-inducción con lactosa. Se establece un crecimiento bifásico donde se suplementa el medio de cultivo con glucosa y lactosa, al agotarse la fuente de glucosa las células utilizan la lactosa, lo cual libera el represor del promotor lacUV5, facilitando la producción de la enzima T7 ARN. Esta enzima garantiza la transcripción del gen de interés que se encuentra insertado en el plásmido pET28a bajo el promotor T7 (Studier *et al.*, 2005). Con este mecanismo se logra una elevada densidad, con un manejo y manipulación del cultivo mínimo, ya que no es necesario controlar el crecimiento celular para la inducción de la expresión. Otros investigadores han empleado el plásmido pAE para la expresión de PLD en células de *E. coli* BL21 (DE3) y han llevado a cabo la purificación por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (Leal *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). También la proteína PLD recombinante se obtuvo a través del clonaje del gen *pld* sintético en el plásmido pET28a, transformado en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). La purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel inmovilizado (GE, Chicago, IL, EE. UU.) y la identificación de PLDr mediante Western blot (Perez-Heredia *et al.*, 2015). Por otra parte, la proteína CP40 ha sido obtenida por vía recombinante con el plásmido pBE12GEX2 utilizando *E. coli* XL1-Blue. En este estudio se expresó en un 15% de las proteínas totales y fue obtenida del sobrenadante del cultivo (Walker *et al.*, 1994). También se empleó el plásmido pAE y la cepa de *E. coli* BL21 para la expresión de CP40, purificando la proteína mediante cromatografía de afinidad (Silva *et al.*, 2014; Droppa-Almeida *et al.*, 2016). El diseño empleado para la obtención de las

proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, permitirá en estudios futuros la purificación mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos, debido a la presencia de una cola de histidina en el extremo N-terminal de las proteínas. Las proteínas obtenidas por vía recombinantes pueden ser empleadas en vacunas y medios diagnósticos, brindando una alternativa viable y fácil de escalar, con bajos costos de producción. El empleo de estas proteínas como antígenos para la elaboración de vacunas y medios diagnósticos garantiza que las formulaciones sean inocuas, con antígenos específicos y altamente puros (González y Fillat, 2018).

### **VIII.12 Caracterización *in silico* de las propiedades inmunogénicas de PLDr2J-L y CP40r2J-L:**

#### **VIII. 12.1 Epítomos de células B**

Los epítomos de células B son las regiones de un antígeno hacia las cuales se dirige la activación de las células B y la producción de anticuerpos específicos (Galanis *et al.*, 2019). La identificación de los posibles epítomos de células B en las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, permitió establecer el potencial de estas proteínas para la activación del sistema inmune. Los epítomos de células B se clasifican en: epítomos lineales (continuos) conformados por residuos de aminoácidos consecutivos en la secuencia de la proteína y epítomos conformacionales (discontinuos) conformados por residuos que se ubican en segmentos distantes, pero que quedan cercanos debido al plegamiento de la proteína y en una disposición espacial favorable para ser reconocidos por las células B. Aproximadamente el 90% de los epítomos de células B son conformacionales y solo el 10% son lineales. Se ha demostrado que muchos epítomos discontinuos contienen varios grupos de residuos continuos considerados epítomos lineales de la proteína (Sivalingam y Shepherd, 2012; Galanis *et al.*, 2019). El mapeo de epítomos puede llevarse a cabo utilizando técnicas experimentales; sin embargo, estas requieren tiempo, implican procesos lentos y costosos, por lo que los estudios *in silico* surgen como una alternativa para la estimación de los epítomos mediante el empleo de técnicas bioinformáticas (Abbott *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017). En las últimas décadas se han implementado varios métodos computacionales para predecir epítomos de células B conformacionales o lineales (Soria-Guerra *et al.*, 2015; Galanis *et al.*, 2019). El software Bepipred 2.0 fue empleado para identificar epítomos lineales de linfocitos B, conformados por las secuencias que con mayor probabilidad se unen a los anticuerpos (Jespersen *et al.*, 2017). Las herramientas de la página IEDB se emplearon para la identificación de epítomos de linfocitos B, en base a su exposición a la superficie y a su capacidad antigénica (Fleri *et al.*, 2017; Dhanda *et al.*, 2019).

El programa ElliPro permitió estimar los posibles epítomos lineales y discontinuos de células B basado en la estructura terciaria de las proteínas (Ponomarenko *et al.*, 2008; Mukonyora *et al.*, 2015). PLDr 2J-L y CP40r 2J-L son proteínas multi-epitópicas con potencial como candidatos para el desarrollo de vacunas y medios diagnósticos para la Linfadenitis caseosa. Varios de los epítomos predichos para PLDr 2J-L y CP40r-2J-L se clasificaron como epítomos expuestos, ubicados en la superficie de las proteínas respectivas. Estas regiones pueden usarse como péptidos sintéticos para estimular una respuesta de anticuerpos, asegurando una mejor visualización del sistema inmune hacia estas proteínas durante una infección natural. La presencia de epítomos para el reconocimiento de anticuerpos es una evidencia del potencial de estas proteínas para el diseño de una vacuna. Algunas de las secuencias se identificaron como epítomos antigénicos y de unión a anticuerpos, todos con una elevada conservación, predichos por los diferentes programas empleados. Casi toda la secuencia completa de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se representaron e incluyeron como epítomos con potencial para la activación de células B, lo que demuestra su potencial inmunogénico. La mayor parte del conjunto completo de epítomos lineales predichos se incluyeron en algún epítomo conformacional, los cuales podrán ser empleados como base para realizar estudios de interacción proteína-proteína basados en la estructura tridimensional (Yao *et al.*, 2013). Encontramos que los epítomos en la posición (51-100) de PLDr 2J-L, predichos por Bepipred 2.0 y ElliPro, incluyen una secuencia altamente conservada del lazo catalítico, formando parte de un epítomo conformacional. Estos epítomos son conservados por la PLD de las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* de origen mexicano. Las proteínas PLD y CP40 se han evaluado en ensayos experimentales que demuestran su capacidad para inducir un aumento en la respuesta inmune humoral y celular (Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta la fecha no se había realizado un mapeo de epítomos comparando los resultados obtenidos por predictores con diferentes criterios de selección como: propiedades físico-químicas, exposición de epítomos en la superficie, propiedades antigénicas y estructura tridimensional. Resumimos las secuencias superpuestas que fueron predichas por diferentes criterios y fueron incluidas como epítomos por más de dos predictores. Los resultados aportan detalles de las secuencias y regiones de las proteínas que con mayor probabilidad pueden ser responsables de la activación de la respuesta de anticuerpos. El potencial inmunológico de CP40 ha sido estudiado previamente *in silico*, con la descripción de seis epítomos inmunodominantes y áreas hidrofóbicas de la proteína que podrían interactuar con el receptor Toll-like 2 (Shadnezhad *et al.*, 2016). Detectamos estas secuencias en CP40r

2J-L, lo que proporciona evidencia de la capacidad de esta proteína para unirse a TLR2. Los receptores toll-like (TLR) están implicados en la respuesta innata y adaptativa del sistema inmune (Kang *et al.*, 2009). Por primera vez presentamos un análisis detallado de los epítomos de células B de las proteínas PLD y CP40 en cepas mexicanas. Los epítomos de células B se conservaron en un 100% en las proteínas de las cepas de origen mexicano, lo que indica el potencial de estos epítomos para tener una reacción cruzada (Vojtek *et al.*, 2019). Estas secuencias podrían ser las responsables de la capacidad de estas proteínas para activar la respuesta de las células B y deben ser consideradas para el desarrollo de una vacuna peptídica.

### VIII. 12.2 Epítomos de células T

La vida intracelular de *C. pseudotuberculosis*, le confiere la posibilidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos, por lo que la inducción de una respuesta inmune celular es crucial para lograr una vacuna efectiva que genere protección completa (Stefanka *et al.*, 2010; Valdivia *et al.*, 2015). La respuesta de células T CD8<sup>+</sup> es la responsable de la eliminación de los patógenos intracelulares, por lo que se han intensificado los estudios para entender como modular este tipo de respuesta inmune celular (Martin y Badovinac, 2018). Para estimular este tipo de respuesta es necesario emplear antígenos con epítomos de células T. Los epítomos T son regiones con capacidad de ser reconocidas por el correspondiente receptor presente en las células T. Estos epítomos están formados por secuencias lineales que requieren de un procesamiento molecular para ser presentados y reconocidos por las células T (Abbas *et al.*, 2018b). Las células APC (por sus siglas en inglés, *Antigen- Presenting Cells*) son las encargadas de procesar y presentar los antígenos en el contexto de los receptores MHC clase I (activación de células T CD8<sup>+</sup>) y clase II (para la activación de las células TCD4<sup>+</sup>) (Abbas *et al.*, 2018b). La identificación de los epítomos de células T presentes en las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, se centró en la presentación de antígenos en el contexto del MHCI, para estimar la capacidad de activación de las células T CD8<sup>+</sup>. Para el desarrollo de una vacuna eficiente se requiere seleccionar antígenos que maximicen la cobertura de protección en la población diana, la cual presenta una frecuencia de alelos globales que contienen los genes del MHC. La evaluación se realizó teniendo en cuenta las variantes de alelos que contienen los genes para la expresión del MHC clase I del modelo murino. La base de datos IEDB cuenta con un amplio repertorio de datos experimentales sobre epítomos de unión a anticuerpos y células T estudiados en humanos, primates no humanos y otras especies

animales, en el contexto de enfermedades infecciosas, alergias, autoinmunidad y trasplantes; sin embargo, aún no cuenta con datos de los alelos del MHC de ovinos o caprinos (Singh *et al.*, 2010; Fleri *et al.*, 2017; Dhanda *et al.*, 2019). Los genes que codifican para el MHC en ovinos se encuentran localizados en el cromosoma 20, inicialmente denominados OLA en función de la nomenclatura HLA para humanos, pero luego se ha establecido de manera no oficial el nombre de Ovar-MHC. En las ovejas la región de clase I está poco caracterizada y diferentes estudios han propuesto que existen cuatro loci: OLA-A, B, C y D (Dukkipati *et al.*, 2006). Los genes del Ovar clase I son más similares a los genes de clase I bovinos que a los murinos (Dukkipati *et al.*, 2006); sin embargo, la base de datos IEDB tampoco contiene información sobre los alelos bovinos, por lo que empleamos los datos de alelos murinos. El heterodímero de clase I en ovinos comprende una cadena  $\alpha$  pesada de 44 kDa y una microglobina  $\beta$  más pequeña de 12 kDa. Al igual que las moléculas del MHC de clase I de otras especies, se encontró que las de ovino están distribuidas en los linfocitos y tejidos no linfoides (Dukkipati *et al.*, 2006, Subramaniam *et al.*, 2015). El alto grado de polimorfismo de los genes que codifican al MHC impacta en la respuesta inmune individual durante la vacunación, por tal razón se evaluaron diferentes alelos en la presentación de los epítomos de células T. Los resultados obtenidos muestran un número de péptidos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L con capacidad de ser presentados por el MHC I de los alelos H-2-Kb, H-2-KK, H-2-Kd, H-2-Db, H-2-Qa1 del modelo murino. También se identificaron secuencias con capacidad de ser presentadas por más de un tipo de alelo MHCI, los cuales amplían la cobertura poblacional, condición importante en el diseño de vacunas de subunidades. La inclusión de estos epítomos en una formulación vacunal pudiera producir una adecuada estimulación de la respuesta inmune específica, aunque debe tomarse en consideración que estos resultados fueron obtenidos para un modelo murino. El modelo murino ha sido empleado en la evaluación de candidatos vacunales experimentales para LAC, con resultados extrapolables a ovinos y caprinos (Silva *et al.*, 2018; Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen antígenos presentados por el MHC clase I, receptor que se encuentra en todas las células nucleadas. Las células CTL efectoras presentan la habilidad de reconocer y eliminar células infectadas con el patógeno, constituyendo un componente importante de la inmunidad protectora. Sin embargo, se ha comprobado que durante las infecciones crónicas las células T pueden padecer de un deterioro funcional, siendo una de las principales razones de la incapacidad del hospedero para eliminar el patógeno persistente. Las células T que se generan durante

las primeras etapas de la infección gradualmente pierden la función durante el curso de la infección crónica. Este fenómeno de producción de linfocitos T exhaustos ha sido caracterizado en ratones y humanos con infecciones crónicas establecidas por agentes virales (Letvin *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2005). Por tales motivos, es fundamental lograr la activación de células T de memoria. A pesar de existir algunas similitudes a nivel molecular, epigenético, metabólico y funcional entre las células T CD8<sup>+</sup> efectoras y las TCD8<sup>+</sup> de memoria, éstas últimas persisten por largos periodos de tiempo y son capaces de proliferar posterior al re-encuentro con el antígeno (Martin y Badovinac, 2018). Los resultados alcanzados en este trabajo corresponden a la predicción de epítomos con capacidad de activar la población global de células T CD8<sup>+</sup>, por lo que se requerirá estudios experimentales que permitan evaluar específicamente el subconjunto de células T CD8<sup>+</sup> de memoria. Existen diferentes marcadores moleculares que son indicativos de una proliferación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria como: la presencia de receptores CD62Llo / CCR7lo para células T efectoras de memoria (Tem) y los receptores CD62Lhi / CCR7hi para células T de memoria central (Tcm). La expresión de CCR7 y CD62L en células Tcm facilita la localización de estas células en los órganos linfoides secundarios, mientras que las células Tem son más citolíticas, expresan integrinas y quimiocinas, receptores necesarios para la localización en tejidos periféricos inflamados (Martin y Badovinac, 2018). Por otra parte, un aumento en la expresión de citocinas de tipo IL-2, IL-7, IL-12 e IL-15 favorece el mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria (Melchionda *et al.*, 2005; Raeber *et al.*, 2018). La citocina IL-12 puede desencadenar mecanismos relacionados con la proliferación celular, producción de IFN- $\gamma$  y el cambio a Th1 que se requiere para prevenir la diseminación de patógenos intracelulares (Fortune *et al.*, 2004). Existen evidencias experimentales que indican que las formulaciones con la proteína CP40 obtenida por vía recombinante, fueron más eficientes en la protección asociada a una respuesta celular Th1, en ausencia de un perfil Th2 (Silva *et al.*, 2014). La identificación de un aumento significativo en los niveles del isotipo IgG2, se encuentra relacionado con una respuesta celular de Th1, células involucradas principalmente en la inmunidad contra patógenos intracelulares, activación de macrófagos y células T citotóxicas, producción de opsonización y activación del complemento (Droppa-Almeida *et al.*, 2016). El papel del TLR2 en la homeostasis de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, está relacionado con el control directamente de la proliferación de estas células y la secreción de IFN- $\gamma$ . Un estudio demostró la participación del TLR2 en la activación de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, durante una infección viral crónica establecida en un modelo murino, provocando un aumento en la proliferación y expansión de

estas células, inducida por IL-7 tanto *in vitro* como *in vivo*. También se evidenció que los ligandos de TLR2 actúan en sinergia con IL-2 para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  *in vitro*, citocina que aumenta la expresión de las moléculas de MHC clase I y regula la diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (Sercan *et al.*, 2010). Otro estudio comprobó que el TLR2 aumenta la activación de las células T CD8<sup>+</sup> y permite la generación de células de memoria funcionales en respuesta a señales bajas o ineficientes del TCR (Mercier *et al.*, 2009). En conjunto, estos datos apoyan la idea de que las secuencias de CP40r 2J-L que inducen la señalización de TLR2, podría contribuir directamente al mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria (Cottalorda *et al.*, 2009),

Las células T CD4<sup>+</sup> activan otras células del sistema inmune como las células B, las T CD8<sup>+</sup> y los macrófagos. Aunque estas células CD4<sup>+</sup> se han relacionado con el reconocimiento de antígenos del ambiente extracelular, es importante continuar con la caracterización de los epítomos de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, para establecer las secuencias que podrán ser presentadas en el contexto del MHC II, para la activación de las células T CD4<sup>+</sup>. En condiciones de infección crónica, en las que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tardan varios meses o más en eliminar la infección, las células T CD4<sup>+</sup> juegan un papel importante para el mantenimiento de la actividad de las células T CD8<sup>+</sup> (Matloubian *et al.*, 1994). Estudios experimentales han considerado como relevante la inducción de una respuesta Th1 (células T CD4<sup>+</sup>) para la activación de las células T CD8<sup>+</sup> en el contexto del MHC I con lo que se lograría una respuesta eficiente contra este patógeno (Silva *et al.*, 2014; Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Leal *et al.*, 2018).

### VIII. 12.3 Potencialidades de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como candidatos vacunales.

La capacidad de PLDr 2J-L y CP40r 2J-L como inmunógenos fue evaluada mediante el programa VaxiJen, clasificando ambas proteínas como antígenos probables en base a sus propiedades fisicoquímicas. A pesar de que PLD es una de las proteínas más utilizadas como antígeno en las formulaciones vacunales, debido a su demostrado potencial para estimular la respuesta inmune humorales y celulares, fue clasificada con un valor por debajo de la puntuación recomendado (0.5) por otras herramientas de predicción (Zaharieva *et al.*, 2017), resultado que concuerda con lo obtenido por otros autores (Pacheco *et al.*, 2011 Santos *et al.*, 2012). También se evaluó la secuencia completa de la proteína CP40r 2J-L, clasificada como antígeno probable (0.569) para el diseño de una vacuna. De esta proteína solo se había evaluado por VaxiJen el potencial de diferentes péptidos, donde los resultados

estuvieron en un rango de valores de 0.5 a 1.5, todos clasificados como antígenos probables (Droppa-Almeida *et al.*, 2018). VaxiJen fue uno de los primeros servidores de predicción independiente de alineación, empleados para evaluar antígenos protectores de bacterias y otros organismos (Doytchinova y Flower, 2007). Esta herramienta todavía es utilizada y recomendada para la evaluación de antígenos, pero debemos de considerar que los resultados son predictivos y que no siempre se acercan a los resultados alcanzados en condiciones experimentales, como es el caso de PLD. Por tal motivo, es importante combinar diferentes estrategias de caracterización *in silico* para obtener resultados confiables. VaxiJen se ha utilizado como herramienta para el reconocimiento de diferentes posibles candidatos en el desarrollo de una vacuna para LAC. Se han evaluado proteínas como Pili adhesiva SpaC (0.6912), Superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc SodC (0.7663), Neuraminidasa extracelular NanH (0.6967) y Proteína quinasa G PknG (0.3686 = antígeno no probable) de la cepa FRC41 aislada de un paciente de 12 años, con Linfadenitis necrotizante (Santana *et al.*, 2016). Otro estudio evaluó las proteínas: CopC (0.85) de resistencia al cobre, la Metalofosfoesterasa YkuE = (0.40), la NADH deshidrogenasa NADH = (0.48), la proteína sensor histidina quinasa MtrB = (0.54), la proteína de unión a penicilina 3 FtsI = (0.64), la histidina quinasa de transducción de señales SenX3 = (0.61), todas mediante el empleo de VaxiJen, en la búsqueda de posibles candidatos vacunales (Soares *et al.*, 2013). El programa Vaxign fue incluido dentro del protocolo de clasificación de las proteínas, siendo ambas clasificadas como proteínas antigénicas, con función de adhesión y un dominio de transmembrana. Las secuencias de transmembrana son importantes debido a que son regiones en contacto con el medio externo más expuestas a las defensas del organismo (Craney *et al.*, 2011). Sin embargo, mediante el análisis de la estructura de ambas proteínas con el programa Phyre2 no fueron detectadas regiones de transmembrana. Por otra parte, los ensayos experimentales han detectado que CP40 y PLD se encuentran en el repertorio de proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* (Hogdson *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995). Algunos estudios *in silico* han permitido explorar el pan-exoproteoma completo de cinco genomas de *C. pseudotuberculosis*, donde *pld* y otros genes de proteínas exportadas fueron listados como posibles candidatos a vacuna (Pacheco *et al.*, 2011). El análisis comparativo del exoproteoma (conjunto completo de proteínas liberadas por las bacterias al medio extracelular) de la cepa 231 (aislada de oveja) y 1002 (aislada de cabra) mostró que se podía predecir que más del 75% (70/93) de las proteínas identificadas contenían señales para la exportación activa. También se predijo que la mayoría de las proteínas identificadas en este estudio

tendrían una probable localización extracitoplásmica después del análisis de secuencias con diferentes herramientas bioinformáticas. En este estudio PLD y CP40 se identificaron exclusivamente en el exoproteoma de la cepa C231 (Pacheco *et al.*, 2011). Otros análisis han demostrado que la regulación de la expresión de PLD se ve afectada por múltiples factores ambientales. Por tal razón se aplicaron diferentes cambios en las condiciones de cultivo para la cepa 1002 y aun así no se logró la detección de la secreción de PLD. En consecuencia con estos resultados, la cepa 1002 presentó un estado de virulencia bajo y la administración a cabras no provocó la formación de lesiones (Ribeiro *et al.*, 1991). Sin embargo, otros estudios *in silico* han caracterizado a PLD como proteína secretada o citoplasmática (Santos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2019). El estudio del proteoma de las cepas 1002 y C231 permitió identificar diecisiete proteínas de manera diferencial, 9 y 8 en cada cepa, con diversas funciones biológicas, como de envoltura celular, metabolismo respiratorio y proteólisis. Este análisis proteómico reveló exoproteínas específicas de la cepa, aunque cada uno de los genes correspondientes se encontró en ambas genomas de la cepa. Este patrón de expresión diferencial puede reflejar las diferencias entre las cepas en la adaptación a un hospedero específico, en la patogenicidad y/o en la antigenicidad de esta bacteria patógena (Silva *et al.*, 2013). La cepa 258 de biovar *equi* se comparó con otras dos cepas de biovar *ovis* en busca de regiones del genoma con plasticidad, donde se encontró una participación del gen *pld* entre ambos biovars (Soares *et al.*, 2013).

La Linfadenitis caseosa sigue siendo una enfermedad con impacto negativo en la economía de los productores de pequeños rumiantes en México y a nivel mundial. Los análisis bioinformáticos agregan valor a los estudios de vacunología en la búsqueda de nuevos candidatos para el desarrollo de vacunas. Los resultados alcanzados en este trabajo muestran evidencias de la capacidad inmunogénica de las proteínas PLD y CP40 obtenidas por vía recombinante a partir de un aislado de origen mexicano. El potencial de PLD y CP40 ciertamente se ha demostrado en diferentes modelos animales, pero ninguno de los ensayos ha evaluado ambas proteínas en una misma formulación. Por lo que teniendo en cuenta la caracterización genética, estructural e inmunogénica establecida en este trabajo para las proteínas PLD y CP40 del aislado 2J-L, consideramos que ambas moléculas constituyen candidatos para el desarrollo de una vacuna y medios diagnósticos.

## IX. CONCLUSIONES

1. Los genes *pld* y *cp40* se amplificaron mediante PCR y se clonaron en los plásmidos pGEM-T Easy y pET28a para la expresión de las proteínas en *E. coli*.
2. La secuencia del gen *pld* de *C. pseudotuberculosis* del aislado de origen mexicano (2J-L) presentó una identidad a nivel de nucleótidos de un 99.91% con respecto a las cepas MEX25, MEX29 y 99.81% con MEX1, MEX2 y MEX9.
3. La secuencia del gen *cp40* de *C. pseudotuberculosis* del aislado de origen mexicano (2J-L) presentó una identidad a nivel de nucleótidos de un 100% con respecto a la cepa MEX29, mientras que un 99.91% con respecto a MEX1, MEX2, MEX9 y MEX25.
4. El análisis filogenético basado en la secuencia de los genes *pld* y *cp40* permitió establecer que *C. pseudotuberculosis* aislado de origen mexicano (2J-L), se encuentra más relacionado a la cepa de origen mexicano MEX29.
5. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos, permitió identificar a la proteína PLDr 2J-L con un 100% de identidad con respecto a las proteínas de las cepas de origen mexicano incluidas en el estudio.
6. La proteína CP40r 2J-L presentó un 100% de similitud de secuencia con CP40 de las cepas MEX1, MEX2, MEX9 y MEX29, mientras que un 99% con respecto a MEX25, la cual presenta una Leucina en vez de Valina en la posición 247.
7. La predicción *in silico* de la composición y estructura de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L, permitió identificar en ambas proteínas las características esperadas y se generaron archivos en formato PDB.
8. Las proteínas recombinantes PLDr 2J-L y CP40r 2J-L se obtuvieron en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET28a-*pld* y pET28a-*cp40*, luego de 5 horas post-inducción con IPTG 1mM.
9. La identificación de epítomos lineales y discontinuos de células B en ambas proteínas, mediante el empleo de diferentes predictores, permitió establecer las regiones con mayor predisposición a ser reconocidas como epítomos B.
10. La predicción de epítomos de células T en el contexto del MHC clase I, se realizó para ambas proteínas y permitió establecer los epítomos que son presentados por diferentes alelos del MHCI.

11. Todos los epítomos identificados fueron conservados en un 100%, por las proteínas PLD y CP40 de las cepas de origen mexicano MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29.
12. El programa Vaxign identificó ambas proteínas con función de adhesión, aunque no fue capaz de establecer la localización celular.
13. Las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L constituyen antígenos inmunogénicos probable según el programa VaxiJen.
14. Los resultados obtenidos permitieron corroborar la hipótesis planteada, siendo las proteínas recombinantes PLD y CP40 antígenos con potencial inmunogénico, candidatos para el desarrollo de vacunas y medios diagnósticos para la Linfadenitis Caseosa.

## **X. RECOMENDACIONES**

1. Purificar las proteínas recombinantes mediante Cromatografía de afinidad a quelatos metálico.
2. Secuenciar las proteínas recombinantes mediante Espectrometría de masas.
3. Realizar estudios de inmunogenicidad en ratones BALB/c inoculados con diferentes concentraciones de las proteínas recombinantes.
4. Evaluar en los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes, los niveles de anticuerpos IgG y las citocinas IFN- $\gamma$ , IL12 e IL7, mediante ensayos tipo ELISA.
5. Evaluar los niveles de células T en los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes mediante Citometría de flujo.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbas**, A.K., Lichtman, A.H., y Pillai, S. (2018a). Capítulo 3: Circulación y Migración de leucocitos a los tejidos. *Inmunología celular y molecular*. España: Elsevier.
2. **Abbas**, A.K., Lichtman, A.H., y Pillai, S. (2018b). Capítulo 6: Presentación del antígeno a los linfocitos T y funciones de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. *Inmunología celular y molecular*. España: Elsevier.
3. **Abbott**, W.M., Damschroder, M.M., y Lowe, D.C. (2014). Current approaches to fine mapping of antigen–antibody interactions. *Immunology*, 142, 526–535.
4. **Adderson**, E.E., Boudreaux, J.W., Cummings, J.R., Pounds, S., Wilson, D.A., Procop, G.W., y Hayden, R.T. (2008). Identification of clinical Coryneform bacterial Isolates: Comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. *J of Clin microbiol*, 46(3), 921–927.
5. **Aleman**, M., y Spier, S.J. (2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Large Animal Internal Medicine*, 3, 1078-1084.
6. **Al-Gaabary**, M.H., Osman, S.A., y Oreiby, A.F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Rumin Res*, 87,116–121.
7. **Allhorn**, M., OlseÂn, A., y Collin, M. (2008). EndoS from *Streptococcus pyogenes* is hydrolyzed by the cysteine proteinase SpeB and requires glutamic acid 235 and tryptophans for IgG glycan-hydrolyzing activity. *BMC Microbiol*, 8, 3.
8. **Almeida**, S., Dorneles, E., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., Carneiro A., y otros. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Vet Res*, 13, 290.
9. **Alvarez**, L., William, A., Castro I., Valenzuela, F., y Estevao, S. (2017). Capacidad de supervivencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* en distintos suelos de la provincia de Chubut, Patagonia argentina. *Rev Argent Microbiol*, 49(1), 105-109.
10. **Angius**, F., Ilioaia, O., Amrani, A., Suisse, A., Rosset, L., Legrand, A., Miroux, B., y otros. (2018). A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Scien Reports*, 8(1).
11. **Araújo**, C.L., Alvesa, J., Nogueira, W., Pereira, L.C., Gomide, A.C., Ramosa, R., Azevedo, V., y otros. (2019). Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene*, 702, 36–45.
12. **Archler-Bauer**, A. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*, 45(D), 200-203.
13. **Arteaga**, C.J. (2008). Situación actual de la ovinocultura en México. En: Cavallotti Vázquez, B.A., Marcof Álvarez, C.F., y Ramírez Valverde, B. AMCO II Foro de rentabilidad ovina. Boca del Rio, Veracruz, México.
14. **Bachmair**, A., Finley, D., y Varshavsky A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234 (4773), 179-186.
15. **Baird**, G.J., y Fontaine, M.C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J Comp Pathol*, 137(4), 179-210.
16. **Barral**, T.D., Barros, R.M., Krishnaswamy, R., Santos, A.J., Loureiro, D., Sokolonski, A.R., Azevedo, V., y otros. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microb Biotechnol*, 1–11.

17. **Barber**, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., y otros. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439, 682-687.
18. **Barrientos**, P.J.S., García, G.D.A., Cuellar, O.J.A., y Garcia, V.S. (1996). Distribución de lesiones de linfadenitis caseosa en ovinos. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Brasil, 495, 252.
19. **Bastos**, B.L., Dias, P.R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., y Seyffert, N. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic*, 4, 1-15.
20. **Batey**, R.G. (1986). Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. *Vet Microbiol*, 11, 145-152.
21. **Behrendt**, K., y Weeks, P. (2019) How are global and Australian sheepmeat producers performing? MLA Market Information Report 2019. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/331464399>. Acceso marzo 2020.
22. **Berman**, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., y Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242.
23. **Bernard**, K. (2012). The Genus *Corynebacterium* and Other Coryneform-Like Bacteria. Medically Relevant. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3152–3158.
24. **Bernard**, K.A., y Funke, G. (2012). Genus *Corynebacterium*. En: Whitman, W.B. (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp.245–289). New York, USA: Springer.
25. **Betts**, M.J., y Russell, R.B. (2003). Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*. En: Barnes, M.R., Gray, I.C. John Wiley & Sons.
26. **Billington**, S.J., Esmay, P.A., Songer, J., Jost, B., Hoppert, M., y Liebl, W. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 208(1), 41–5.
27. **Bobadilla-Soto**, E.E., Flores-Padilla, J.P., y Perea-Peña, M. (2017). Comercio exterior del sector ovino mexicano antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte. *Economía y Sociedad*, 21(37), 35-49.
28. **Borham**, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., y Al-Gaabary, M. (2017). Caseous Lymphadenitis in Sudanese and Somalian camels imported for meat consumption in Egypt. *AJVS*, 55(2), 52-59.
29. **Brum**, A.A., Silva, A.F.R., Silvestre, F.B., Collares, T., Begnine, K., Kommling, F., Veiras, T., y otros. (2017). *J Med Microbiol*, 66, 635–642.
30. **Burkovski**, A. (2013). Cell Envelope of *Corynebacteria*: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiol*, 935736, 11.
31. **Burkovski**, A. (2018). The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(5), 717-725.
32. **Bush**, R.D., Barnett, R., Links, I., y Windsor, P.A. (2012). Using abattoir surveillance and producer surveys to investigate the prevalence and current preventativemanagement of Caseous lymphadenitis in Merino flocks in Australia. *An. Prod.Sci*, 52, 675–679.
33. **Carrillo**, G., Ortega, S., y Hernandez, S. (2005). Prevalencia de Linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la Comarca Lagunera de Durango. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 4, 51-56.

34. **Caruso**, I.P., Panwalka, V., Coronado, M.A., Dingley, A.J., Cornélio, M.L., Willbold, D., Arni, R.K. y otros. (2018). Structure and interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cold shock protein A with Y-box single-stranded DNA fragment. *The FEBS J*, 285 (2), 372-390.
35. **Cetinkaya**, B., Karahana, M., Atila, E., Kalina, R., De Baereb, T., y Vaneechoutte, M (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol*, 88, 75–83.
36. **Cerdeira**, L.T., Pinto, A.C., Schneider, M.P.C., Silva de Almeida, S., dos Santos, A.R., Vieira, E. G. B., Ali, A., y otros. (2011). Whole-Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* PAT10 Strain Isolated from Sheep in Patagonia, Argentina. *J Bacteriol*, 193(22), 6420–6421.
37. **Chaplin**, P.J., De Rose, R., Boyle, J.S., McWaters, P., Kelly, J., Tennent, J.M., Lew, A.M., Scheerlinck, J.P.Y. (1999). Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, *Infect Immun*, 67, 6434–6438.
38. **Chevalier**, A., Silva, D.A., Rocklin, G.J., Hicks, D.R., Vergara, R., Murapa, P., Bernard, S.M., y otros. (2017). Massively parallel *de novo* protein design for targeted therapeutics. *Nature*, 550(7674), 74–79.
39. **Chirino-Zarraga**, C., Scamelli, A., y Rey-Valerion, C. (2005). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Rumin Res*, 65,170-175.
40. **Christensen**, H., Hickman, M., Edmunds, W. J., y Trotter, C. L. (2013). Introducing vaccination against serogroup B meningococcal disease: An economic and mathematical modelling study of potential impact. *Vaccine*, 31(23), 2638–2646.
41. **Collin**, M., y Olsen, A. (2001). EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *Embo J*, 20, 3046–3055.
42. **Colom-Cadena**, A., Velarde, R., Salinas, J., Borge, C., Garca-Bocanegra, I., Serrano, E., Gass, D., Bach, E., y otros. (2014). Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 83.
43. **Comalada**, M. (2002). Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona. España.
44. **Connor**, K.M., Quirie, M.M., Baird, G., y Donachie, W. (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 38, 2633–2637.
45. **Connor**, K.M., Fontaine, M., Rudge, K., Baird, G., y Donachie, W. (2007). Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Research*, 38 (4), 613-623.
46. **Cordes**, M.H.J. y Binford, G.J. (2006). Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. *Bioinformatics*, 22, 264–268.
47. **Correa**, M.A., Okamoto, C.K., Gonçalves-de- Andrade, R.M., van den Berg, C.W., y Tambourgi, D.V. (2016). Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* Venom Induces the Expression of MMP7 in Human Keratinocytes: Contribution to Dermonecrosis. *PLoS ONE*, 11(4), e0153090.
48. **Correa**, J.I., Stocker, A., Castro, S.T., Vale, V., Brito, T, Bastos, B., y otros. (2018). In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Expr*, 8, 89.
49. **Cordes**, M.H.J. y Binford, G.J. (2006). Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. *Bioinformatics*, 22, 264–268.

50. **Costa, P. M., McCulloch, J. A., Almeida, S.S, Dorella, F. A., Fonseca, C.T., Oliveira, D.M., Teixeira, M.F.S., y otros.** (2011). Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. *BMC Res Notes*, 4, 243.
51. **Cottalorda, A., Mercier, B.C., Mbitikon-Kobo, F.M. y otros.** (2009). TLR2 engagement on memory CD8 (+) T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN-gamma secretion in the absence of Ag. *Eur J Immunol*, 39(10), 2673-2681.
52. **Cuevas, W.A., y Songer, J.G.** (1993). *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Infect Immun*, 61(10), 4310-4316.
53. **Dalsass, M., Brozzi, A., Medini, D., y Rappuoli, R.** (2019). Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery. *Front Immunol*, 10, 113.
54. **Debien, E., Hélie, P., Buczinski, S., Leboeuf, A., Bélanger, D., y Drolet, R.** (2013). Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 goat herds in Quebec, with a special focus on caseous lymphadenitis. *Can Vet J*, 54, 581–587.
55. **de Farias, A.E.M., Alves, J.R.A, Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Faccioli, M.P.Y., Lima, A.M.C., y otros.** (2019). Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 51(4), 745-752.
56. **Delgado, D.A., Zárraga, J., Chirino-Zárraga, C.I., y Carrero-Portillo, L.L.** (2015). Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Rev Med Vet*, 31, 35-45.
57. **Deng, H., Jia, Y., y Zhang, Y.** (2018). Protein structure prediction. *Int J Mod Phys B*, 32(18), 1-17.
58. **De Rose, R., Tennent, J., McWaters, P., Chaplin, P.J., Wood, P.R., Kimpton, W., Cahill, R., Scheerlinck, J.P.** (2002). Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep, *Vet Immunol Immunopathol*, 90, 55–63.
59. **de Santi Ferrara, G.I., Fernandes-Pedrosa, M.D.F., Junqueira-de-Azevedo, I.D.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Portaro, F.C.V., y Manzoni-de-Almeida, D.** (2009). SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*, 53, 743–753.
60. **Dhanda, S.K., Mahajan, S., Paul, S., Yan, Z., Kim, H., Jespersen, M.C., Jurtz, V., y otros.** (2019). IEDB-AR: immune epitope database–analysis resource. *Nucleic Acids Res*, 47, W502–W506.
61. **Dias-Lopes, C., Neshich, I.A.P., Neshich, G., Ortega, J.M., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., y otros.** (2013). Identification of new Sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. *PLoS ONE*, 8(11), e79240.
62. **Díaz, A.** (2003). La estructura de las catalasas. *Rev Edu Bioq*, 22 (2), 76-84.
63. **Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Oliveira S.C., Miyoshi, A., y Azevedo, V.** (2006a). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary research*, 37(2), 201–218.
64. **Dorella, F.A., Estevam, E.M., Pacheco, L.G., Guimaraes, C.T., Lana, U.G., Gomes, E.A., Barsante, M.M., y otros.** (2006b). In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium*

- pseudotuberculosis: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7368–7372.
65. **Dorella**, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., y otros. (2009). Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Exp Rev of Vaccines*, 8, 205–213.
  66. **Dorneles**, E.M.S., Santana, J.A., Ribeiro, D., Dorella, F.A., Guimaraes, A.S., y otros. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. *PLoS ONE*, 9(6), e98758.
  67. **Doytchinova**, I.A., y Flower, D.R. (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8: 4.
  68. **Doytchinova**, I.A., y Flower, D.R. (2008). Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. *Open Vaccine J*, 1, 22-26.
  69. **Droppa-Almeida**, D., Vivas, W.L., Silva, K.K., Rezende, A.F., y Simionatto, S. (2016). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*, 34 (8), 1091–1096.
  70. **Droppa-Almeida**, D., Franceschi, E., Ferreira, F.P. (2018). Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinform Bio Insights*, 12, 1–9.
  71. **Dukkupati**, V.S.R., Blair, H.T., Garrick, D.J., y Murray, A. (2006). Ovar-Mhc — Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases, *New Zealand Vet J*, 54(4), 153-160.
  72. **Duque**, M.A., y Rojas, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmun*, 26 (2), 73-86.
  73. **Dunkle**, A., Dzhagalov, I., Gordy, C., y He, Y. W. (2013). Transfer of CD8+ T cell memory using Bcl-2 as a marker. *J Immunol*, 190(3), 940–947.
  74. **El-Enbaawy**, M.I., Saad, M.M., y Selim, S.A. (2005). Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egypt J Immunol*, 12(2), 13-9.
  75. **Estavao**, B.S., Gallardo, A., Abalo, A., Jodor, N., y Jensen, O. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev Vet Arg*, 23, 258-278.
  76. **Estevao**, S., Gallardo, A., Ábalos, A., Díaz, Y., Álvarez, L., Callejo, R., y otros. (2007). Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Rev Argent Microbiol*, 39, 44-46.
  77. **Faeza**, N.M.N., Jesse, F.F.A., Hambal, I.U., Odhah, M.N., Umer, M., Wessam, M.M.S., y otros (2019). Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related pro-inflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Trop Anim Health Prod*, 51 (7), 1855-1866.
  78. **Faherty**, C.S., y Maurelli, A.T. (2008). Staying a live: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol*, 6, 173-180.
  79. **FAO**. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. (2018). Perspectivas alimentarias, Resúmenes de mercado 2018. Recuperado de <http://www.fao.org/home/es/>. Acceso enero 2020.
  80. **Fernández-Alonso**, M., Reina, G., Rubio, M., y Leiva, J. (2018). Infecciones por *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. y *Listeria* spp. *Medicine*, 12 (49), 2901-2909.

81. **Fleri, W.**, Paul, S., Dhanda, S.K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., y Sette, A. (2017). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol*, 8, 278.
82. **Flores-Díaz, M.**, Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., y Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as virulence factors. *Microbiol Molecular Biol Rev*, 80 (3), 597-628.
83. **Flower, D.R.**, Davies, M.N., y Doytchinova, I.A. (2015). Identification of candidate vaccine antigens in silico (p.39-71). New York, USA: Springer.
84. **Fontaine, M.C.**, Baird, G., Connor, K.M., Rudge, K., Sales, J., y Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24, 5986–5996.
85. **Fontaine, M.** (2015). Caseous lymphadenitis in sheep. *The Moredun Foundation News Sheet* 6(5).
86. **Forrellad, M. A.**, Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., y Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3–66.
87. **Fortune, S.M.**, Solache, A., Jaeger, A., Hill, P.J., Belisle, J.T., Bloom, B.R., y otros. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN- $\gamma$  through myeloid differentiation factor 88-dependent and independent mechanisms. *J Immunol*, 172, 6272–80.
88. **Fouad, E.A.**, Azza, S. M., Abu, E., y Kandil, M.M. (2019). Antibacterial efficacy of *Moringa oleifera* leaf extract against pyogenic bacteria isolated from a dromedary camel (*Camelus dromedarius*) abscess. *Vet World*, 2231-0916.
89. **Franco, E.F.**, Rana, P., Queiroz Cavalcante, A.L., da Silva, A.L., Cybelle Pinto Gomide, A., Carneiro Folador, A.R.; Azevedo, V., y otros. (2020). Co-Expression Networks for Causal Gene Identification Based on RNA-Seq Data of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Genes*, 11, 794.
90. **Freeze, H. H.**, y Kranz, C. (2010). Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Current protocols in molecular biology*, 17. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1713as89>.
91. **Gädicke, P.**, Azócarb, G., y Ocaña, M. (2008). Descripción de casos de absceso pectoral crónico y análisis de algunas variables asociadas a su presentación en equinos de la Provincia de Ñuble, Chile. *Arch Med Vet*, 40, 39-44.
92. **Galanis, K.A.**, Nastou, K.C., Papandreou, N.C., Petichakis, G.N., y Iconomidou, V.A. (2019). Linear B-cell epitope prediction: a performance review of currently available methods. BioRxiv. Recuperado de doi: <https://doi.org/10.1101/833418>.
93. **Gallardo, A.**, Toledo, R.A., González- Pasayo, R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi, F.A., y Estevao- Belchior S. (2019). *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Rev Argent Microbiol*, 51(4), 334-338.
94. **Gallimore, A.** (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med*, 187,1383–1393.
95. **Galvão, C.E.**, Perdigo, P.F., de Oliveira, C.E., Forner, O., Ribeiro, R.B.P., Oliveira, C.S., y Soares, G.M.R., (2017). Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. *BMC Microbiol*, 17, 202.

96. **Gamage**, D.G., Gunaratne, A., y Periyannan, G.R. (2019). Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. *Protein and Peptide letters*, 26, 1-9.
97. **Gao**, H., Ma, Y., Shao, Q., Hong, Q., Zheng, G., y Li, Z. (2018). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain KM01, isolated from the abscess of a goat in Kunming, China. *Genome Announc*, 6(11), e00013-18.
98. **Garbe**, J., Sjogren, J., Cosgrave, E.F.J., Struwe, W.B., y Bober, M. (2014). EndoE from *Enterococcus faecalis* hydrolyzes the glycans of the biofilm inhibiting protein lactoferrin and mediates Growth. *PLoS ONE*, 9(3).
99. **García**, P.C. (2017). Evaluación de un inmunógeno para el control de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos (Tesis de Maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Mexico.
100. **Gary**, A., y Koretzky, G.A. (2008). T lymphocyte Signaling Mechanisms and Activation. En: Paul W.E. (Ed.) *Fundamental Immunology* (p.347-72). Washington DC, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
101. **Giddens**, J.P., Lomino, J.V., Amin, M.N., y Wang, L.X. (2016). Endo-F3 glycosynthase mutants enable chemoenzymatic synthesis of core-fucosylated triantennary complex type glycopeptides and glycoproteins. *J Biol Chem*, 291, 9356-9370.
102. **Gilla**, S.C., y von Hippela, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182 (2), 319-326.
103. **Goldberger**, A.C., Lipsky, B.A., y Plorde, J.J. (1981). Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis* (pseudotuberculosis). *Am J Clin Patho*, 76, 486-490.
104. **González**, A., y Fillat, M.F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Educ Bioq (REB)*, 37(1), 14-27.
105. **Goodswen**, S.J., Kennedy, P.J., y Ellis, J.T. (2014). Vacceed: a high-throughput in silico vaccine candidate discovery pipeline for eukaryotic pathogens based on reverse vaccinology. *Bioinformatics*, 30, 2381-2383.
106. **Guevara-Hernández**, E., López-Zavala, A.A., Jiménez-Gutiérrez, L.R., Sotelo-Mundo, R.R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Revista de ciencias biológicas y de la salud*, 15 (3), 8-17.
107. **Guimarães**, A.S., Seyffer, N., Bastos, B.L., Portela, R.W.D., Carmo, F.B., Meyer, R., Azevedo, V., y otros. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Ruminant Research*, 87, 86-91.
108. **Guimarães**, A.S., Carmo, F.B., Heinemann, M.B., Portela, R.W.D., Meyer, R., Andrey, P.L., Núbia, N., y otros. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 7, 68.
109. **Hamaguchi**, T., Ito, T., Inoue, Y., Limpaseni, T., y Pongsawasdi, P. (2010). Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Glycobiology*, 20, 420-432.
110. **Hard**, G.C. (1972). Examination by electron microscopy of interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *J Med Microbiol*, 5, 483-491.

111. **Hassan, S.S.**, Schneider, M.P.C., Ramos, R.T.J., Carneiro, A.R., y Ranieri, A. (2012). Whole-Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp162, isolated from Camel. *J Bacteriol*, 194, 5718–5719.
112. **He, Y.**, Xiang, Z., y Mobley, H.L. (2010). Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol*, 297505.
113. **Heggelund, L.**, Gaustad, P., Håvelsrud, O.E., Blom, J., Borgen, L., Sundset, A., Sorum, H., y Froland, S.S. (2015). *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. *Open Forum Infect Dis*, 2(2): ofv053.
114. **Henrissat, B.**, y Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, 7, 637–44.
115. **Hepworth-Warren, K.L.**, Sponseller, B.T., Wong, D.M., y Kinyon, J.M. (2014). Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *equi* from a horse in central Iowa. *Case Reports in Vet Med*, 1, 3.
116. **Hernández, L.F.** (2015). Caracterización molecular de *Corynebacterium Pseudotuberculosis* aislados de muestras de casos clínicos de Linfadenitis Caseosa en ovinos y caprinos (Tesis de Maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Del Estado De México. Mexico.
117. **Hodgson, A. L. M.**, Bird, P., y Nisbett, I. T. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol*, 172, 1256–1261.
118. **Hodgson, A.L.M.**, Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S., y Radford A.J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect and Immunol*, 60(7), 2900-2905.
119. **Hodgson, A.L.M.**, Tachedjian, M., Corner, L.A., y Radford, A. J. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect and Immunol*, 62(12), 5275-5280.
120. **Hodgson, A.L.**, Moore, R.J., Rothel, L., Krywult, J., Radford, A.J., y Lund, K. (1999). Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine*, 18, 487-497.
121. **House, R.W.**, Schousboe, M., Allen, J.P., y Grant, C.C. (1986). *Corynebacterium ovis* (pseudotuberculosis) lymphadenitis in a sheep farmer: a new occupational disease in New Zealand. *New Zealand Med J*, 99, 659-62.
122. **Ibraim, I.C.**, Dornelles, Parise, M.T., Parise, D., Tadra, M.Z., de Paula, T.L., Wattam, A.R., y otros. (2019). Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. *BMC Genomics*, 20, 663.
123. **Ilhan, Z.** (2013). Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. *Revue Méd Vét*, 164(2), 60-66.
124. **Itoh, Y.**, Watanabe, J., Fukada, H., Mizuno, R., Kezuka, Y., Nonaka, T., y Watanabe, T. (2006). Importance of Trp59 and Trp60 in chitin-binding, hydrolytic, and antifungal activities of *Streptomyces griseus* chitinase C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, 1176-1184.
125. **Jespersen, M.C.**, Peters, B., Nielsen, M., y Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*, 45, W24–W29.

126. **Jesse, F.F.A., Odhah, M.N., Abbad, Y., Garba, B., Mahmood, Z., Hambali, I.U., Haron, A.W., y otros.** (2020). Responses of female reproductive hormones and histopathology in the reproductive organs and associated lymph nodes of Boer does challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic corynomycolic acid Extract. *Microbial Pathog*, 139, 103852.
127. **Jorge, S., y Dellagostin, O.A.** (2017). The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnol Res Innov*, 1, 6-13.
128. **Jost, B.H., y Billington, S.J.** (2004). *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*. En: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G., y Thoen, C.O. (Eds). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (p.77-86). Yowa, USA: John Wiley & Sons.
129. **Kaech, S. M., y Cui, W.** (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature reviews Immunol*, 12(11), 749–761.
130. **Kallies, A., y Good-Jacobson, K. L.** (2017). Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System. *Trends in Immunol*, 38(4), 287–297.
131. **Kang, J.Y., Nan, X., y Jin, M.S.** (2009). Recognition of lipopeptide patterns by toll-like receptor 2-toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, 31, 873–884.
132. **Karlsson, M., y Stenlid, J.** (2008). Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 16, 208–23.
133. **Kelley, L., Mezulis, S., y Yates, C.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10, 845–858.
134. **Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T., y Nonaka, T.** (2006). Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J Mol Biol*, 358, 472-484.
135. **Khamis, A., D. Raoult, y La Scola, B.** (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*, 42, 3925–3931.
136. **Khamis, A., Raoult, D., y La Scola, B.** (2005). Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol*, 43, 1934–1936.
137. **Kolesnikov, Y.S., Nokhrina, K.P., Kretynin, S.V., Volotovskii, I.D., Martinec, J., y otros.** (2012). Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochem Biokhimiia*, 77, 1–14.
138. **Kosaka, A., Lee, U., y Wakita, D.** (2006). Interleukin-12-responding asialoGM1+CD8+ central memory-type T cells as precursor cells for interferon-gamma-producing killer T cells. *Cancer Sci*, 97(11), 1236-1241.
139. **Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
140. **Lan, D.T., Makino, S.I., Shirahata, T., Yamada, M., y Nakane, A.** (1999). Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J Vet Med Sci*, 11, 1203–1208.
141. **Leal, K. S., Silva, T.O., Silva, A.F.R., Brilhante, F.S.B., Begnini, K., Seixas, F., Collares, T., y otros.** (2018). Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine*, 36, 3578–3583.
142. **Lester, W.A., Schousboe, M., Chambers, S., y Patton, W.N.** (1997). A second case of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in New Zealand. *NZ Med J*, 110, 469-470.

143. **Letvin**, N. L. y Walker, B. D. (2003). Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nature Med*, 9, 861–866.
144. **Li**, Z., Nimtz, M., y Rinas, U. (2014). The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. *Microbial Cell Factories*, 13, 45.
145. **Li**, H., Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., Wang, Z., y otros. (2018a). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, 168, 69-75.
146. **Li**, S.S., Li, Y., Long, N., Jiang, F., y Zhang, R. (2018b). Highly active and stable nanobiocatalyst based on in-situ cross-linking of phospholipase D for the synthesis of phosphatidylserine. *Inter J of Biol Macromo*, 117, 1188–1194.
147. **Lin**, J.C., Chen, Q.X., Shi, Y., Li, S.W., y Zhao, H. (2003). The chemical modification of the essential groups of beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander. *IUBMB Life*, 55, 547-552.
148. **Liu**, D.T.L., Chan, W.M., Fan, D.S.P., y Lam, D.S.C. (2005). An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *British J Ophthalmol*, 89, 245-246.
149. **Lopes**, T., Silva, A., Thiago, R., Carneiro, A., Dorella, F.A. (2012). Complete Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp267, isolated from a Llama. *J Bacteriol*, 194, 3567–3568.
150. **Mahankali**, M., Alter, G., y Gomez-Cambronero, J. (2015). Mechanism of Enzymatic Reaction and Protein-Protein Interactions of PLD from a 3D Structural Model. *Cellular Signal*, 27(1), 69–81.
151. **Mahmood**, Z.K.H., Jesse, F.F., Saharee, A.A., Jasni, S., Yusoff, R., y Wahid, H. (2015). Clinico-pathological changes in goats challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (PLD). *Am J Anim Vet Sci*, 10 (3), 112-132.
152. **Mao**, X., Liu, Q., Qiu, Y., Fan, X., Han, Q., Liu, Y., Zhang, L., y Xue, C. (2017). Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine. *J Biotechnol*, 10(249), 51-58.
153. **Martin**, M.D. y Badovinac, V.P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol*, 9, 2692.
154. **Markosian**, C., Di Costanzo, L., y Sekharan, M. (2018). Analysis of impact metrics for the Protein Data Bank. *Sci Data*, 5, 180212.
155. **Matloubian**, M., Concepcion, R.J., y Ahmed, R. (1994). CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol*, 68(12), 8056-8063.
156. **May**, T., Ito, A., y Okabe, S. (2009). Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. *Antimicrob Agents Chem*, 53, 4628–4639.
157. **McKean**, S., Davies, J., y Moore, R. (2005). Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect*, 7, 1352-1363.
158. **McKean**, S.C., Davies, J.K., y Moore, R.J. (2007). Expression of phospholipase D the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microb*, 153, 2203-2211.
159. **Medrano**, G., Hung A.Ch., Alvarado A.S., y Li E.O. (2003). Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. *Rev Inv Vet*, 14(1), 61-67.

161. **Melchionda**, F., Fry, T.J., Milliron, M.J., McKirdy, M.A., Tagaya, Y., y Mackall, C.L. (2005). Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest*, 115(5), 1177-1187.
162. **Mercier**, B.C., Cottalorda, A., Coupet, C.A., Marvel, J., y Bonnefoy-Bérard, N. (2009). TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *J Immunol*, 182(4), 1860-1867.
163. **Michalik**, M., Djahanshiri, B., Leo, J.C., y Linke, D. (2016). Reverse Vaccinology: The Pathway from Genomes and Epitope Predictions to Tailored Recombinant Vaccines. En: Sunil, T. (Ed.). *Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1*. USA.
164. **Mondragón**, A.J., Domínguez-Vara, I.A., Rebollar, R.S., Borques, G.J.L., y Hernández, M.J. (2010). Canales de comercialización de la carne de ovino en Capulhuac Estado de México. En: Cavallotti VBA, Marcof ACF y Cesin VA. Los grandes retos de la ganadería: hambre, pobreza y crisis. UACH-CP, México, 341-349.
165. **Moussa**, I.M., Mohamed, A.M., Selim, S.A., y Mohamed, F.H. (2016a). Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Saudi J Biol Scie*, 23, 282–287.
166. **Moussa**, I.M., Mohamed, S.A., Ashgan, M., Hessain, S.A., Kabli, E., Hassan, A.H., Salha, A.S. (2016b). Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. *Saudi J Biol Scie*, 23, 718–723.
167. **Mukonyora**, M. (2015). A Review of Important Discontinuous B-Cell Epitope Prediction Tools. *J Clin Cell Immunol*, 6(5), 358.
168. **Muller**, B., de Klerk-Lorist, L.M., Henton, M.M., Lane, E., Parsons, S., Gey van Pittius, N.C., Kotze, A., van Helden, P.D., y Tanner, M. (2011). Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Veterinary Microbiology*, 147, 340–345.
169. **Muñoz**, B.A.V., Cortés, P.Y.A., Arellano, R.B., Hernández, G.M., Hernández, C.R., y Díaz, A.E. (2016). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from muscular abscesses in two horses: first report in Mexico. *Equine Vet Educ*, 29(8), 431-435.
170. **Murakami**, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., de Andrade, S.A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D.V., y Arni, R.V. (2006). Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem and Biophys Res Commu*, 342, 323–329.
171. **Murakami**, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi D.V., y Arni, R.K. (2005). Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of Sphingomyelinases D. *The J of Biol Chem*, 280(14), 13658–13664.
172. **Nassar**, A.F.C., Daniel, G.T., Miyashiro, S., Ruiz, R., Scannapieco, E.M., de Souza, J., y Gregory, L. (2015). Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Arq. Inst. Biol*, 82, 1-6.
173. **Novák**, P., y Havlíček, V. (2016). Isoelectric point. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition).
174. **Nowicki**, M., Kaba, J., Mosiej, E., Lutyńska, A., Augustynowicz, E., Rzewuska, M., Binek, M., y otros. (2011). Fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains by Random amplified

- polymorphic DNA and Amplified fragment length polymorphism techniques. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55, 403-409.
175. **Ochoa**, U.G., Deuces, I.J., Martínez, L.P., Jiménez, B.M.R., y Pérez, R.M. (1996). Aislamiento de agentes bacterianos a partir de exudados nasales en rebaños ovinos trashumantes de Xalatlaco México. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Brasil, PN9. 12909, 230.
176. **O'Connor**, K., Fletcher, S.A., y Csonka, L.N. (2009). Increased expression of Mg (2+) transport proteins enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 17522–17527.
177. **Odhah**, M.N., Abdullah, F.F.J., Haron, A.W., Mohd, L.M.A., Zamri SM, Khuder, Z., y otros. (2017). Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. *Vet World*, 10(6), 655-661.
178. **Odhah**, M.N., Jesse, F.F.A., Lawan, A., Idris, U.H., Marza, A.D., Mahmood, Z.K., y otros. (2018). Responses of haptoglobin and serum amyloid A in goats inoculated intradermally with *C. pseudotuberculosis* and mycolic acid extract immunogen. *Microb Pathog*, 117, 243–246.
179. **Odhah**, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Mahmood, Z., Wahid, H.A., Mohd, L.M.A., y otros. (2019). Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microb Pathog*, 135, 103628.
180. **OIE**, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Informe del grupo ad hoc de la OIE sobre las enfermedades prioritarias para las cuales las vacunas pueden reducir el uso de agentes antimicrobianos en bovinos, ovejas y cabras. Paris. Recuperado de <http://www.oie.int/fileadmin/SST/adhocreports/AHG>
181. **Oliveira**, M., Barroco, C., Mottola, C., Santos, R., Lemsaddek, A., Tavares, L., y Semedo-Lemsaddek, T. (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Vet Res*, 10, 218.
182. **Oliveira**, A., Teixeira, P., Azevedo, M., Jamal, S.B., Tiwari, S., Almeida, S., Silva, A., Barh, D., Dorneles, E.M.S., Haas, D.J., Heinemann, M.B., Ghosh, P., Pereira, A., Figueiredo, H., Ferreira, R.S., Azevedo, V. (2016). *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenic inference from sequence and structural analysis. *BMC Microbiol*. 16:100.
183. **Oliveira**, A., Oliveira, L.C., Aburjaile, F., Benevides, L., Tiwari, S., Jamal, S.B., Silva, A., y otros. (2017a). Insight of genus *Corynebacterium*: Ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Front Microbiol*, 8, 1937.
184. **Oliveira**, A., Teixeira, P., Barh, D., Barh, D., Ghosh, P., y Azevedo, V. (2017b). Key amino acids in understanding evolutionary characterization of Mn/Fe-Superoxide dismutase: A phylogenetic and structural analysis of proteins from *Corynebacterium* and Hosts. *Trends Artif Intell*, 1(1), 1-11.
185. **Ong**, E., Wang, H., Wong, M.U., Seetharaman, M., Valdez, N., y He, Y. (2020). Vaxign-ML: supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. *Bioinformatics*, 36(10), 3185-3191.
186. **O'Reilly**, K.M., Green, L.E., Malone, F.E., y Medley, G.F. (2008). Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Prev Vet Med*, 83, 242–259.

187. **Ortiz**, G.A. (2016). Producción de una bacterina para Linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis (Tesis de Maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Mexico.
188. **Othman**, A.M., Abba, Y., Jesse, A., Ilyasu, Y.M., Saharee, A.A., Haron, A.W., y otros. (2016). Reproductive pathological changes associated with experimental subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in nonpregnant Boer Does. *J Pathog*, 7.
189. **Pacheco**, L.G.C., Pena, R.R., Castro, T.L.P., Dorella, F.A., Bahia, R.C., Carminati, R., Frota, M.N.L., y otros. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol*, 56(4), 480-486.
190. **Pacheco**, L.G.C, Slade, S.E, Seyffert, N., Santos, A.R., y Castro, T.L.P. (2011). A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiology*, 11, 12.
191. **Pacheco**, L.G.C, Castro, T.L.P., Carvalho, R.D., Moraes, P.M., Dorella, F.A., Carvalho, N.B., Slade, S.E., y otros. (2012). A role for sigma factor  $\sigma$  in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxid stress. *Fron Microbiol*, 3, 126.
192. **Parin**, U., Kirkan, S., Ural, K., Savasan, S., Erbas, G., Gultekin, M., Yuksel, H., y otros. (2018). Molecular identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Acta Vet. BRNO*, 87, 3-8.
193. **Parise**, D., Parise, M., Viana, M.V.C., Muñoz, B.A.V., Cortés-Pérez, Y.A., Azevedo, V., y otros (2018). First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Stand in Genomic Sci*, 13(21).
194. **Pascual**, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A., Gimenez, M.N., y Collins, M.D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 724-728.
195. **Paton**, M.W., Sutherland, S.S., Rose, I.R., Hart, R.A., Mercy, A.R., y Ellis, T.M. (1995). The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Aust Vet J*, 72, 266-9.
196. **Paton**, M.W., Walker, S.B., Rose, I.R., y Watt, G.F. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust Vet J*, 81(1-2), 91-5.
197. **Paule**, B.J.A., Azevedo, V., Regis, L.F., Carminati, R., y Bahia, R. (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet Immunol Immunopathol*, 96, 129-139.
198. **Paule**, B.J., Meyer, R., Moura-Costa, L.F., Bahia, R.C., Carminati, R., y Regis, L.F. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction / concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr Purif*, 34, 311-16.
199. **Peel**, M.M., Palmer, G.G., Stacpoole, A.M., y Kerr, T.G. (1997). Human Lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and Review. *Clin Infectious Dis*, 24, 185-91.
200. **Perkins**, S.L., Magdesian, K.G., Thomas, W.P., y Spier, S.J. (2004). Pericarditis and pleuritis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a horse. *J American Vet Med Association*, 224(7), 1133-1138.

201. **Phue, J.N.**, Noronha, S.B., Hattacharyya, R., Wolfe, A.J. y Shiloach, J. (2005). Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnol and Bioengine*, 90, 805-820.
202. **Pinho, J.M.R.**, Dorella, F.A., Coelho, K.S., Fonseca, C.T., Cardoso, F.C., Meyer R., Dias, R.W.P., y otros. (2009). Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat-shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. *Open Vet Sci J*, 3, 22–27.
203. **Pinto, A.C.**, de Sa, P.H.C.G., Ramos, R.T.J., Barbosa, S., Barbosa, H.P.M., Ribeiro, A.C., Silva, W.M., y otros. (2014). Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*, 15, 14.
204. **Pinto-Gomide, A.C.**, Gomes de Sá, P., Queiroz, A.L., Sousa, T., Rodrigues, L., Juca, R., Azevedo, V., y otros. (2018). Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi. *Gene*, 645, 124–130.
205. **Ponomarenko, J.**, Bui, H.H., Li, W., Fusseder, N., y Bourne, P.E. (2008). ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, 9, 514.
206. **Promed.** Pigeon Fever, equine USA (Oregon). (2007) Recuperado de. <http://promedmail.org/post/20071018.3408>.
207. **Purushe, J.** y Zhang, Y. (2018). Histone Methyltransferases and T Cell Heterogeneity. En: Soboloff, J., Kappes, D.J., (Ed.). Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function. CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532320/> doi: 10.1201/9781315371689-11.
208. **Radostis, O.M.**, Gay, C.C., Blood, D.C., y Hinchcliff, K.W. (2000). Caseous lymphadenitis in sheep and goats. En: Saunders, W.B. (Ed.) Veterinary Medicine (p. 727-730). London, England.
209. **Raeber, M.E.**, Zurbuchen, Y., Impellizzeri, D., y Boyman, O. (2018). The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunol Rev*, 283(1), 176-193.
210. **Raju, T.S.**, Briggs, J.B., Borge, S.M., Jones, A.J.S. (2000). Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, 10, 477–86.
211. **Rao, V.**, Cui, T., Guan, C., y Van Roey, P. (1999). Mutations of endo-beta-Nacetylglucosaminidase H active site residues Asp130 and Glu132: activities and conformations. *Protein Sci*, 8, 2338–2346.
212. **Raoult, D.**, Rouli, L., Merhej, V., y Fournier, P.E. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes and New Infections*, 7, 72-85.
213. **Raynal.** (2018). Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Res Notes*, 11, 73.
214. **Rehermann, B.**, y Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Rev Immunol*, 5, 215–229.
215. **Ribeiro, D.**, Rocha, F.S., Leite, K.M., Soares, S.C., Silva, A., Portela, R.W., Meyer, R., y otros. (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Vet Res*, 45, 28.

216. **Rios Canales**, M.A. (2010). Descripción fenotípica y genotípica de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas desde caprinos y equinos en Chile (Tesis Pregrado). Universidad de Chile. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Chile.
217. **Robaj**, A., Hamidi, A., Bytyqi, H., y Sylejmani, D. (2017). Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. *Bulg J Agric Sci*, 23(6), 1033–1036.
218. **Rogers**, E.A., Das, A., y Ton-That, H. (2011). Adhesion by pathogenic *Corynebacteria*. *Adv Exp Med Biol*, 715, 91–103.
219. **Romero-Pérez**, J. C., Suner-Machado, M., y Batista-Diaz, N. (2004). Linfadenitis por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en una paciente joven. *Rev Clin Esp*, 204, 388-389.
220. **Rose**, P. W., Altunkaya, A., Bi, C., Bradley, A. R., Christie, C. H., Costanzo, L. D., Duarte, J. M., y otros. (2017). The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic acids res*, 45(D1), D271–D281.
221. **Rubinstein**, M. P., Lind, N. A., Purton, J. F., Filippou, P., Best, J. A., McGhee, P. A., Surh, C. D., y Goldrath, A. W. (2008). IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood*, 112(9), 3704–3712.
222. **Ruiz**, J.C., D'Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., y Pinto, A.C. (2011). Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*, 6, e18551.
223. **Sá**, M.A., Gouveia, G.V., Krewer, C., Veschi, J.L.A., Mattos-Guaraldi, A.L., y Costa, M.M. (2013). Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. *Genetics Mol Biol*, 36(2), 265-268.
224. **Saavedra- Hernández**, D. (2013). La molécula CD28 y su función en la activación de células T. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(4), 359-367.
225. **SAGARPA**. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Plan rector sistema producto ovinos (2015-2024). Actualización 2016. Recuperado de [https://spo.uno.org.mx/wp-content/uploads/2016/05/plan\\_rector\\_ovinos2016.pdf](https://spo.uno.org.mx/wp-content/uploads/2016/05/plan_rector_ovinos2016.pdf). Acceso marzo 2020.
226. **Sambrook**, J., Green, M.R. y otros (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. USA: Cold Spring Harbor Protocols. Recuperado de <http://www.molecularcloning.org>.
227. **Santana**, K.T.O., Santos, T.M., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., y Souza, R.F.S. (2016). Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb Cell Fact*, 15, 83.
228. **Santos**, A. R., Carneiro, A., Gala-García, A., Pinto, A., Barh, D., Barbosa, E., Aburjaile, F., y otros. (2012). The *Corynebacterium pseudotuberculosis* *in silico* predicted pan-exoproteome. *BMC Genomics*, 13(5), S6.
229. **Santos**, A.R., Pereira, V.B., Barbosa, E., Baumbach, J., y Pauling, J. (2013). Mature epitope density – a strategy for target selection based on immunoinformatics and exported prokaryotic proteins. *BMC Genomics*, 14, S4.
230. **Santos**, L.M., Stanisic, D., Menezes, U.J., Mendonça, M.A., Barral, T.D., Seyffert, N., Azevedo, V., y otros. (2019). Biogenic Silver Nanoparticles as a Post-surgical Treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Small Ruminants. *Front Microbiol*, 10, 824.

231. **Schiffler**, B., Barth E., Daff'e, M. y Benz, R. (2007). *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channelforming protein in the cellwall. *J of Bacteriol*, 189(21), 7709–7719.
232. **Schultz**, I.J., Chen, C., Paw, B.H., y Hamza, I. (2010). Iron and porphyrin trafficking in Heme biogenesis. *J Biol Chem*, 285(35), 26753–9.
233. **Seyffert**, N., Silva, R.F., Jardim, J., Silva, W.M., Castro, T.L., Tartaglia, N.R., y otros. (2014). Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Vet Microbiol*, 174, 255–60.
234. **Sercan**, O., Stoycheva, D., Hämmerling, G.J., Arnold, B., y Schüler, T. (2010). IFN-gamma receptor signaling regulates memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol*, 184(6), 2855-2862.
235. **Shadnezhad** A, Naegeli A, Collin, M. (2016). CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a endo B-N- acetylglucosaminidase. *BMC Microbiol*, 63(1), 206-211.
236. **Sheldon**, J.R., y Heinrichs, D.E. (2015). Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 39(4), 592–630.
237. **Shimura**, K. (2018). Capillary Isoelectric Focusing. Capillary Electromigration Separation Methods.
238. **SIAP**. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). Reporte de producción pecuaria. Recuperado de [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecResumen.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp). Acceso abril 2020.
239. **SIAP**. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018a). Población ganadera, cabezas ovinos.2009-2018. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516348/Inventario\\_2018\\_Ovino.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516348/Inventario_2018_Ovino.pdf). Acceso abril 2020.
240. **SIAP**. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018b). Población ganadera, cabezas caprinos. 2009-2018. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516350/Inventario\\_2018\\_Caprino.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516350/Inventario_2018_Caprino.pdf). Acceso abril 2020.
241. **Silk**, L., y Lovatt F. (2016). Sheep vaccinations: latest research and farmer communication. *Vet Times*. Recuperado de <https://www.vettimes.co.uk>.
242. **Silva**, A., Schneider, M.P.C., Cerdeira, L., Barbosa, M.S., y Ramos, R.T.J. (2011). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. *J Bacteriol*, 193, 323–324.
243. **Silva**, A., Ramos, R.T.J., Ribeiro, C.A., Cybelle, P.A., y de Castro, S.S. (2012). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cp31, isolated from an Egyptian Buffalo. *J Bacteriol*, 194, 6663–6664.
244. **Silva** W.M., Seyffert S.N., Santos A.V., Castro T.L.P., Pacheco L.G.C., Santos A.R., Ciprandi A., Dorella F.A., Andrade H.N., Barh D., Pimenta A.M., Silva A., Miyoshi A., Azevedo V. (2013). Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteoma. *Microbial Pathogenesis*. 1e6: 1-6.
245. **Silva** JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW I. (2014). *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res*. 10:965.

246. **Silva, W. M., Dorella, F.A., Soares, S.C., Souza, G.H.M., Castro, T.L.P., Seyffert, N., Figueiredo, H., y otros. (2017).** A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics I. *BMC Microbio*, 17, 55.
247. **Silva, M.T.O., Bezerra, F.S.B., de Pinho, R.B., Begnini, K.R., Seixas, F.K., Collares, T., y otros. (2018).** Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine*, 36(1), 74-83.
248. **Simmons, C.P., Hogdson, A.L., y Strugnell, R.A. (1997).** Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun*, 65, 3048-3056.
249. **Simmons, C.P., Dunstan, S.J., Tachedjian, M., Krywult, J., Hogdson, A.L., y Strugnell, R.A. (1998).** Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun*, 66, 474-479.
250. **Singh, T.R., Chandra, S., y Singh, D. (2010).** Prediction and characterization of T-cell epitopes for epitope vaccine design from outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Bioinformatic*, 5(4).
251. **Sivalingam, G.N., y Shepherd, A.J. (2012).** An analysis of B-cell epitope discontinuity. *Molecular Immunology*. 51:304– 309.
252. **Soares, S.C., Trost, E., Ramos, R.T.J., Carneiro, A.R., Santos, A.R., Pinto, A.C., Barbosa, E., y otros. (2012).** Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *J of Biotech*, 167(2), 135-141.
253. **Soares, S.C., Trost, E., Ramos, R.T.J., Carneiro, A.R., Santos, A.R., Pinto, A.C., Barbosa, E., y otros. (2012).** Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production, *Journal of Biotechnology*, Recuperado de [http:// doi:10.1016/j.jbiotec.2012.11.003](http://doi:10.1016/j.jbiotec.2012.11.003).
254. **Soares, S.C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., y Carneiro, A. (2013).** The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. *PLoS ONE*, 8(1), e53818.
255. **Soares, G.M., Rodrigues, P.M., dos Santos, L.R., Galvão, C.E., Oliveira, L.C., Andrade, G.B., y Oliveira, C. (2018).** Evaluation of virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates in BALB/c mice. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte*, 42, 1983-9715.
256. **Sobrinho-Santos, E., Almeida, A.C., Santos, H.O., Cangussu, A.S.R., Almeida, D.A., y Costa, K.S. (2018).** Leader gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be useful in vaccines against caseous lymphadenitis of goats: a bioinformatics approach. *J Vet Med Sci*, 80(8), 1317–1324.
257. **Songer, J.G., Beckenbach, K., Marshall, M.M., Olson, G.B., y Kelly, L. (1988).** Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res*, 49, 223-226.
258. **Soria-Guerra, R.E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D.O., y Rosales-Mendoza, S. (2015).** An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J Biomed Informat*, 53, 405–414.
259. **Sousa, T.d.J., Parise, D., Profeta, R. y otros. (2019).** Re-sequencing and optical mapping reveals misassemblies and real inversions on *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomes. *Sci Rep*, 9, 16387.

260. **Sprake, P.**, y Gold, J.R. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (*Lama pacos*). *Can Vet J*, 53, 387–390.
261. **Stanford, K.**, Brogden, K.A., McClelland, L.A., Kozub, G.C., y Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can J Vet Res*, 62, 38-43.
262. **Stals, I.**, Karkehabadi, S., Kim, S., Ward, M., Van Landschoot, A., y Devreese, B. (2012). High resolution crystal structure of the Endo-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase responsible for the deglycosylation of *Hypocrea jecorina* Cellulases. *PLoS ONE*, 7(7), e40854.
263. **Stanisic, D.**, Fregonesi, N.L., Barros, C.H.N., Pontes, J.G.M., Fulaz, S., Menezes, U.J., Nicoleti, J.L., y otros. (2018). NMR insights on nano silver post-surgical treatment of superficial caseous lymphadenitis in small ruminants. *RSC Advances*, 71.
264. **Stefanska, I.**, Rzewuska, M., y Binek, M. (2008). Evaluation of three methods for DNA fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from goats in Poland. *Polish J of Microbiol*, 57 (2), 105-112.
265. **Stefanska, I.**, Gierynska, M., Rzewuska, M., Binek, M. (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish J Vet Sci*, 13(1), 143-9.
266. **Stock, R.P.**, Brewer, J., Wagner, K., Ramos-Cerrillo, B., Duelund, L., y otros. (2012). Sphingomyelinase D activity in model membranes: Structural defects of *in situ* generation of Ceramide-1-Phosphate. *PLOS ONE*, 7(4), e36003.
267. **Studier, W.F.**, Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., y Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Gene Express Technol*, 60–89.
268. **Studier, W.F.** (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Express Purific*, 41, 207–234.
269. **Subramaniam, N.S.**, Morgan, E.F., Wetherall, J.D., Stear, M.J., y Groth, D.M. (2015). A comprehensive mapping of the structure and gene organisation in the sheep MHC class I region. *BMC Genomics* 16, 810.
270. **Sutherland, S. S.**, R. A. Hart, y Buller, N. B. (1993). Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. *Aust Vet J*, 70, 454–456.
271. **Syame, S.M.**, Abuelnaga, A.S.M., Ibrahim, E.S., y Hakim, A.S. (2018). Evaluation of specific and non-specific immune response of four vaccines for caseous lymphadenitis in sheep challenged, *Vet World*, 11(9), 1272-1276.
272. **Szwako, A.**, Ortíz, N., y López, D. (2014). Prevalencia de Linfadenitis caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) en caprinos de establecimientos lecheros del departamento central - Paraguay, año 2012. *Compend cienc vet*, 4 (1), 24 – 29.
273. **Tachedjian, M.**, Krywult, J., Moore, R.J., y Hodgson, A.L.M. (1995). Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine*, 13(18), 1785-1792.
274. **Tadich, N.**, Alvarez, C., Chacon, T., y Godoy, H. (2005). Linfadenitis caseosa (LAC) en ovinos en la XI región, Chile. *Arch Med Vet*, 37, 161-167.
275. **Tarentino, A.L.**, Quinones, G., Schrader, W.P., Changchien, L.M., y Plummer, T.H., (1992). Multiple endoglycosidase (Endo) F activities expressed by *Flavobacterium meningosepticum*. Endo F1:

- Molecular cloning, primary sequence, and structural relationship to Endo H. *J Biol Chem*, 267(6), 386-3872.
276. **Tashjian**, J.J., y Campbell, S.G. (1983). Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am J Vet Res*, 44, 690-693.
277. **Tettelin**, H., Riley D., Cattuto, C., y Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol*, 11, 472-7.
278. **Tough**, D. F., Rioja, I., Modis, L. K., y Prinjha, R. K. (2019). Epigenetic Regulation of T Cell Memory: Recalling Therapeutic Implications. *Trends in Immunology*. doi:10.1016/j.it.2019.11.0.
279. **Trastoy**, B., Lomino, J.V., Pierce, B.G., Carter, L.G., GuËnther, S., y Giddens, J.P. (2014). Crystal structure of *Streptococcus pyogenes* EndoS, an immunomodulatory endoglycosidase specific for human IgG antibodies. *Proc Natl Acad Sci*, 111, 6714-6719.
280. **Trastoy**, B., Klontz, E., Orwenyo, J., Marina, A., Whang, L.X., Sundberg, E.J., y Guerin, M.E. (2018). Structural basis for the recognition of complex-type N-glycans by Endoglycosidase S. *Nat Commun*, 9, 1874.
281. **Trimble**, R.B., y Tarentino, A.L. (1991). Identification of Distinct Endoglycosidase (Endo) Activities in *Flavobacterium meningosepticum*: Endo F1, Endo Fa, and Endo F3. Endo F1 and Endo H hydrolyze only high mannose and hybrid glycans. *J Biol Chem*, 266(3), 1646-1651.
282. **Trost**, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., y otros. (2010). The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, 11, 728.
283. **Ullah**, A., Oliveira, P., Murakami, M.T., Silva, D.T., Martins, A.C., Chaves-Moreira, W.D., Gremski, M.H., y otros. (2011). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Cryst*, F67, 234-236.
284. **Valdivia**, J. (2015). Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Tesis de Doctorado). Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Sanidad animal y Seguridad alimentaria. España.
285. **Vale**, C.V.L., da Costa, S.M., Pacheco, S.A., Castro, T.S., Ferreira, deM.C.L., Nobre, S.E.K., de Oliveira, N.I.L., y otros. (2016). Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a C. pseudotuberculosis strain. *BMC Vet Res*, 12, 195.
286. **ValleyVet**. (2020). Colorado Serum Company. 4950 YORK STREET, P.O. BOX 16428, DENVER, CO, 80216-0428.
287. **van Aalten**, D. M. F. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 8979-8984.
288. **van Meeteren**, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N.G., Fernandes P. M.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D.V., y otros. (2004). Spider and Bacterial Sphingomyelinases D target cellular Lysophosphatidic Acid Receptors by hydrolyzing Lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem*, 279(12), 10833-10836.
289. **Van Roey**, P., Rao, V., Plummer, T. H. J., y Tarentino, A. L. (1994). Crystal structure of endo-beta-N-acetylglucosaminidase F1, an alpha/beta-barrel Enzyme adapted for a complex substrate. *Biochemistry*, 33, 13989-13996.

290. **Varela**, G.J.A., Montes de Oca, J.R., Acosta, J.D., Hernández, F.L., Morales, E.V., y Monroy, S.G.H. (2018). First report of isolation and molecular characterization of the pathogenic *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microb Pathog*, *117*, 304-309.
291. **Vassilyev**, D.G., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Morikawa, K., y Igarashi, K. (1998). Crystal structure and mutational analysis of the *Escherichia coli* putrescine receptor: structural basis for substrate specificity. *J Biol Chem*, *273*, 17604–17609.
292. **Veyrier**, F., Saïd-Salim, B., y Behr, M.A. (2008). Evolution of the mycobacterial sigK regulon. *J Bacteriol*, *190*, 1891–1899.
293. **Viana**, M.V.C., Figueiredo, H., Ramos, R., Guimares, L.C., Pereira, F.L., Dorella, F.A., Salah, A., y otros. (2017). Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. *PLoS ONE*, *12*(4), e0176347.
294. **Vojtek**, I., Buchy, P., Doherty, M., y Hoet, B. (2019). Would immunization be the same without cross-reactivity?. *Vaccine*, *37*, 539–549.
295. **Von-Graevenitz**, A. y Bernard, K. (2006). The Genus *Corynebacterium*-Medical. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Ed.) *The Prokaryotes*. New York, USA: Springer.
296. **Walker**, J., Jackson, H.J., Wilson, M.J., Eggleton, D.G., Meeusen, E. N. T., y Brandon, M.R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect Immunol*, *62*, 2562–2567.
297. **Walker**, J., Wilson, M.J., y Brandon, M.R. (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immunol*, *63*, 206–11.
298. **Wattam**, A.R.J., Davis, J., Assaf, R., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., y otros. (2017). Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res*, *45*, 535–542.
299. **Welsh**, R. M. (2009). Blimp hovers over T cell immunity. *Immunity*, *31*(2), 178–180.
300. **Wernery**, U., y Kinne, J. (2016). Caseous Lymphadenitis (Pseudotuberculosis) in Camelids: A Review. *Austin J Vet Sci & Anim Husb*, *3*(1), 1022.
301. **Wherry**, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. y Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, *77*, 4911–4927.
302. **Williamson**, L.H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. En: Update on Small Ruminant Medicine, *Vet Clin NA: Food Anim Pract*, *17*(2), 359-371.
303. **Windsor**, P. (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Vet Med (Auckl)*, *5*, 11-22.
304. **Windsor**, P.A., y Bush, R.D. (2016). Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? *Small Rumin Res*, *142*, 6-10.
305. **Wojciechowski**, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H. L., Katz, J. D., Finkelman, F. D., y Hildeman, D. A. (2007). Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *J Expe med*, *204*(7), 1665–1675.

306. **Xu, W.X.**, Wang, J., Tang, H.P., Chen, L.H., Lian, W.B., y otros. (2017). A simpler and more cost-effective peptide biosynthetic method using the truncated GST as carrier for epitope mapping. *PLOS ONE*, 12(10), e0186097.
307. **Yang, J.**, y Yang, S. (2017). Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: a new perspective for the industrial production of amino acids. *BMC Genomics*, 18, 940.
308. **Yao, B.**, Zheng, D., Liang, S., y Zhang, C. (2013). Conformational B-Cell Epitope Prediction on Antigen Protein Structures: A Review of current algorithms and comparison with common binding site prediction methods. *PLoS ONE*, 8(4), e62249.
309. **Zaharieva, N.**, Dimitrov, I., Flower, D.R., Doytchinova, I. (2017). Immunogenicity prediction by VaxiJen: A ten year overview. *J Proteomics Bioinform*, 10, 298-310.
310. **Zambonelli, C.**, Casali, M., y Roberts, M.F. (2003). Mutagenesis of putative catalytic and regulatory residues of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D differentially modifies phosphatase and phosphodiesterase activities. *J Biol Chem*, 278(52), 52282-52289.
311. **Zambonelli, C.**, y Roberts, M.F. (2005). Non-HKD phospholipase D enzymes: new players in phosphatidic acid signaling?. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 79, 133-181.
312. **Zhang, N.**, y He, Y.W. (2005). The antiapoptotic protein Bcl-xL is dispensable for the development of effector and memory T lymphocytes. *J Immunol*, 174(11), 6967-6973.
313. **Zhou, Z.**, Li, H., Zhang, M., Wang, Z., Zhou, R., Hu, S., Li, X., Song, X., y Zhu Z. (2016). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain XH02 isolated from a Boer goat in Xuanhan, China. *Genome Announc*, 4(6), e01329-16.
314. **Zhou, Z.**, Yang, H., Li, H., Li, X., Wu, B., Tian, S., Wu, J., Wang, Z., y Hu, S. (2019). Sodium butyrate ameliorates *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in RAW264.7 macrophages and C57BL/6 mice. *Microbial Pathogen*, 131, 144–149.
315. **Zoetis**, 2020. Zoetis Spain, S.L. Avda. de Europa 20 B, Parque Empresarial La Moral. [https://www.zoetis.es/\\_locale-assets/spc/biodectin.pdf](https://www.zoetis.es/_locale-assets/spc/biodectin.pdf). Acceso Abril, 2020.