

# VACUNOLOGÍA REVERSA: APLICACIONES EN EL ESTUDIO DE CANDIDATOS VACUNALES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

REVERSE VACCINOLOGY:  
APPLICATIONS IN  
VACCINE CANDIDATES  
AGAINST *Corynebacterium  
pseudotuberculosis ovis*

Nango-Lechuga MJ,<sup>1</sup> Rodríguez-Domínguez MC,<sup>1\*</sup> Velázquez-Ordoñez V,<sup>1</sup>  
Montes de Oca-Jiménez R,<sup>1</sup> Tenorio-Borroto E<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, México.

\* Autor de correspondencia: mariacariarodriguezdominquez@gmail.com

## RESUMEN

La bioinformática ha emergido como un campo importante que actúa como una intersección entre la biología experimental y los enfoques computacionales. Una de las aplicaciones que se ha derivado de esta área es la vacunología reversa, la cual 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 basados en el uso de programas predictivos, antes de evaluar experimentalmente posibles candidatos vacunales. La vacunología reversa ha sido utilizada en el estudio de las características moleculares de la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, agente causal de la Linfadenitis caseosa, enfermedad de importancia mundial para la producción de pequeños rumiantes y la salud pública por considerarse una zoonosis. El presente trabajo pretende establecer diferentes técnicas bioinformáticas que se han utilizado para estudios de vacunología reversa y sus aplicaciones en el análisis de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, destacando su uso en el diseño de vacunas contra la Linfadenitis caseosa.

**Palabras clave:** Bioinformática, vacunología reversa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenitis Caseosa.

## Abstract

Bioinformatics has emerged as an important field that acts as an intersection between experimental biology and computational approaches. One of the applications that has been derived from this area is Reverse vaccinology. This analyzes the genome or amino acid sequences to identify proteins or peptides with immunogenic potential. These bioinformatic tools represent an advantage since they allow obtaining results based on the use of predictive programs before experimentally evaluating possible vaccine candidates. Different tools have been used in the study of the molecular characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, a bacterium that causes Caseous Lymphadenitis, a worldwide disease that affects small ruminants and public health as it is considered a zoonosis. The present work aims to establish the different bioinformatic techniques that have been used in the analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, highlighting their use in the design of vaccines against Caseous Lymphadenitis.

**Key words:** Bioinformatics, reverse vaccinology, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous Lymphadenitis.

## INTRODUCCIÓN

Las herramientas bioinformáticas son ampliamente utilizadas para caracterizar a 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).

Los estudios de vacunología reversa se enfocan en el análisis *in silico* primero del genoma 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 antígenos 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 para 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; Chandra et al., 2010; Droppa-Almeida et al., 2018).

Algunos de estos programas bioinformáticos se han aplicado en el estudio *in silico* de antígenos vacunales contra *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* (Droppa-Almeida et al., 2018; Araújo et al., 2019), bacteria agente causal de la Linfadenitis Caseosa, enfermedad que afecta a pequeños rumiantes (Mahmood et al., 2015; Odhah et al., 2019), ocasionando importantes pérdidas económicas relacionadas con

desordenes reproductivos, el decomiso de las visceras, rechazo de pieles y lana.

Actualmente existen vacunas comerciales disponibles para el control de esta enfermedad, cuya protección está asociada a la producción de anticuerpos anti-exotoxina PLD fundamentalmente, los cuales protegen contra el daño tisular y la diseminación del microorganismo; sin embargo, es una protección parcial, ya que estas vacunas aún son deficientes en eliminar las bacterias intracelulares (Bastos et al., 2012; de Pihno et al., 2021). Por tales motivos diferentes grupos de investigadores trabajan en el desarrollo de vacunas experimentales que permitan una protección completa y eficaz. En este sentido, la vacunología reversa desempeña un papel principal en la selección de nuevos antígenos como posibles candidatos vacunales.

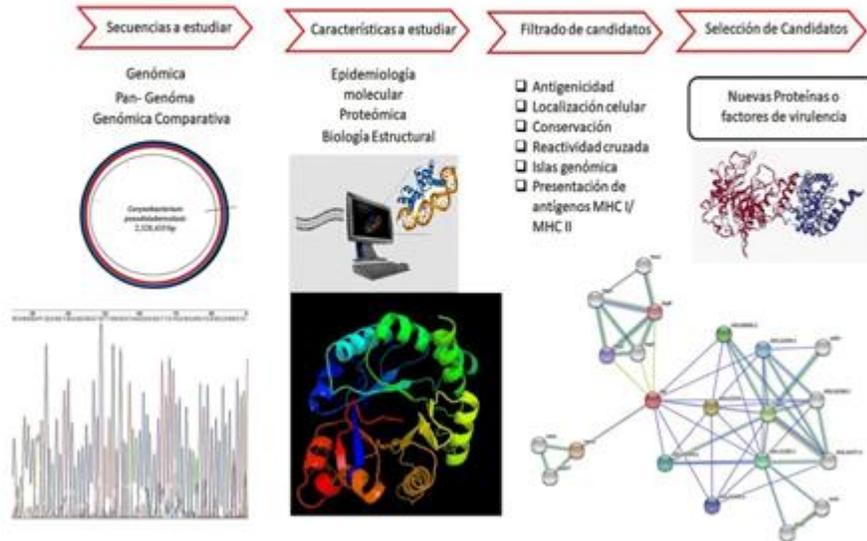
El presente artículo tiene como objetivo indagar sobre el uso de diferentes programas bioinformáticos en el estudio de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la identificación y desarrollo de nuevas vacunas experimentales.

## Vacunología Reversa

Uno de los enfoques más dinámicos de la biotecnología es la vacunología reversa (VR), que desempeña un papel importante en el desarrollo de las vacunas actuales. La VR utiliza herramientas informáticas, como la inteligencia artificial, el auto-aprendizaje y datos ómicos, para el estudio primero del genoma, luego el análisis de las moléculas posibles candidatos en base a sus características físico-químicas, y por último, la comparación de estas con resultados disponibles en las bases de datos, con la integración de la información mediante el uso de programas que estiman los antígenos que tendrán mayor efectividad en una formulación vacunal (Soria-Guerra et al., 2015). El primer enfoque exitoso de vacunología reversa se observó en el estudio de candidatos vacunales para *Meningococcus* serogrupo B (Christensen et al., 2013), lo cual revolucionó todo el campo de la biología computacional.

La aplicación de tecnologías genómicas en la investigación de vacunas mediante el uso de la VR representó un gran avance para el proceso de descubrimiento de nuevas vacunas. Al determinar todo el repertorio genómico de un agente patógeno, los investigadores pudieron identificar objetivos protectores y diseñar vacunas eficaces donde los enfoques convencionales habían fallado (Pereira et al., 2020). Para el estudio de candidatos vacunales mediante VR se consideran primeramente los estudios de genómica, luego con las secuencias objeto de estudios se pueden aplicar enfoques epidemiológicos, proteómicos o estructurales y por último se utilizan algoritmos computacionales que

Figura 1. Esquema de pasos en el estudio de vacunología reversa



Enfocados primero en el análisis in silico del genoma usando predictores genéticos (A), luego el proteoma (B) y finalmente el análisis de las características de cada proteína por separado (C, D).  
Fuente: Elaboración propia.

facilitan la predicción de características específicas de los antígenos posibles candidatos vacunales (figura 1).

El uso de VR inició una cascada de cambios que afectaron todo el proceso de desarrollo de vacunas, cambiando el enfoque de la identificación de una lista de vacunas candidatas a la definición de un conjunto de pantallas de alto rendimiento para reducir la necesidad de pruebas costosas y laboriosas en modelos animales (Dalsass et al., 2019). Una comprensión profunda de la epidemiología de las vacunas candidatas, y su regulación y papel en las interacciones hospedero-patógeno, debe convertirse en un componente integral del flujo de trabajo de detección. Lejos de estar obsoleto por los avances tecnológicos, la VR aún representa un paradigma de cómo las tecnologías de alto rendimiento y el conocimiento científico pueden integrarse en la investigación biotecnológica.

#### Programas Bioinformáticos de análisis de VR

Los programas de VR 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 (Michalik et al., 2016). 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 preclí-

nicos, 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).

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

Cuadro 1. Programas basados en algoritmos de Árbol de decisión o Aprendizaje automático, ventajas y desventajas

Programa	Tipo de Algoritmo	Criterio de selección	Ventaja	Desventaja
Nerve	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Alta probabilidad de adhesina Sin homología con proteínas humanas	Los datos de entrada y salida son automáticamente estructurados en base de datos	No actualizado
Vaxijen	Aprendizaje automático (Machine-learning)	Probabilidad de resultados por encima del valor de corte establecido a (0.5)	Interfaz gráfica muy rápida	Conjuntos de datos de entrenamiento fijos (100 antígenos bacterianos conocidos, 100 no antígenos)
Vaxign	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Alta probabilidad de adhesina Sin homología con humanos y proteínas de ratón	Mantenimiento regular Fácil de usar e intuitivo	La descarga de los resultados es limitado a 500 proteínas
Jenner-predict	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Presencia de dominios Pfam involucrados en la interacción huésped-patógeno y Patogénesis	Carga y descarga de grandes conjuntos de datos	A veces no disponible
VacSol	Árbol de decisión	Sin proteína citoplasmática <2 hélices transmembrana Sin homología con proteínas humanas, Gen esencial Factor de virulencia	Interface fácil de usar	Resultados restrictivos
Bowman-Heinson	Aprendizaje automático (Machine-learning)	Probabilidad de resultados por encima del valor de corte establecido a (0.5)	Conjunto de entrenamiento más grande (200 antígenos bacterianos conocidos, 200 supuestos no antígenos)	Herramientas de anotación para eucariotas

Fuente: Elaboración propia.

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

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 abortus*, *Leptospira interrogans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Anaplasma marginale* y *C. pseudotuberculosis* (Zaharieva et al., 2017).

Las herramientas para identificar epitopos de células B se dividen en aquellas que dependen de la información de la estructura primaria e identifican epitopos continuos, lineales, así como las que dependen de información

de la estructura secundaria y predicen epitopos 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 epitopos continuos (lineales), pero son menos eficientes en la identificación de epitopos discontinuos. Para superar esta deficiencia se han 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 receptor-antígeno 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. La página web IEDB (por sus siglas en inglés, *Immune Epitope Database and Analysis Resource*) proporciona una compilación actualizada regularmente, de epitopos 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 (Fleri et al., 2017). Las he-

rramientas disponibles se clasifican en dos categorías: de análisis y predicción. Las herramientas de análisis incluyen agrupación de epitopos, conservación de secuencias y más, mientras que las de predicción cubren la unión a epitopo de células T y B, la inmunogenicidad y las estructuras TCR/BCR. Permite la identificación de epitopos 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. Además de estas herramientas, también se conecta con diferentes servidores que permiten una comparación de los resultados, lo cual mejora el rendimiento de la aplicación (Dhanda et al., 2019; Martini et al., 2020).

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 epitopos 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).

Cuadro 2. Criterios de selección de candidatos vacunales en función de las características de las proteínas

Características de las proteínas	Programas	NERVE	Vaxign	Jener-predict	VacSol	Bowman-Helinson
Localización subcelular	Psortb	x	x	x	x	
	TargetP					x
Dominios de Transmembranas	HMATOP	x	x	x	x	
Dominios patogénicos o factores de virulencia	SPAAN	x	x			
	Pfam			x		
	VFDB				x	
Similitud con proteínas del hospedero	LipoP					x
	BLASTp / MHCPEP db	x				
	BLASTp / RefSeq / Swiss Protodb				x	
Respuesta de células B-T	OrthoMCL		x			
	NetMhc					x
	Vaxitope		x			
	ABCpred				x	
	ProPred -I				x	
	ProPred				x	
	GPS-MBA					x
PickPocket					x	

Modificación post-traduccional	YinOYang (glicosilación)					x
	NetPhosK (fosforilación)					x
	ProP (cortes en proteínas, autoproteasas)					x

Fuente: Elaboración propia.

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. En el cuadro 2 se muestran algunos de los criterios de selección de candidatos vacunales en función de diferentes características de las proteínas.

Un estudio comparativo entre los programas NERVE, Vaxign, VaxiJen, Jenner-predict, Bowman-Heninson, 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 con 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.

### Vacunología reversa para *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Numerosos estudios de vacunología reversa 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 reversa 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) derivados de las secuencias 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 VR con los programas Surf+ y Vaxign se realizó para predecir nuevos antígenos que pueden ser empleados en el desarrollo de una vacuna con ambos tipos de biovar *ovis* y *equi* (Soares et al., 2013a). Este mismo grupo de investigadores 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 (Rouli 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., 2013b).

Diferentes proteínas identificadas como posibles factores de virulencia SpaC, SodC, NanH y PknG han sido analizadas usando inmunoinformática, con el programa VaxiJen. En el trabajo de Santana y colaboradores se descubrió que SpaC, PknG y NanH presentan mejor potencial para el desarrollo de una vacuna que SodC (Santana-Jorge 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. Estos receptores inducen la activación del factor de transcripción nuclear B (NF- $\kappa$ B), lo cual favorece el desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria y la proliferación de leuco-

citosis de linaje mieloides. 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 inmunostimulante 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 VR 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= antigénicidad=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 (ftsL=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 antigénicidad, el potencial alergénico, la predicción de los epítomos B, la unión a los receptores MHC y el acoplamiento en el receptor Toll-Like 2 fueron propiedades evaluadas *in silico* para la proteína de fusión PLD-CP40-maltosa. El análisis *in silico* demostró que PLD-CP40-maltosa tiene potencial inmunogénico, no tiene propiedades alérgicas y puede acoplarse al receptor TLR2 (Barral et al., 2022).

## CONCLUSIONES

Las vacunas tienen un impacto significativo en la salud pública y en la salud animal, y la vacunología en la era de la bioinformática está aprovechando las nuevas tecnologías para abordar enfermedades para las que el desarrollo de vacunas no ha tenido éxito hasta la fecha. La mayoría de las vacunas que existen disponibles en el mercado fueron desarrolladas sobre la base de métodos vacunales tradicionales, que se basaban en la detección empírica de unos pocos candidatos a la vez, en función de las características conocidas del patógeno. Sin embargo, la capacidad de secuenciar el genoma de un patógeno proporciona acceso a todo su repertorio antigénico, catalizando un cambio en el desarrollo de vacunas hacia enfoques de "vacunología reversa" basados en el análisis *in silico* de genes que codifican proteínas con los atributos de buenos objetivos de vacunas. Además, la creciente disponibilidad de secuencias genómicas ha llevado al desarrollo y la aplicación de tecnologías adicionales para el descubrimiento de vacunas, incluidas la genómica comparativa, la transcriptómica, la proteómica, la inmunómica y la genómica estructural. Candidatos vacunales identificados a partir del genoma o proteoma de un patógeno pueden expresarse luego como proteínas recombinantes y analizarse siguiendo métodos *in vitro* o modelos *in vivo* para evaluar la inmunogenicidad y la protección. En esta revisión se presentamos un resumen de diferentes programas utilizados en la vacunología reversa, y su enfoque en el estudio de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, desde la identificación de diferentes características de las moléculas que permiten su análisis como candidatos con potencial inmunogénico, explorando las ventajas, limitaciones y elementos necesarios de este enfoque.

## REFERENCIAS

- Araújo, C.L., Alves, J., Nogueira, W., Pereira, L.C., Gomide, A.C., Ramos, R., Azevedo, V., Silva, A., Folador, A. (2019). Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene*, (702):36-45. doi: 10.1016/j.gene.2019.03.049.
- Barral, T.D., Kalil, M.A., Mariutti, R.B., Arni, R.K., Gismene, C., Sousa, F.S., Collares, T., Seixas, F.K., Borsuk, S., Estrela-Lima, A., Azevedo, V., Meyer, R., Portela, R.W. (2022). Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP: PLD: CP40 fusion protein. *Appl Microbiol Biotechnol*.1-17. doi: 10.1007/s00253-022-12279-1.
- Bastos, B.L., Dias, P.R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic*, (4): 1-15. doi: 10.4172/2155-9899.S4-005.
- Chandra, S., Singh, T.R., 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): 151-166. doi: 10.6026/97320630005155.
- Christensen, H., Hickman, M., Edmunds, W.J., 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. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.034.
- Dalsass, M., Brozzi, A., Medini, D., Rappuoli, R. (2019). Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery. *Front Immunol*, (10): 113. doi: 10.3389/fimmu.2019.00113.
- Dhanda, S.K., Mahajan, S., Paul, S., Yan, Z., Kim, H., Jespersen, M.C., Jurtz, V., Andreatta, M., Greenbaum, J.A., Marcatili, P., Sette, A., Nielsen, M., Peters, B. (2019). IEDB-AR: immune epitope database-analysis resource in 2019. *Nucleic Acids Res*, 47(W1): W502-W506. doi: 10.1093/nar/gkz452.
- de Pinho, R.B., de Oliveira Silva, M.T., Bezerra, F.S.B., Borsuk, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(6): 2287-2296. doi: 10.1007/s00253-021-11191-4.
- 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. doi: 10.1186/1471-2105-8-4.
- Doytchinova, I.A., Flower, D.R. (2008). Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. *Open Vaccine J*, 1(1): 22-26. doi:10.2174/1875035400801010022.
- 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*, 14(12): 1-9. <https://doi.org/10.1177/1177932218755337>.
- 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*, 14(8): 278. doi: 10.3389/fimmu.2017.00278.
- Flower, D.R., Davies, M.N., Doytchinova, I.A. (2015). *Identification of candidate vaccine antigens in silico*, Springer. New York, USA, pp. 39-71.
- Franco, E.F., Rana, P., Queiroz Cavalcante, A.L., da Silva, A.L., Cybelle Pinto Gomide, A., Carneiro Folador, A.R., Azevedo, V., Ghosh, P. T. J., Ramos, R. (2020). Co-Expression Networks for Causal Gene Identification Based on RNA-Seq Data of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Genes* (Basel), 11(7): 794. doi: 10.3390/genes11070794.
- Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T. (2014). (2014). Vacceed: a high-throughput *in silico* vaccine candidate discovery pipeline for eukaryotic pathogens based on reverse vaccinology. *Bioinformatics*, 30(16): 2381-2383. doi: 10.1093/bioinformatics/btu300.
- He, Y., Xiang, Z., Mobley, H.L. (2010). Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol*, 297505. doi: 10.1155/2010/297505.
- Jespersen, M.C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*, 45(W1): W24-W29.
- Mahmood, Z.K.H., Jesse, F.F., Saharee, A.A., Jasni, S., Yusoff, R., 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. doi: <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2015.112.132>.
- Martini, S., Nielsen, M., Peters, B., Sette, A. (2020). The Immune Epitope Database and Analysis Resource Program 2003-2018: reflections and outlook. *Immunogenetics*, 72(1-2): 57-76. doi: 10.1007/s00251-019-01137-6.
- Michalik, M., Djahanshiri, B., Leo, J.C. y Linke, D. (2016). Reverse Vaccinology: The Pathway from Ge-

- nomes and Epitope Predictions to Tailored Recombinant Vaccines. En: Sunil, T. (Ed.). Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1. USA.
- Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Mahmood, Z., Wahid, H.A., Mohd, L.M.A. (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. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103628.
- Ong, E., Wang, H., Wong, M.U., Seetharaman, M., Valdez, N., He, Y. (2020). Vaxign-ML: supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. *Bioinformatics*, 36(10): 3185-3191. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa119.
- Pereira, R., Oliveira, J., Sousa, M. (2020). Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med*, 9(1):132. doi: 10.3390/jcm9010132.
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P.E., Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes New Infect*, (7): 72-85. doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.005.
- Santana-Jorge, K.T., Santos, T.M., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., Souza, R.F., Mariutti, R.B., Eberle, R.J., Arni, R.K., Portela, R.W., Meyer, R., Azevedo, V. (2016). Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb Cell Fact*, (15): 83. doi: 10.1186/s12934-016-0479-6.
- Santos, A.R., Carneiro, A., Gala-García, A., Pinto, A., Barh, D., Barbosa, E., Aburjaile, F., Dorella, F., Rocha, F., Guimarães, L., Zurita-Turk, M., Ramos, R., Almeida, S., Soares, S., Pereira, U., Abreu, V.C., Silva, A., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2012). The *Corynebacterium pseudotuberculosis* *in silico* predicted pan-exoproteome. *BMC Genomics*, 13 Suppl 5(Suppl 5): S6. doi: 10.1186/1471-2164-13-S5-S6.
- Soares, S.C., Trost, E., Ramos, R.T., Carneiro, A.R., Santos, A.R., Pinto, A.C., Barbosa, E., Aburjaile, F., Ali, A., Diniz, C.A., Hassan, S.S., Fiaux, K., Guimarães, L.C., Bakhtiar, S.M., Pereira, U., Almeida, S.S., Abreu, V.A., Rocha, F.S., Dorella, F.A., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., Tauch, A. (2013a). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *J Biotechnol*, 167(2): 135-141. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.11.003.
- Soares, S.C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A., Ali, A., Santos, A.R., Pinto, A.C., Diniz, C., Barbosa, E.G., Dorella, F.A., Aburjaile, F., Rocha, F.S., Nascimento KK, Guimarães LC, Almeida S, Hassan SS, Bakhtiar SM, Pereira UP, Abreu V.A., Schneider, M.P., Miyoshi, A., Tauch, A., Azevedo, V. (2013b). 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. doi: 10.1371/journal.pone.0053818.
- Soria-Guerra, R.E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D.O., Rosales-Mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J Biomed Inform*, (53): 405-414. doi: 10.1016/j.jbi.2014.11.003.
- Zaharieva, N., Dimitrov, I., Flower, D.R., Doytchinova, I. (2017). Immunogenicity prediction by VaxiJen: A ten year overview. *J Proteomics Biinform*, (10):298-310. doi:10.4172/JPB.1000454.