

Análisis de Investigaciones Agroforestales, Veterinarias y en Estadística



Fidel Avila Ramos
Sergio Martínez González
Editores

Análisis de Investigaciones Agroforestales, Veterinarias y en Estadística

**Fidel Avila Ramos
Sergio Martínez González
Editores**

Primera Edición 2023.

ABANICO ACADÉMICO-AMATE EDITORIAL

La presentación y disposición en conjunto de la obra:

Análisis de Investigaciones Agroforestales, Veterinarias y en Estadística en su primera edición, es publicada en versión electrónica con 281 páginas, después del proceso de arbitraje nacional e internacional. De acuerdo a la Ciencia Abierta puede ser reproducida o transmitida, mediante cualquier sistema o método, electrónico o mecánico, con fines académicos y sin fines de lucro.

Fidel Avila Ramos
Sergio Martínez González
Editores

Todos los derechos reservados a:
Abanico Académico. abanicoacademico.mx
RFC MAGS690517979
Mina 262, Colonia Centro. Tepic, Nayarit, México.
CP. 63000. Interior CENAYSIGLO21.
+52 311 1221626

ABANICO ACADÉMICO-AMATE EDITORIAL

Guadalajara, México, 2023.

Primera edición

ISBN: 978-607-59961-5-8
DOI: <https://doi.org/10.21929/abanico/2023.1>

EDITORES

Fidel Avila Ramos



Doctor por el Colegio de Postgraduados Campus Montecillos. Profesor de Tiempo Completo en el Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guanajuato, México. Reconocimiento Perfil PRODEP-SEP desde el año 2016 y del Sistema Nacional de Investigadores-CONACYT de México desde el 2021-2025. Editor Asociado Abanico Veterinario. Factor Total del Investigador-AI 0.5679

Sergio Martínez González



Doctor por la Universidad de Colima, México. Profesor Investigador de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit, México. Cuenta con Reconocimiento al Perfil PRODEP-SEP desde 2005 y del Sistema Nacional de Investigadores-CONACYT de México de 2018 al 2024. Estancia Posdoctoral en la Universidad Arkansas USA del 2019 al 2020. Editor de la revista Abanico Veterinario. Factor Total del Investigador-AI 1.0867

CUERPO DE ARBITRAJE

Mtra. Estefanía Aguirre Arroyo	Universidad de Guanajuato
Dr. Carlos Martín Aguilar Trejo	Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON)
Dr. Fidel Avila Ramos	Universidad de Guanajuato
Dr. Francisco Aguilar Romero	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Mtro. Iván Isaías Ávalos Rosario	Universidad de Guelph
Dr. Javier Piloni Martini	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Dr. Jesús Hernández Ruíz	Universidad de Guanajuato
Dr. José B. Castillo Caamal	Universidad Autónoma de Yucatán
Dr. José Carmen Ramírez Ramírez	Universidad Autónoma de Nayarit
Dr. José Luis Zárate Castrejón	Universidad de Guanajuato
Dr. José Luis Ponce Covarrubias	Universidad Autónoma de Guerrero
Dra. Juana Fonseca González	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Dr. Lenin Rangel López	Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Dra. Lilia Mexicano Santoyo	Universidad de Guanajuato
Dra. Luz Elena Alcaraz Sosa	Universidad Autónoma Metropolitana
Dra. Maricela Ruiz Ortega	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Mtro. Mauricio Arredondo Castro	Universidad de Guanajuato
Dr. Miguel Ruiz Albarrán	Universidad Autónoma de Tamaulipas
Dr. Oscar Guadalupe Barrón Bravo	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Dra. Talina Olivia Martínez Martínez	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Dra. Yuridia Bautista Martínez	Universidad Autónoma de Tamaulipas



Índice general

Investigaciones Agroforestales.....	6
Agua electrolizada: producción y usos.....	7
<i>Tarsicio Medina Saavedra, Lilia Mexicano Santoyo, Adriana Mexicano Santoyo, Tania Patricia Castro Jacome, María Isabel García Vieyra, Damián Salvador Rangel Campos</i>	
Elaboración de cerveza artesanal con miel de abeja.....	17
<i>César Octavio Ibarra Gudiño, Wilbert Alfredo Flores del Real, Rosa Isela Lepe Aguilar, Carlos Omar De la Cruz Moreno, Juan José Fernando Borrayo González</i>	
Marco conceptual de la sustentabilidad de los recursos naturales.....	25
<i>Rubén Cornelio Montes Pérez</i>	
Potencial de los microorganismos de montaña para usarlos como probióticos...	44
<i>Tarsicio Medina Saavedra, Lilia Mexicano Santoyo, Gabriela Arroyo Figueroa, Carlos Herrera Mendez, Emmanuel Pérez Hernández, Juan Picazo Ramírez</i>	
Potencial bioenergético de <i>Agave cupreata</i>	53
<i>Vianey Moreno Dimas, Dolores Vargas Álvarez, Antonio Cortés Guzmán, Roxana Reyes Ríos, Flaviano Godínez Jaime</i>	
Presencia de áfidos en cultivos tropicales.....	60
<i>Miguel Ángel Ramírez Guillermo, Sabel Barrón Freyre, Mario Rodríguez Cuevas, Dante Sumano López, Izamar López Domínguez</i>	
Investigaciones en Estadística.....	70
Cálculo de la potencia de la muestra.....	71
<i>Bladimir Peña Parra, Juan José Fernando Borrayo, Sergio Martínez González, Carlos de la Cruz Moreno, Socorro Salgado Moreno, Francisco Escalera Valente</i>	
Métodos estadísticos y su aplicación en las investigaciones científicas.....	81
<i>Magaly Herrera Villafranca, Yolaine Medina Mesa, Mildrey Torres Martínez, Yanelly García Ávila, Saraí Gómez Camacho</i>	
Investigaciones Veterinarias.....	94
Efecto del ácido acetilsalicílico en vacas frescas de doble propósito en condiciones tropicales.....	95
<i>Miguel Ángel Lammoglia Villagómez, Jorge Luis Chagoya Fuentes, Daniel Sokani Sánchez Montes, Amalia Cabrera Núñez, Javier Cruz Huerta Peña, Edelmira Jácome-Sosa</i>	
Efecto del estrés en ovinos durante el proceso de matanza.....	102
<i>Enrique Daniel Archundia Velarde, Gisela Velázquez Garduño, Jorge Osorio Avalos, María Mariezcurrena Berasain, Lizbeth Guadalupe Verduzco León</i>	
El potencial uso de la herbolaría en la medicina veterinaria.....	116
<i>Sergio Martínez González, Fidel Ávila Ramos, Mauricio Arredondo Castro, Gerardo Uriel Bautista Trujillo, Carlos Enrique Ibarra Martínez, Carlos Alfredo Carmona Gasca</i>	
Enteroparasitosis en caninos y felinos.....	127
<i>Socorro Marisa Salgado Moreno, Adriana Elizabeth Sesate Flores, Ruth Baudella Vironchi Lujan, Carlos Alfredo Carmona Gasca, Raúl Hassan Adad Figueroa, Sergio González Martínez, Bladimir Peña Parra</i>	



Evaluación del bienestar animal durante el entrenamiento de caninos.....	142
<i>Blayra Maldonado Cabrera, Guadalupe López Robles, Ramón Robles Zepeda, Manuel Nieblas López, Reyna Osuna Chávez, Víctor Alcaraz Serrano</i>	
Identificación in silico de la red de interacción de factores de virulencia PLD y CP40 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> aislado mexicano 2JL.....	155
<i>Roberto Montes de Oca Jiménez, María Carla Rodríguez Domínguez, Martha Elba Ruiz Riva Palacio</i>	
La enfermedad de Chagas: problemática emergente en el noroeste de México.....	168
<i>Paulina Haro Álvarez, Gilberto López Valencia, Gerardo Medina Basulto, Enrique Traviña Muñoz, Julio Alfonso Mercado Rodríguez, Carlomán Herrera Ramírez</i>	
Nutrición y alimentación de las abejas melíferas.....	180
<i>Mauricio Arredondo Castro, Diana Angélica Gutiérrez Arenas, Carlos Alfredo Camona Gasca, Henry Loeza Concha, Arturo Ángel Hernández, Fidel Avila Ramos</i>	
Parámetros genéticos en características de conformación en cabras lecheras...	190
<i>Alma Arianna Lechuga Arana, Vielka Jeanethe Castañeda Bustos, César Andrés Ángel Sahagún, Mauricio Valencia Posadas</i>	
Parásitos en bovinos de unidades de producción familiar de Llera de Canales, Tamaulipas.....	203
<i>Oscar Guadalupe Barrón Bravo, Ricardo Avilés Ruiz, Rubén Darío Garza Cedillo, César Andrés Ángel Sahagún</i>	
Parásitos gastrointestinales en bovinos de la Costa Sur de Jalisco, México.....	219
<i>Shasta Danaé Chávez Radillo, Ricardo Vicente Pérez, Pedro Fabián Grifaldo Alcántara, Enrique Octavio García Flores, Ricardo Martínez Martínez, Ulises Macías Cruz</i>	
Probióticos acelulares en la salud animal.....	229
<i>Pamela Izaret Pérez Martínez, Cristal Dafne Lonngi Sosa, Hugo Ramírez Álvarez, Cynthia González Ruiz</i>	
Relación entre el estado metabólico y funcionamiento del eje reproductivo del cerdo.....	239
<i>Juan Manuel Romo Valdez, Ignacio Peralta Gómez, Laura Francisca Espinoza Aguirre, Jesús José Portillo Loera, Ana Mireya Romo Valdez, Javier Alonso Romo Rubio</i>	
Trazabilidad y calidad de la carne de res, su importancia en la salud pública.....	257
<i>Paulina Alejandra Ávila Baylon, Ana Isabel Mireles Arriaga, Griselda Maki Díaz, Carlos Häubi Segura, Theodor Duifhuis Rivera, José Antonio Hernández Marín</i>	
Úlcera gástrica en caballos cuarto de milla, manejo y práctica alimenticia.....	267
<i>Heriberto Rodríguez Frausto, Fabiola Rochín Berumen</i>	



Identificación *in silico* de la red de interacción de factores de virulencia PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislado mexicano 2JL

Roberto Montes de Oca Jiménez^{1*}, María Carla Rodríguez Domínguez¹, Martha Elba Ruiz Riva Palacio²

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. ²Plantel "Sor Juana Inés de la Cruz" de la escuela preparatoria. UAEM AMECAMECA, México. *tomojimenez@yahoo.com, mariaclararodriguezdominguez@gmail.com y meruizr@uaemex.mx

Introducción

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad bacteriana que afecta principalmente a pequeños rumiantes, cuyo agente causal es *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar *ovis*. La enfermedad se presenta de forma cutánea y/o visceral, siendo en la primera característica 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. 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. En el establecimiento de la infección se requiere de la adhesión a las células del hospedero, multiplicación intracelular, diseminación a otros tejidos y persistencia. Las proteínas PLD y CP40 constituyen factores de virulencia principales de *C. pseudotuberculosis ovis*, consideradas proteínas exportadas o secretadas por la bacteria, que 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. Aun se continúa con el estudio de los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, para establecer el conjunto de proteínas que participan en interacción para el establecimiento de la infección bacteriana.

En los últimos años la ovinocultura mexicana se ha fortalecido de manera considerable, por lo que las investigaciones se han dirigido al estudio de patógenos que afectan la producción de pequeños rumiantes. La Linfadenitis caseosa es una enfermedad que se encuentra presente en el territorio mexicano y es considerada una de las enfermedades infecciosas económicamente más importantes que afecta la producción ovina y caprina. En México diversos estudios han demostrado la presencia de la LAC en los rebaños ovinos y caprinos en diferentes regiones del país. 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%. También se ha realizado la secuenciación del genoma completo de seis cepas de origen mexicano, de diferentes biovares, aisladas de diferentes hospederos, cuyas secuencias se encuentran reportadas en la base de datos del GenBank, donde el análisis filogenético agrupó cada una de las cepas 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* 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).

El estudio de *C. pseudotuberculosis ovis* para el establecimiento de factores virulencia, permite entender cuáles son las estructuras y moléculas que le confieren la capacidad a la bacteria para causar la enfermedad. Establecer la interacción de estas proteínas con otras moléculas de la bacteria aumenta las posibilidades de determinar posibles moléculas candidatas para el desarrollo de medios diagnósticos y vacunas.

***Corynebacterium pseudotuberculosis*: factores de virulencia**

C. pseudotuberculosis biovar *ovis* es una bacteria gran positiva, intracelular facultativa que tiene la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos. Presenta una morfología coco-bacilar con amplitud de 0.5-0.6 μm y 1.0-3.0 μm de longitud. Este microorganismo es un patógeno no flagelado, no forma esporas ni capsula y su contenido G+C es de aproximadamente 51 a 68%. Forma colonias opacas convexas, de color blanco grisáceo, con tamaño de 1mm a las 24 horas. La pared celular presenta ácidos micólicos (ácidos corynomicólicos) de aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono que se unen a una red de heteropolisacáridos formados por arabinogalactanos, glicolípidos y proteínas. La estructura lipídica formada por los ácidos corynomicólicos se considera un factor de virulencia de la bacteria que actúa como una barrera protectora y de permeabilidad selectiva. Un estudio histopatológico en ovejas infectadas con ácidos corynomicólicos, permitió detectar la formación de lesiones como congestión, degeneración y necrosis en los órganos reproductivos, así como también se ha evidenciado el aumento de haptoglobina y amiloide sérico A 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.

La bacteria presenta el operón (fag ABCD) con genes que codifican para proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, actividad que favorece la supervivencia de la



bacteria en el hospedero El gen *fag A* codifica para la proteína integral de membrana (Fag A), el gen *fagB* para una enterobactina transportadora de hierro (Fag B), el gen *fagC* para una proteína de membrana citoplasmática de unión a ATP (FagC) y el gen *fagD* para una proteína siderófora de unión a hierro, todas consideradas de gran importancia para la virulencia de la bacteria.

La exotoxina Fosfolipasa D es considerada el factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis*. 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. La PLD es clasificada como una esfingomielinasa D, también conocida como esfingomielina fosfodieasterasa 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). El mecanismo de acción de la toxina 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. Aunque su acción no se ha considerado directamente hemolítica, se ha informado que es capaz de producir hemólisis sinérgica.

La proteína CP40 fue identificada en 1994 como antígeno con capacidad protectora contra la LAC. 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. Inicialmente fue descrita como enzima con actividad proteasa serina, pero en el 2016 se realizó un estudio donde se demostró que la actividad enzimática desarrollada por esta proteína es de endoglicosidasa mediadoras de la hidrólisis de enlaces glicosídicos.

El desarrollo de una infección experimental en ovinos 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. 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 cambió, 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. 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*. Ambas proteínas constituyen importantes factores de virulencia y potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas contra la LAC.

Otros factores de virulencia identificados en *C. pseudotuberculosis* son las proteínas relacionadas con la estructura del *pili*, el gen *spaC* que codifica para una proteína responsable del anclaje del *pili* a la pared celular permite 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. El gen *namH*, que codifica para una neuroaminidasa extracelular también ha sido detectado en cepas de *C. pseudotuberculosis*. Esta proteína pertenece 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. Por otra parte, 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, también ha sido identificada y secuenciada en cepas de este patógeno. 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. Debido al rol que desempeñan estas moléculas en el desarrollo de la patogenia y virulencia de la bacteria, se considera de suma importancia el estudio de la red de interacción que se establece entre estas moléculas, las cuales pueden estar involucradas en la adhesión, invasión, colonización, propagación dentro del hospedero, supervivencia en el interior de las células infectadas y la evasión del sistema inmune.

Linfadenitis Caseosa: Patogénesis

La enfermedad por lo general se presenta de forma cutánea y/o visceral siendo característica de la primera la formación de abscesos en nódulos linfáticos subcutáneos, los cuales son visibles y palpables a través de la piel. 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. 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. La bacteria ingresa al



hospedero a través de lesiones en la piel las cuales pueden ser provocadas debido al manejo inadecuado de los ovinos y caprinos. Laceraciones durante el corte de cola, marcaje de orejas, castración, esquila o en algunos casos lesiones generadas durante la alimentación con forraje espinoso que daña la mucosa oral, se asocian con la transmisión del microorganismo. 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. Se ven afectados con mayor frecuencia los nódulos mandibulares o parotidos y preescapulares de forma general. 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 y seca. El análisis histopatológico de abscesos ha permitido identificar 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. Las características clínicas incluyen, anemia, leucocitosis con neutrofilia y altos valores de fibrinógeno, aumento de inmunoglobulinas (IgG) y aumento de Interferón gamma (IFN- γ).

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 provoca el desarrollo de la forma visceral 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.

Red de interacción de factores de virulencia PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*

Las interacciones proteína-proteína tienen un papel fundamental en muchos procesos biológicos lo que dirige la investigación al estudio de los complejos macromoleculares abriendo nuevas vías para entender la patogénesis ocasionada por la bacteria y establecer nuevos diseños de vacunas.

Teniendo como referencia las secuencias de proteínas PLD y CP40 derivadas de la secuencia de nucleótidos de los genes *pld* (acceso: OL347711) y *cp40* (acceso: OL347712), de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* aislado 2JL de origen mexicano se estableció *in silico* la red de interacción de ambas proteínas mediante el empleo del programa bioinformático String (<https://string-db.org/>). Utilizando como parámetros la



detección de 50 y 20 interacciones y un valor de corte de alta confianza = 0.7, el programa permitió identificar interacciones según asociaciones físicas o funciones biológicas.

La proteína PLD comparte relación con proteínas del operón FAG ABCD (relacionado con la adquisición de hierro), proteína nanH (exosialidasa relacionada con actividad enzimática neuroaminidasa), proteínas de unión a ATP asociadas a membrana plasmática, proteínas que participan en el metabolismo de la bacteria y expresión de genes (ADL 11308.1) fundamentalmente (Figura 1).

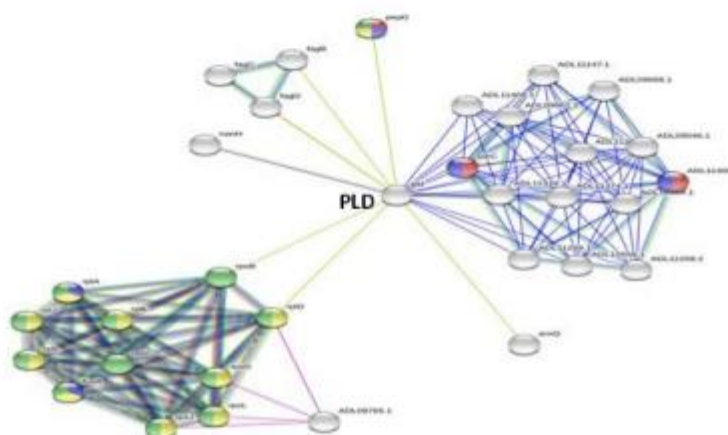


Figura 1. Red de interacción de la proteína PLD en relación con 50 interacciones para un valor de confianza de 0.7. En los círculos: el color amarillo se asocia con procesos metabólicos celulares, el color verde con expresión de genes, el color azul con regulación del metabolismo celular, el color rojo con regulación de actividad endopeptidasa y el color gris: no asociación o función establecida. En las líneas: el color amarillo se asocia con: mención en un mismo texto científico, el color azul oscuro: co-expresión de genes, verde: genes cercanos, rojo: genes fusionados, negro: co-expresión de proteínas, gris: proteínas homologas, azul claro: proteínas relacionadas en bases de datos y magenta: proteínas relacionadas experimentalmente.

La restricción de hierro provoca tasas de crecimiento bajas en patógenos bacterianos, lo que también puede estimular a estos organismos a inducir un mayor daño tisular, ya que la expresión de muchos factores de virulencia está regulada por el suministro de hierro en el ambiente. Se ha visto que la baja disponibilidad de hierro en cepas toxigénicas de *Corynebacterium diphtheriae*, afecta la expresión de proteínas y residuos de azúcar en la superficie de las células, así como su adherencia a eritrocitos B humanos y células HEp-2,



y se encontró que la producción de carbohidratos en la superficie de la pared celular está inversamente correlacionada con la concentración de hierro de los medios de cultivo.

La expresión de sialidasas, que funcionan como glicosil hidrolasas que catalizan la escisión de los residuos de ácido siálico terminal de una variedad de glicoconjugados, también se correlaciona con la depresión de hierro. Además, al presentar la bacteria en su superficie celular ácidos siálicos de la célula hospedera, estas pueden eludir la respuesta inmunitaria que de otro modo podría eliminar rápidamente una cepa no sializada.

También la proteína PLD estableció relación con el péptido serine proteasa, pepD (posible CP40), siendo según la escala de colores del tipo amarillo que se asocia con procesos metabólicos celulares, verde con expresión de genes, azul con regulación del metabolismo celular y rojo con regulación de actividad endopeptidasa.

Esta red de interacción ofrece información que indica que la exotoxina PLD, considerada factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis*, en su accionar se relaciona con otros factores de virulencia, que en su conjunto favorecen la virulencia de la bacteria. 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.

Esta proteína ha sido objeto de estudio como diana en el desarrollo de vacunas, siendo el antígeno principal en la mayoría de las vacunas comerciales actualmente disponibles para LAC. En vacunas de desarrollo experimental se ha evaluado en formulaciones inactivadas, atenuadas, de ADN y como proteína recombinante. Para vacunas de subunidades basadas en proteína PLD recombinante evaluadas en modelos murinos se ha observado un aumento significativo en la producción de anticuerpos IgG, con protección de los grupos vacunados ante el desafío con cepas virulentas. La formulación con la proteína rCP09720 (esterasa) o rCP01850 (proteína L14 de unión a la subunidad 50S) y la PLD obtenidas por vía recombinantes permitió una tasa de supervivencia después del desafío 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. Por lo que se sigue trabajando en la búsqueda de combinaciones de proteínas asociadas a la virulencia para establecer una formulación que aumente la eficacia en la protección.

La proteína CP40 establece relación principalmente con proteínas asociadas a adhesión celular y de unión a dominios de IgG (Figura 2).

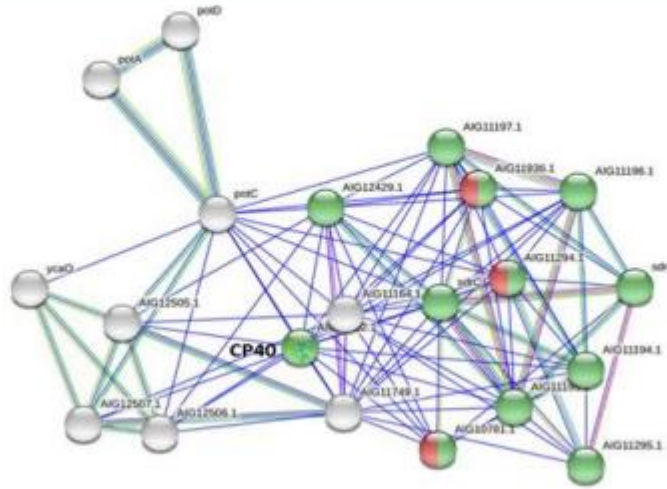


Figura 2. Red de interacción de la proteína CP40 en relación con 20 interacciones para un valor de confianza de 0.7. En los círculos: el color verde se asocia con unión a dominios de IgG, el color rojo dominios de adhesión y el color gris: no asociación o función establecida. En las líneas: el color amarillo se asocia con: mención en un mismo texto científico, el color azul oscuro: co-expresión de genes, verde: genes cercanos, rojo: genes fusionados, negro: co-expresión de proteínas, gris: proteínas homologas, azul claro: proteínas relacionadas en bases de datos y magenta: proteínas relacionadas experimentalmente.

La asociación con proteínas de adhesión indica que podría estar involucrada en la capacidad que presenta la bacteria para colonizar diferentes tipos de hospederos. *C. pseudotuberculosis* es intracelular facultativa y presenta la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, lo cual le permite propagarse y llegar al ganglio linfático más cercano del sitio inicial de infección, y una vez ahí se produce la formación de abscesos. Se plantea que la proteína PLD esta involucrada en el mecanismo por el cual la bacteria degrada la esfingomielina de la membrana del fagolisosoma y queda libre en el citoplasma de los macrófagos, donde también resiste la acción de los radicales libres del oxígeno y el nitrógeno, estando involucradas las enzimas Superóxido Dismutasas (SODs), Catalasas, y el Factor Sigma de la bacteria. 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. 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. La preincubación 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. En el sitio de ingreso de la bacteria, la capacidad de persistencia en células no fagocíticas, así como el factor piógeno (ácidos corynomicólicos de la pared celular) y la exotoxina Fosfolipasa D, 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.

La actividad enzimática desarrollada por la proteína CP40 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*. Se ha demostrado *in vitro* que la proteína CP40 es capaz de degradar la región Fc de anticuerpos IgG, no hidroliza los glicanos en las IgG bovinas y caprinas, mientras que si hidroliza la IgG ovina y la IgG equina. El contenido total de los carbohidratos en la IgG caprina, tales como grupos fucosilados, terminales galactosilados y oligosacáridos bisectantes es mucho más bajos que en los IgG humanos e IgG ovina por lo que la acción enzimática es más marcada en estos últimos.

Esta proteína también se ha utilizado como antígeno en el desarrollo de vacunas de subunidades 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.

En el modelo murino CP40 recombinante, con saponina como adyuvante, mostró 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. 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. 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.

Las investigaciones más recientes se han enfocado en la identificación de nuevas moléculas implicadas en los mecanismos de patogenicidad y virulencia de la bacteria 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.

Conclusiones

Las proteínas PLD y CP40 pueden estar relacionadas en interacciones de tipo funcionales y metabólicas. El uso de ambas proteínas en una formulación vacunal estaría direccionando la acción del sistema inmune sobre la acción de mecanismo o funciones bacterianas diferentes, lo cual representa una estrategia valiosa para el desarrollo de una vacuna.

Referencias

- Correa, J. I., Stocker, A., Castro, S.T., Vale, V., Brito, T., Bastos, B. (2018). *In vivo* and *in vitro* expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Express*, 8, 89. doi.org/10.1186/s13568-018-0598-z.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2287–2296. doi.org/10.1007/s00253-021-11191-4.



- Dorella, F. A., Pacheco, L. G., Oliveira S. C., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37(2), 201–218. doi.org/10.1051/vetres:2005056
- Hodgson, A. L. M., Bird, P., Nisbett, I. T. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 172, 1256–1261. doi.org/10.1128/jb.172.3.1256-1261.1990
- Ott, L. (2018). Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiology*, 4(1), 85-103. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.85
- Pacheco, L. G. C., Slade, S. E., Seyffert, N., Santos, A. R., Castro, T. L. P. (2011). A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiology*, 11, 12. doi.org/10.1186/1471-2180-11-12
- Paule, B. J., Meyer, R., Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Regis, L. F. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction / concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 34, 311–16.
- Rodríguez-Domínguez, M. C., Montes de Oca-Jiménez, R., Varela-Guerreo, J. A. (2021). Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(4), 1221-1249. https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5699
- Ruiz, J. C., D'Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., Pinto, A. C. (2011). Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*, 6, e18551. doi.org/10.1371/journal.pone.0018551
- Sá, M. A., Gouveia, G. V., Krewer, C., Veschi, J. L. A., Mattos-Guaraldi, A. L., Costa, M. M. (2013). Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 265-268. doi.org/10.1590/S1415-47572013005000013



- Seyffert, N., Silva, R. F., Jardim, J., Silva, W. M., Castro, T. L., Tartaglia, N. R. (2014). Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Veterinary Microbiology*, 174, 255–60. doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.024.
- Shadnezhad, A., Naegeli, A., Collin, M. (2016). CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a endo B-N- acetylglucosaminidase. *BMC Microbiology*, 63(1), 206-211. doi.org/10.1186/s12866-016-0884-3
- Silva, W. M., Dorella, F. A., Soares, S. C., Souza, G. H. M., Castro, T. L. P., Seyffert, N., Figueiredo, H. (2017). A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics I. *BMC Microbiology*, 17, 55. doi.org/10.1186/s12866-017-0925-6
- Soares, S. C., Trost, E., Ramos, R. T. J., Carneiro, A. R., Santos, A. R., Pinto, A. C., Barbosa, E. (2012). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *Journal of Biotechnology*, 167(2), 135-141. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.003
- Soares, S. C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., 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. doi.org/10.1371/journal.pone.0053818
- 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]. <http://hdl.handle.net/10553/17093>
- Varela, G. J. A., Montes de Oca, J. R., Acosta, J. D., Hernández, F. L., Morales, E. V., Monroy, S. G. H. (2018). First report of isolation and molecular characterization of the pathogenic *Corynebacterium pseudotuberculosis* from of sheep and goats in Mexico. *Microbial Pathogenesis*, 117, 304-309. doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.031



-
- Viana, M. V. C., Figueiredo, H., Ramos, R., Guimares, L. C., Pereira, F. L., Dorella, F. A., Salah, A. (2017). Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. *PLoS ONE*, 12(4), e0176347. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.003
- Walker, J., Jackson, H. J., Wilson, M. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. N. T., Brandon, M. R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect Immunol*, 62, 2562–2567. doi.org/10.1128/iai.62.6.2562-2567