



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“Análisis bioinformática del genoma de *Brucella melitensis*
biovar 1 cepa 16M para detectar proteínas con el potencial
de ser vacunas”**

Trabajo de investigación que para obtener el Título de
Maestro en Biotecnología

Presenta:

Lic. MVZ. Víctor Manuel Gómez Chimal

Director:

Dr. Cs . Yagul Pedraza Pérez

Codirector de tesis:

cDr. en Cs. Alfredo Cesar Benítez Rojas



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Maestría en Biotecnología



Universidad Popular del Autónoma del
Estado de Puebla
Centro Interdisciplinario de Posgrado
Investigación y Consultoría
Decanato de Ciencias Biológicas
Maestría en Biotecnología

**Análisis bioinformática del genoma de *Brucella melitensis* biovar 1 cepa
16M para detectar proteínas con el potencial de ser vacunas**
Tesis para obtener el Grado de Maestro en Biotecnología

Víctor Manuel Gómez Chimal

Dr. Yagul Pedraza Pérez

Director

cDr. Alfredo Cesar Benítez Rojas

Codirector

Dr. Elie Girigis El Kassis

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Dr. Yagul Pedraza Pérez

Por tus enseñanzas y consejos.

cDr. Alfredo Cesar Benítez

Por la paciencia y la confianza.

Amigos de la Tercera

Les quiero agradecer los consejos y las opiniones, pero sobre todo, el apoyo que siempre percibí de ustedes, mis estimados amigos, con quienes compartí tan poco tiempo y si embargo más fútiles han sido muchos otros años en mi vida.

Mi familia

Les agradezco siempre las oportunidades que me brindaron y la paciencia para aceptar mis decisiones.

DEDICATORIA

Todo este trabajo, las horas de insomnio,
Aquella carpanta que me devoro por dentro,
La dicha oculta en la fonda del día,
El departir con una tostada y tu compañía,
Aquella lid con draconiana bacínica,
La dubitación contenida en mi interior,
Cada punto y coma que con estas hojas culmino,
a ti, mi amado hijo, dedico.

La brucelosis es una enfermedad bacteriana zoonótica endémica en algunas regiones del mundo, como América Latina, Oriente Medio, África y Asia, esta enfermedad registra aproximadamente medio millón de nuevos casos de infecciones humanas anualmente. En México es común la infección debida a la prevalencia de la enfermedad, por lo que el desarrollo de una vacuna eficaz contra la brucelosis es imprescindible. Aunque las vacunas disponibles son efectivas en el control, tienen numerosos inconvenientes, como interferencia con las pruebas de diagnóstico, patogenicidad en humanos, el potencial de causar abortos en animales preñados, entre otros.

La bioinformática ha mejorado la investigación en vacunología. Esto nos ha permitido desarrollar vacunas más seguras basadas en proteínas recombinantes codificadas en el genoma del propio microorganismo. En *Brucella*, solo se ha aplicado parcialmente.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el genoma de *Brucella melitensis* buscando proteínas potencialmente utilizables como vacunas codificadas dentro de sí mismo. Mediante el uso de múltiples herramientas bioinformáticas se generó una base de datos de moléculas con altas posibilidades de ser utilizadas como vacunas. Por lo tanto, se analizaron 3099 cds y se generaron 11 bases de datos, se obtuvieron 32 secuencias entre lipoproteínas de membrana externa y barriles beta de membrana externa. Posteriormente se filtraron estas secuencias, se seleccionaron aquellas que presentaban menos del 30% de identidad con proteínas de los diferentes huéspedes y capaces de estimular el sistema inmunitario, obtuvimos 24 secuencias que se caracterizaron bioinformáticamente. Finalmente, se destacan 3 secuencias que, sumado a todas las características deseadas, presentan una identidad del 0% con las proteínas de todos los huéspedes. Proponemos un Omp2 y dos barriles beta como los mejores candidatos para el análisis experimental en busca de una vacuna universal contra la brucelosis.

Brucellosis is a zoonotic bacterial disease endemic in some regions of the world, such as Latin America, the Middle East, Africa and Asia, this disease records approximately half a million new cases of human infections annually. In Mexico its common the infection due to de prevalence of the disease thus the development of an efficacious vaccine for brucellosis it's imperative. Although the available vaccines are effective in controlling, they have numerous drawbacks, such as interference with diagnostic tests, pathogenicity for humans, the potential to cause abortion in pregnant animals, among others.

Bioinformatics has improved the research in vaccinology. This has allowed us to develop safer vaccines based on recombinant proteins encoded in the genome of the microorganism itself. In *Brucella*, it has only been partially applied.

The objective of this project was to evaluate the genome of *Brucella melitensis* looking for potentially usable proteins as vaccines encoded inside itself. Through the use of multiple bioinformatics tools were generate a database of molecules with high possibilities of being used as vaccines. Therefore, 3099 cds were analyzed and 11 databases were generated, 32 sequences were obtained and divided between outer membrane lipoproteins and outer membrane beta barrels. These sequences were subsequently filtered, those presenting less than 30% identity with proteins from the different hosts and capable of stimulating the immune system were selected, we obtained 24 sequences that were bioinformatically characterized. Finally, 3 sequences are highlighted that, added to all the desired characteristics, presented 0% identity with the proteins of all hosts. We propose an Omp2 and two beta-barrels as the better candidates for the experimental analysis looking for a universal vaccine against Brucellosis.

Keywords

Brucella, Vacunología inversa, Bioinformática, Vacuna, Brucelosis

Tabla de contenido

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Índices.....	iii
Índice de ilustraciones.....	v
Índice de Tablas.....	vi
Introducción.....	1
Brucelosis.....	1
Historia.....	1
Agente causal.....	3
Distribución.....	4
Cuadro Clínico.....	5
Patogénesis de la Brucelosis.....	9
Respuesta inmune frente a <i>Brucella</i>	11
Respuesta inmune innata.....	11
Respuesta inmune específica.....	14
Inmunidad Mediada por Células.....	14
Citoquinas en la infección por <i>Brucella</i>	14
Diagnostico.....	16
Impacto de la Brucelosis en México y en el mundo.....	18
Tratamiento.....	20
Vacunas.....	22
Definición.....	22
Tipos de Vacunas.....	23
Vacunas vivas atenuadas.....	24
Vacunas inactivadas.....	24
Vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas.....	25
Vacunas con toxoides.....	25
Vacunas contra Brucelosis.....	26

Vacunología Inversa	27
Técnicas usadas en la Vacunología inversa	28
Análisis pangenómico en la Vacunología inversa.....	28
Vacunología inversa estructural.....	30
Antecedentes directos y casos de éxito	32
Vacunología inversa en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
Vacunología inversa en <i>Ehrlichia ruminantium</i>	33
Vacunología inversa aplicada a <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
Vacunología inversa aplicada a <i>Fraciella tularensis</i>	35
La aplicación de la Vacunología inversa en <i>Neisseria meningitidis</i>	36
Vacunología aplicada a <i>Leptospira interrogans</i>	37
Vacunología inversa aplicada a <i>Brucella melitensis</i>	38
Marco Teórico	41
Objetivos	48
Objetivo General	48
Objetivos Particulares.....	48
Alcances y Limitaciones	49
Justificación.....	50
Estrategia Metodológica	51
Resultados	53
Discusión.....	71
Conclusión.....	75
Perspectivas.....	77
Apéndices.....	78
Referencias	78

Índice de ilustraciones

1. *Ilustración 1: Situación actual del control de la brucelosis en México* _____ 5
2. *Ilustración 2 Esquema simplificado de la ruta de infección de Brucella en un macrófago*__ 6
3. *Ilustración 3 Esquema de la patogénesis de Brucella en la hembra Bovina* _____ 10
4. *Ilustración 4 Esquema simplificada: reacción inmune frente a Brucella*_____ 15
5. *Ilustración 5 Esquema de flujo de la Vacunología inversa con un enfoque pan-genómico* 29

Índice de Tablas

<i>Tabla 1 Tratamientos usado por la secretaria de salud en México</i>	21
<i>Tabla 2 Secuencias seleccionadas por Vishnu y colaboradores</i>	39
<i>Tabla 3 Secuencias seleccionadas por Saadi y colaboradores</i>	40
<i>Tabla 4 Numero de predicciones por programa</i>	53
<i>Tabla 5 GIs con al menos 2 características deseadas y base de datos en las que fueron encontradas</i>	55
<i>Tabla 6 Proteínas barril beta de membrana externa y lipoproteínas de membrana externa.</i>	57
<i>Tabla 7 Secuencias Estimuladoras Fuertes del Sistema Inmune</i>	58
<i>Tabla 8 Porcentajes de identidad por especies</i>	59
<i>Tabla 9 Secuencias con sus resultados individuales</i>	60
<i>Tabla 10 Secuencias de importancia por hospedador.</i>	62
<i>Tabla 11 Caracterización bioinformática restantes 36 proteínas</i>	78

Introducción

Brucelosis

La brucelosis, también conocida como “fiebre ondulante”, “fiebre de malta” o “fiebre del mediterráneo” es una zoonosis y su infección es causada por el contacto directo con los animales infectados o con subproductos de estos sin el tratamiento adecuado (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

Historia

Los primeros indicios de la enfermedad en la historia de la humanidad podrían provenir de Hipócrates, quien relata el padecimiento de una persona que vivía cerca al templo de Diana en Thasos y sufrió de signos y síntomas durante 120 días muy parecidos a los de la actual enfermedad (Laval R., 2006). Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX que la enfermedad fue reconocida, esto fue producto de la ocupación francesa de la isla de Malta dirigida por Napoleón y con su caída, la isla fue tomada nuevamente por Inglaterra y fue durante su ocupación, cuando se descubrió y registro la enfermedad pues las tropas inglesas en la isla enfermaban constantemente, por lo que fue enviado el doctor David Bruce quien estudio el microorganismo al darse cuenta que existía una correlación entre los enfermos y los productos lácteos locales (Laval R., 2006).

En 1914 en california, Traum encontró, en la placenta de las cerdas afectadas de aborto contagioso, un microbio similar al bacilo de Bang, al que denominó “bacteria abortus suis”, que después del descubrimiento de Alice Evans, pasó a formar parte del género *Brucella* con el nombre de *Brucella suis* (Rodríguez *et al.*, 2005)

El hallazgo fundamental para el conocimiento de la brucelosis fue logrado en 1918, por Alice Evans, bacterióloga norteamericana, la cual en el curso de investigaciones comparativas que realizaba entre el “micrococcus melitense de Bruce” y el “abortus bacillus de Bang”, comprobó la semejanza casi idéntica entre estos microbios, desde el punto de vista morfológico, inmunológico y de cultivo (Godfroid *et al.*, 2004).

A partir de este punto se dieron muchos reportes de casos simultáneamente en todo mundo dando pie a múltiples nombres para la misma enfermedad tales como ‘Fiebre ondulante’, ‘Fiebre de Malta’, ‘Enfermedad de Bang’, ‘Enfermedad de Traum’. Sin embargo, desde hace ya varios años se homogenizó la terminología a enfermedad causada por las bacterias del género *Brucella* como Brucelosis (Laval R., 2006).

En nuestro país, la primera descripción de la enfermedad fue realizada en el año de 1905 y posteriormente en 1906 por los doctores Valenzuela y Carvajal respectivamente. En 1921 el Dr. Manuel Vergara describe casos de brucelosis en la ciudad de Puebla y en 1938 la infección alcanzó tal importancia que se organizó, en el estado de Coahuila, el Primer Congreso Nacional de la Brucelosis (Vega-López *et al.*, 2008).

Agente causal

El microorganismo causante de la enfermedad es una bacteria del género *Brucella spp*, al cual pertenecen diferentes especies que afectan una amplia variedad de especies de mamíferos. Se trata de cocobacilos gram negativos de 0,5 a 0,7 µm de diámetro y de 0,5 a 1,5 µm de largo, inmóviles, aerobios estrictos, no esporulados y no encapsulados (Román-Cárdenas *et al.*, 2017).

Su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (Michaux-Charachon S, 1997). Tienen un metabolismo oxidativo, basado en distintos nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (Castro *et al.*, 2005).

El género *Brucella* constantemente se encuentra en modificaciones taxonómicas debido a los constantes descubrimientos y reportes de aislamientos de este género en nuevas especies animales. Para el año 2012 algunos autores reportaron 10 especies del género *Brucella* basado en sus preferencias por hospedador que comprendían *B. melitensis* (cabras), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (cerdos), *B. canis* (perros), *B. ovis* (ovejas), *B. neotomae* (ratón del desierto), *B. cetacea* (cetáceos), *B. pinnipedia* (focas), *B. microti* (ratón de campo), y *B. inopinata* (desconocido) (O'Callaghan *et al.*, 2012). En 2014 se añade *B. papionis* (Whatmore *et al.*, 2014), y más recientemente en 2016 se añade *B. vulpis* (Scholz *et al.*, 2016).

Es importante destacar que aunque por muchos años se consideró una enfermedad especie específica, en años recientes varios grupos de investigación en diferentes países han reportado la presencia de *B. suis* y *B. melitensis* en el ganado bovino cuando anteriormente se señalaba únicamente a *B. abortus* (Laval R., 2006).

Distribución

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial, cuyas zonas de mayor prevalencia suelen corresponder con países en desarrollo, áreas tropicales o regiones que carecen de programas sanitarios para el control de la enfermedad. La brucelosis bovina está incluida en la lista B de enfermedades en conformidad con las disposiciones de la organización mundial de sanidad animal (OIE), la cual incluye a aquellas enfermedades que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico internacional (OIE, 2018).

En el caso específico de México existen diferentes estados de la república con la enfermedad en campaña, siendo Sonora el único estado en ser considerado libre completamente de esta enfermedad. Sin embargo, existen municipios en diferentes estados que han sido declarados libres por toda la república mexicana, como se observa en la ilustración 1 (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2018).

El estado de Sonora se encuentra libre de Brucelosis causada por especies lisas y el 31 % del territorio nacional está reconocido en fase de erradicación en los estados de Baja California Sur, Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán, así como las regiones A de Aguascalientes, A de Baja California, A de Chiapas, A, A1 y A2 de Guanajuato, Huasteca y A2 de Hidalgo, y A1 y A2 de Puebla (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2018).



Ilustración 1: Situación actual del control de la brucelosis en México, en color verde se observan los estados o regiones donde se considera libre de la enfermedad, en amarillo donde se encuentra en erradicación y en color naranja donde se encuentra en fase de control. Tomado del sitio oficial del SADER.

Cuadro Clínico

Las bacterias del género *Brucella* son considerados parásitos intracelulares que han evolucionado para evadir el sistema inmune del hospedador, una vez que la bacteria está dentro del hospedador, usualmente entrando a través de las vías respiratoria y/o digestiva, son capaces de sobrevivir en células con actividad fagocítica (Poester *et al.*, 2013).

Brucella tiene la capacidad de interferir en el tráfico intracelular evitando la fusión de la vacuola que contiene a la bacteria con el lisosoma y dirigirla al retículo endoplasmico rugoso que permite la replicación de estas bacterias, como se muestra en la ilustración 2 (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998).

El resultado de la infección puede variar dependiendo de la especie de *Brucella* y el hospedador infectado, se sabe que cada especie de *Brucella* tiene un hospedador predilecto, pero ninguna se limita dicho hospedador, las infecciones más comunes son causadas por *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* y *B. ovis*. De estas, únicamente *B. ovis* no ha sido reportada como zoonótica (Young, 1995) (Lucero *et al.*, 2005).

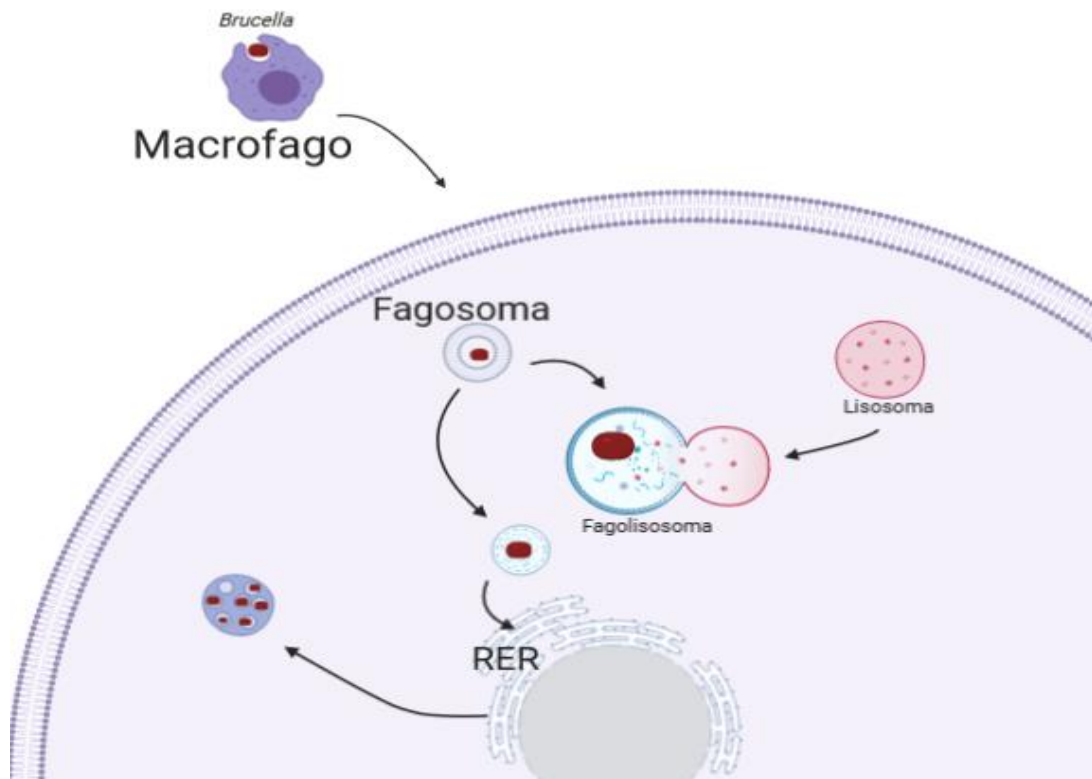


Ilustración 2 Esquema simplificado de la ruta de infección de *Brucella* en un macrófago. Al ser fagocitada la célula bacteriana puede ser transportada hasta fusionarse con un lisosoma para degradarse, aunque también ocurre que la bacteria puede evitar esta fusión y redirigir la vacuola al retículo endoplásmico rugoso donde puede multiplicarse.

B. abortus induce la supresión de mediadores pro inflamatorios en estadios tempranos de la infección (Carvalho-Neta *et al.*, 2008), además los trofoblastos son las células blanco para la infección por *B. abortus* en la infección en vacas preñadas (Carvalho-Neta *et al.*, 2008).

En el caso específico de *B. abortus* las manifestaciones clínicas de la infección se dan en las hembras después de la infección crónica mediante la replicación en los trofoblastos corioalantoides, resultando en la placentitis, muerte fetal y aborto (Poester *et al.*, 2013). Los toros pueden desarrollar signos sistémicos de infección y la lesión más significativa es la orquitis asociada a la vesiculitis seminal y epididimitis (Poester *et al.*, 2013). A la orquitis crónica y fibrosis del parénquima testicular de los toros infectados les sigue con frecuencia el deterioro de la producción de semen y la infertilidad o esterilidad (Poester *et al.*, 2013).

En la infección en pequeños rumiantes por *B. melitensis* la principal forma de transmisión es por medio de la mucosa oral. En la mayoría de los casos se puede obtener muestras de cotiledones, membrana placentaria y líquido amniótico con concentraciones de hasta 1×10^{10} o 1×10^{13} UFC/ml (Martínez-Núñez *et al.*, 2010).

El aborto puede ocurrir en diferentes etapas de la gestación y los fetos abortados a menudo tienen una apariencia normal. Sin embargo, en muchos casos hay bronconeumonía, líquido hemorrágico en la cavidad torácica y también linfadenitis, esplenomegalia y hepatitis (Poester *et al.*, 2013). En cabras machos, la infección puede localizarse en el testículo, el epidídimo, la vesícula seminal y los conductos deferentes, dando como resultado la inflamación de los órganos genitales. En la etapa crónica, se pueden observar higromas e inflamación de las articulaciones (Poester *et al.*, 2013).

En el caso de la infección provocada por *B. suis* los signos clínicos en las cerdas incluyen el celo después de la inseminación artificial, secreciones vaginales y la parálisis de los miembros posteriores.

Los abscesos esplénicos y las pequeñas adherencias intestinales se pueden encontrar en el examen *post mortem* (Megid *et al.*, 2010). Se han observado abortos tan pronto como 17 días después de la inseminación natural por verracos infectados. Los abortos tempranos generalmente pasan desapercibidos y la única evidencia de infección es que la cerda muestra signos de celo 30 a 45 días después del apareamiento (Meirelles-Bartolli *et al.*, 2012).

Patogénesis de la Brucelosis

La capacidad de *Brucella spp.* para causar la enfermedad requiere algunos pasos críticos durante la infección pues esta bacteria puede invadir las células epiteliales del huésped, permitiendo la infección a través de las superficies mucosas. Los estudios *in vitro* fueron esenciales para comprender la adhesión, la internalización, el tráfico intracelular, la supervivencia y la replicación de *Brucella* en huéspedes susceptibles (Rossetti *et al.*, 2012). Por lo tanto, después de la unión a la superficie de las células epiteliales de la mucosa, *Brucella* induce un mecanismo de cierre similar a la cremallera. La unión promueve la activación de pequeñas GTPasas que desencadenan una cascada de señalización que reorganiza el citoesqueleto de actina para inducir un reordenamiento de la membrana de la célula huésped a lo largo de la superficie del patógeno, que aumenta la invasión. La entrada se produce pocos minutos después de la interacción, que requiere la activación completa de una vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (Rossetti *et al.*, 2012).

Se observó en los experimentos realizados por Rossetti y colaboradores (Rossetti *et al.*, 2013) que la *Brucella* sobrevive y se replica dentro de las células fagocíticas no profesionales hasta 72 horas *in vitro* y se mueve a través del epitelio *in vivo* subvirtiendo la función de barrera epitelial de la mucosa para facilitar la migración transepitelial de este patógeno. Mientras sucedía todo esto se observó una respuesta inmunitaria débil y escasamente proinflamatoria (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

También se ha observado que para retrasar el reconocimiento del sistema inmune e iniciar una respuesta inmunitaria, este patógeno reduce, modifica o encubre sus patrones moleculares asociados a patógenos (Barquero-Calvo *et al.*, 2007); sin embargo, algunos receptores tipo Toll o TLR; principalmente los TLR2, TLR4 y TLR9 inician una señalización intracelular limitada que activa el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) para

controlar la expresión de los genes de citoquinas inflamatorias (Oliveira *et al.*, 2008).

Específicamente, el ciclo de vida de *Brucella* contiene dos fases: Una infección crónica en la que la *Brucella* sobrevive preferentemente en los Monocitos-Macrófagos del hospedador donde se replica. Posteriormente, una segunda etapa en la que infecta a las células epiteliales no fagocíticas produciendo la infección del tracto reproductivo generando la posterior manifestación del aborto. Las células del bazo y el hígado son los principales reservorios de estas bacterias después de la infección como se observa en la ilustración 3.

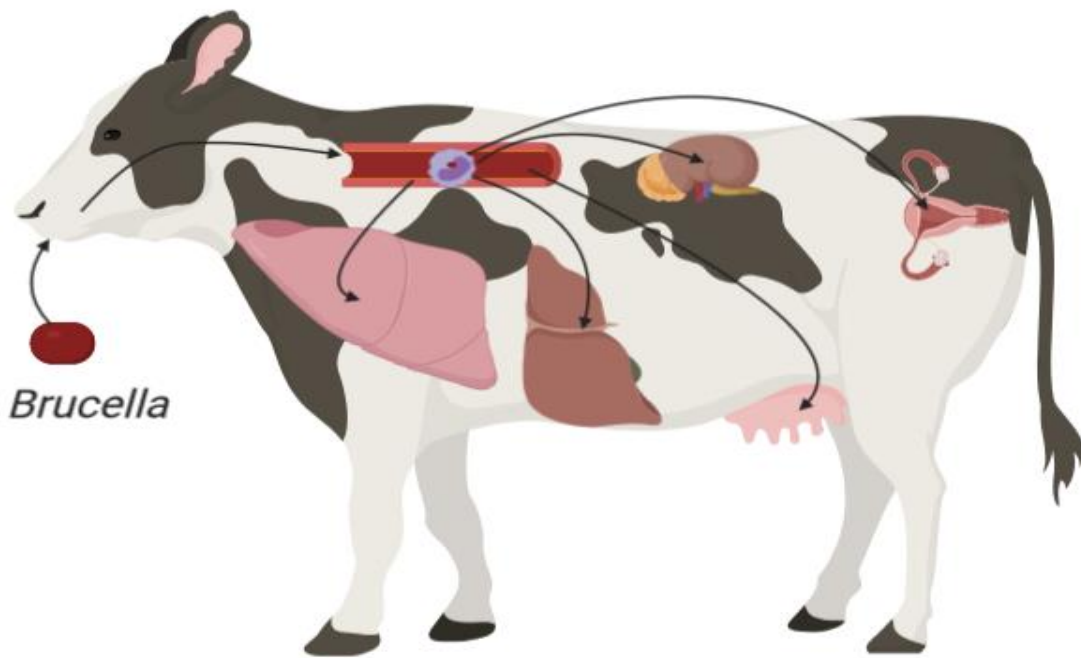


Ilustración 3 Esquema de la patogénesis de *Brucella* en la hembra Bovina. Al entrar al organismo la bacteria sobrevive y se replica dentro los macrófagos viajando a muchos tejidos diferentes incluidos pulmones, hígado, riñones y al tracto reproductor femenino causando el característico aborto fetal en el último tercio del embarazo, finalmente se acumula en la glándula mamaria donde es secretada con la leche.

Respuesta inmune frente a *Brucella*

Como ya se mencionó, las bacterias del género *Brucella* ingresan al hospedador susceptible por las vías oral, nasal preferentemente, sin embargo, también poseen la capacidad de ingresar por otras vías como la conjuntival o genital. Esta última vía es la principal para el contagio con *B. ovis*. Según sugieren algunos autores, luego de la infección, la bacteria es rápidamente fagocitada por los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en los que sobrevive y se multiplica.

Respuesta inmune innata

Los macrófagos son un tipo de glóbulos blancos que se encuentran dispersos por todo el cuerpo y reciben diferentes nombres de acuerdo al tipo de tejido en el que se encuentre. En la sangre se conocen como monocitos e intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes patógenos. Se trata de células efectoras del sistema inmune innato. Este tipo de células son, por lo tanto, los actores principales en la respuesta inmunitaria innata.

Estas células juegan un rol central en la respuesta inmune temprana frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos. Procesan antígenos en sus compartimentos intracelulares y los presentan en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC del inglés Major Histocompatibility Complex) a linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa (Rivers *et al.*, 2006).

Los neutrófilos son otra célula de defensa básica y están implicados en el desarrollo de una defensa temprana frente a una infección por *Brucella* mediante la fagocitosis y posterior destrucción del microorganismo. En primer lugar, los neutrófilos son atraídos al sitio de la infección por estímulos químicos originados o derivados de este microorganismo (Birmingham *et al.*, 1982), para posteriormente fagocitar la bacteria, preferentemente opsonizada.

Una vez que la bacteria ha sido fagocitada, es expuesta al medio hostil de los compartimentos fagolisosomales dentro de la célula fagocítica. El mecanismo más común es el conocido como estallido respiratorio, que consiste en la liberación de especies reactivas de oxígeno por las células fagocíticas del sistema inmune tales como radicales superóxido y peróxido de hidrógeno (Saldarriaga *et al.*, 2002).

Las células fagocíticas tienen además otros mecanismos diferentes a los radicales derivados del oxígeno, como las enzimas hidrolíticas y los haluros reactivos; sistemas esencialmente encontrados en los PMN. Estos mismos son capaces de utilizar los componentes de sus gránulos para la destrucción de una amplia variedad de microorganismos invasores, sin embargo, se ha demostrado que la de granulación de estas células puede ser inhibida por la *B. abortus* (Bertram *et al.*, 1996).

Dentro de la misma inmunidad innata también cabe destacar el gen Nramp1, que codifica para una proteína del macrófago que ha sido fuertemente asociada con resistencia natural a patógenos intracelulares como *Mycobacterium spp*, *Salmonella spp* y *Leishmania spp* (Vidal *et al.*, 1995), ha sido ubicado en el cromosoma 2 bovino (Feng *et al.*, 1996). Además, según los experimentos realizados por Qureshi y colaboradores, macrófagos derivados de bovinos seleccionados por la resistencia *in vivo* a la infección por *B. abortus*, restringieron la replicación intracelular, a *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) y *Salmonella dublin*, de manera significativamente mejor que macrófagos derivados de animales susceptibles (Qureshi *et al.*, 1996).

Respuesta inmune específica

Inmunidad Mediada por Células.

En la actualidad sabemos que el MHC en sus tipos I y II, pueden actuar en la defensa frente a la infección por patógenos intracelulares. Sin embargo, se sabe que el MHC II es el que mejor actúa en la defensa contra las bacterias del género de *Brucella*. Esta inmunidad protectora mediada particularmente por los linfocitos efectores TCD8⁺ ha sido demostrada por Oliveira y colaboradores mediante ensayos con ratones *knockout* para las moléculas del MHC clases I y II. En estos ensayos descubrieron una interacción entre las TCD8⁺, los ratones exhibieron un perfil de citoquinas tipo 1 marcado por una expresión elevada de ARNm de IFN- γ y producción de proteínas, estas estimulan la aparición de los linfocitos TCD8⁺ que son los que muestran el rol principal en el control de las infecciones ocasionadas por *Brucella* (Oliveira & Splitter, 1995).

Citoquinas en la infección por *Brucella*

Se ha demostrado que el sistema inmune que ha sido previamente expuesto a la infección por *B. abortus* libera rápidamente altas cantidades de interleucina 12, una citoquina pro inflamatoria que estimula la activación de las células linfocíticas Th1, que a su vez producen INF- γ . Este juega un rol primordial al estimular el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2 y por lo tanto tiene un rol principal en la defensa contra las infecciones de las bacterias del género *Brucella* (Saldarriaga *et al.*, 2002).

A todo esto *Brucella* puede responder inhibiendo la generación de la interleucina 12 lo que genera una baja producción de INF- γ y la prevalencia de la enfermedad gracias a una reducción en la producción de óxido nítrico dentro de los macrófagos infectados, sumado a la baja activación de las células conocidas como Natural Killer (NK) (Zhan & Cheers, 1995).

Además de las citoquinas ya mencionadas también está el factor de necrosis tumoral (TNF- α), una citocina proinflamatoria producida durante la fase temprana de las infecciones intracelulares y por lo tanto no es de sorprender que esté presente para hacer frente a la infección por *Brucella* (Rivers *et al.*, 2006).

Una citocina que se debe mencionar es la Interleucina 10 que actúa regulado negativamente la activación de los mecanismos del macrófago y esto es de vital importancia si tenemos en cuenta que las bacterias del genero *Brucella* tienen la capacidad de estimular la producción de esta citoquina y por lo tanto de inhibir la activación del propio macrófago (Fernandes & Baldwin, 1995).

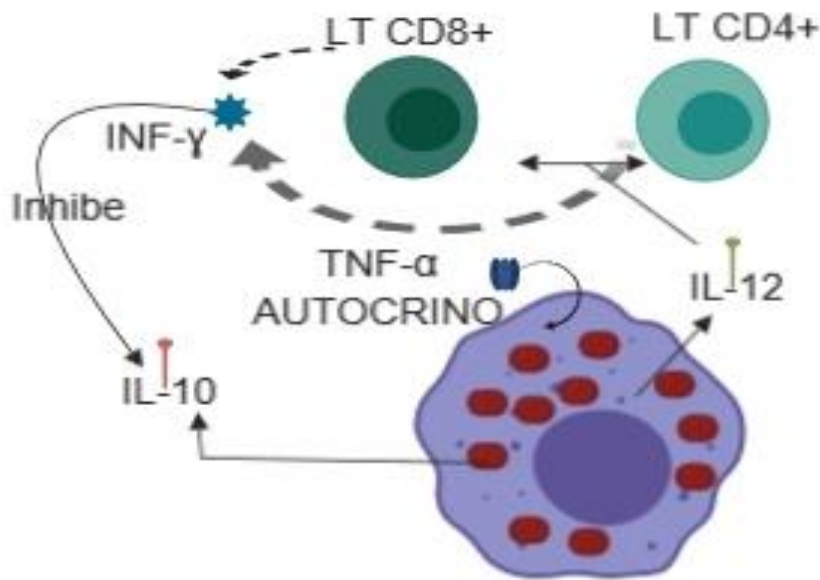


Ilustración 4 Esquema: reacción inmune simplificada de defensa frente a *Brucella*. El macrófago infectado por la *Brucella* libera IL-10 estimulado por el patógeno, esto suprime la reacción de los linfocitos T, por otro lado el macrófago genera TNF- α en un intento por producir la apoptosis, adicionalmente la célula infectada genera IL-10 que estimula la diferenciación de los linfocitos efectoros CD4 y CD8, estos pueden generar el INF- γ que inhibe la IL-10.

Diagnóstico

Según la organización mundial de la Salud, debido a la similitud de los síntomas y signos con otras enfermedades siempre es primordial el historial de los pacientes empezando por saber si provienen de países o zonas donde la brucelosis es endémica y las preguntas como alimentos ingeridos recientemente, contacto con animales y profesión ayudan a dirigir el diagnóstico correcto. Y una vez hecho esto, las pruebas serológicas son las primeras en realizarse, preferentemente la conocida como “rosa de bengala” como prueba de sensibilidad alta y rápida de realizar. Sin embargo, no es una prueba definitiva y debe ser corroborada por otros exámenes de tipo serológico y bacteriológico (World Health Organization/American Public Health Association, 2004).

En México, la Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con brucelosis establece que en la brucelosis de forma rutinaria se realizan dos pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos, una presuntiva y otra confirmatoria; se llevan a cabo después de la primera consulta en que clínicamente se sospecha de la enfermedad, y antes de iniciar el tratamiento farmacológico; para repetirse después como pruebas de control a los 30, 90 y 180 días, tiempo en que se concluye el tratamiento (Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, 1995).

La primera es la prueba Presuntiva de Aglutinación con Antígeno Rosa de Bengala, método indirecto que emplea *Brucella* inactivada y teñida de forma que mediante la observación de la aglutinación, demuestra anticuerpos específicos en el suero del paciente sospechoso de la enfermedad.

La segunda es la prueba Confirmatoria de Aglutinación Estándar (SAT por sus siglas en inglés Standar Agglutination Test) esta es únicamente usada en caso de que la prueba anterior fuese positiva y consiste en la demostración

de anticuerpos anti-*Brucella* por aglutinación, utilizando bacterias inactivadas que permiten identificar inmunoglobulinas específicas de las clases IgM que demuestra infección en etapa inicial, IgG que demuestra infección en etapa crónica e IgA que demuestra infección previa.

En el caso del diagnóstico de infección por *Brucella* en animales, está basado en la NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 (Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural., 1995), “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales”, está en su artículo número 7 establece que el diagnóstico de brucelosis en bovinos, caprinos, ovinos y porcinos, se debe realizar en laboratorios aprobados por la Secretaría, este se realiza con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y/o muestras de tejidos, mediante pruebas inmunológicas, estudios bacteriológicos u otros que sean autorizados por la Secretaría.

En su punto 7.2 menciona que las pruebas inmunológicas establecidas por la Dirección y efectuadas por el personal oficial o aprobado son: para especies lisas, la prueba de tarjeta, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche; para detección de *Brucella ovis*, la prueba de inmunodifusión doble. La prueba de tarjeta y la de anillo en leche, podrán ser realizadas por un Médico Veterinario oficial o aprobado, o bien, por un laboratorio aprobado. Las pruebas de rivanol, fijación del complemento e inmunodifusión doble, deben ser realizadas por un laboratorio aprobado. Los Médicos Veterinarios aprobados que apliquen la prueba de tarjeta en campo y los laboratorios aprobados deben pasar pruebas de aptitud, tener la infraestructura mínima necesaria que garantice la correcta realización de la prueba y llevar registro tanto de todas las pruebas que realicen, como de los reactivos utilizados.

Impacto de la Brucelosis en México y en el mundo.

Es tal la importancia de esta enfermedad que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró: "Consideramos que la brucelosis es la zoonosis más extendida en el mundo y, aparte de su costo para las personas, tiene un enorme impacto en la industria animal " (Godfroid *et al.*, 2004) (World Health Organization/American Public Health Association, 2004). En este aspecto, múltiples estudios se han realizado donde se describe el impacto socio económico de esta enfermedad en el comercio y producción de productos lácteos (Xolalpa *et al.*, 2010).

El impacto social y profesional también ha sido abordado en muchas ocasiones y se ha determinado en múltiples estudios que la enfermedad dependiendo del país, tiende a ser una enfermedad ocupacional. Esto debido a que es común para médicos veterinarios (Robichaud *et al.*, 2004) el manejo constante de animales infectados por esta enfermedad sin un diagnóstico previo y en estadios subclínicos de la enfermedad, otro sector de la población en edad activa es precisamente el personal de rastros, ellos están en constante exposición no solo a *Brucella* sino también a otras patologías como tuberculosis y en la mayoría de los casos no cuentan con equipo que garantice su protección adecuada para evitar los contagios por esta enfermedad.

Otro sector afectado ocasionalmente es el de los laboratoristas (Traxler *et al.*, 2013) que durante el manejo de las muestras para la elaboración del diagnóstico, no toman las precauciones adecuadas y terminan auto inoculándose al patógeno y aunque no sea este el caso, la gran habilidad de esta bacteria para propagarse es difícil de manejar sin el equipo e infraestructura adecuada.

Finalmente, el personal que se encarga de su manejo en las explotaciones ganaderas al realizar acciones como el ayudar en los partos cuando los animales presentan distocias, en las ordeñas manuales y en otras tantas situaciones comunes en las ordeñas de traspatio (Hernández *et al.*, 1999).

Tratamiento

Una variedad de fármacos antimicrobianos tienen actividad *in vitro* contra las especies de *Brucella*; sin embargo, los resultados de las pruebas de sensibilidad de rutina no siempre se correlacionan con la eficacia clínica. En consecuencia, los antibióticos betalactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas, y los antibióticos macrólidos, como la eritromicina, se asocian con tasas inaceptablemente altas de recaída cuando se utilizan para tratar a los pacientes con brucelosis (World Health Organization/American Public Health Association, 2004).

La organización mundial de la salud recomienda en el tratamiento de la brucelosis en adultos y niños mayores de 8 años sin ninguna complicación el uso de aminoglucocidos y/o tetraciclinas (World Health Organization/American Public Health Association, 2004).

En México la secretaria de salud es quien dirige los tratamientos contra la brucelosis y divide dichos tratamientos en 3 esquemas básicos y 2 alternativos como se muestra en la tabla 1 (Secretaria de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, 1995).

Tabla 1 Tratamientos usado por la secretaria de salud en México

Esquema	Medicamentos	Dosificación
A	Tetraciclina, tabletas o comprimidos	Tetraciclina 500 mg cada 6 horas por 21 días
	Estreptomina, frasco ampula de 1g. Solución inyectable.	Estreptomina 1 g. intramuscular cada 24 horas por 21 días
	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg .	Adultos: 300 mg cada 8 horas, por 21 días. Niños: 20 mg/kg/día dividido en tres dosis, por 21 días.
B	Trimetoprim con Sulfametoxazol, tabletas o comprimidos de 80/400 mg. Suspensión 40/80 mg en 5 ml.	Adultos: 160/800 mg cada 12 horas por 21 días. Niños: 8/40 mg/kg/día dividido en dos dosis por 21 días.
	Doxiciclina, tabletas o cápsulas de 100 mg.	Adultos: Doxiciclina 200 mg, cada 24 horas por seis semanas. Niños: Doxiciclina 4-5 mg/kg/día, por seis semanas dividido en tres dosis
C	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg .	Adultos: 600 - 900 mg cada 24 horas, por 6 semanas Niños: 20 mg/kg/día dividido en tres dosis, por 6 semanas.
	Ciprofloxacino, cápsulas o tabletas 250 mg	Ciprofloxacino 1500 mg por día, dividido en dos dosis, 750 mg cada 12 horas por 45 días
Primer esquema alterno	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg .	Rifampicina 300 mg cada 8 horas, por 45 días.
Segundo esquema alterno	Levofloxacino, tabletas de 500 y 750 mg	Levofloxacino 1500 mg, cada 24 horas por 45 días
	Rifampicina tabletas, comprimidos o cápsulas 300 mg .	Rifampicina 300 mg cada 8 horas, por 45 días.

Vacunas

La mejor forma de combatir la problemática planteada por esta enfermedad, como con muchas otras, es la prevención y existen muchas formas de prevenir el contagio de esta enfermedad, pasando por tratamiento adecuado de los subproductos de los animales infectados, en este aspecto el hervir la leche es la mejor forma de prevenir la infección. Sin embargo, esto no elimina el riesgo para las personas en el campo o en contacto directo con los animales infectados, para estos casos la mejor forma de prevención es la vacunación de los animales y la población susceptible. El impacto de la enfermedad puede ser reducido enormemente si previamente la población susceptible es inmunizada, para lograr esto la mejor forma es la vacunación.

Definición de vacuna

Según la OMS “se entiende por vacuna cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos”. Por ejemplo, de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, o de productos o derivados de microorganismos. El método más habitual para administrar las vacunas es la inyección, aunque algunas se administran con un vaporizador nasal u oral (OMS, 2018).

En el caso de México, este aspecto, está regulado por la NORMA Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano.

En ella se establece en su punto de definición una vacuna como una suspensión de microorganismos vivos atenuados, inactivados o sus fracciones, que son aplicados a individuos con el objeto de inducir inmunidad activa protectora contra la enfermedad infecciosa correspondiente.

También diferencia entre una vacuna y un toxoide definiendo este último como una toxina que ha sido tratada con productos químicos o calor, a fin de perder su efecto tóxico, pero que conserva su inmunogenicidad.

Tipos de Vacunas

Según el Departamento de salud y servicios humanos de EE.UU (U.S. Department of Health & Human Services en inglés) existen varios tipos de vacunas y para todas se deben tomar en cuenta varios factores diferentes tales como (U.S. Department of Health & Human Services, 2018):

- De qué manera el sistema inmunitario responde al agente patógeno.
- Quién necesita vacunarse contra el agente patógeno.
- La mejor tecnología o enfoque para crear la vacuna.

Basados en estos puntos, los equipos de investigación desarrollan las vacunas y en la actualidad existen 4 tipos de vacunas usados principalmente:

Vacunas vivas atenuadas

Las vacunas vivas utilizan una forma debilitada (o atenuada) del patógeno que causa una enfermedad.

Dado que estas vacunas son tan similares a la infección natural que ayudan a prevenir, crean una respuesta inmunitaria fuerte y de larga duración. Solo 1 o 2 dosis de la mayoría de las vacunas vivas pueden proteger durante toda la vida contra un microorganismo y la enfermedad que causa.

Sin embargo, las vacunas vivas también tienen algunas limitaciones. Por ejemplo:

Dado que contienen una pequeña cantidad de un patógeno vivo atenuado, algunas personas deben hablar con su proveedor de atención médica antes de vacunarse, tales como las personas con sistemas inmunitarios debilitados, problemas de salud a largo plazo o que han tenido un trasplante de órganos.

Deben mantenerse en frío, por lo que no se puede viajar con ellas. Esto significa que no se pueden utilizar en países con acceso limitado a refrigeradores (U.S. Department of Health & Human Services, 2018).

Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas utilizan la versión inactivada del germen que causa una enfermedad.

Las vacunas inactivadas no suelen proporcionar una inmunidad (protección) tan fuerte como las vacunas vivas. Es posible que necesite varias dosis con el tiempo (vacunas de refuerzo) para tener inmunidad continua contra las enfermedades (U.S. Department of Health & Human Services, 2018).

Vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas

Las vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas utilizan partes específicas del microorganismo, como alguna proteína, azúcar o cápsula.

Dado que estas vacunas sólo utilizan partes específicas del germen, ofrecen una respuesta inmunitaria muy fuerte dirigida a partes claves del germen. También se pueden utilizar en prácticamente cualquier persona que las necesite, incluso en personas con sistemas inmunitarios debilitados o problemas de salud a largo plazo.

La única limitación de estas vacunas es que posiblemente necesite vacunas de refuerzo para tener protección continua contra las enfermedades (U.S. Department of Health & Human Services, 2018).

Vacunas con toxoides

Las vacunas con toxoides utilizan una toxina (producto nocivo) fabricada a partir de microorganismos que causa una enfermedad. Crean inmunidad a las partes del germen que causan una enfermedad en lugar de al microorganismo en sí. Esto significa que la respuesta inmunitaria va dirigida a la toxina en lugar de a todo el germen.

Al igual que otros tipos de vacunas, es posible que necesite vacunas de refuerzo para tener protección continua contra las enfermedades.

Vacunas contra Brucelosis

El control y prevención de la brucelosis animal se basa en gran medida en la vacunación. Durante las últimas décadas se ha realizado un intenso esfuerzo de investigación para desarrollar vacunas más seguras y eficaces contra la brucelosis. Las vacunas actuales contra la brucelosis son vivas atenuadas (Nicoletti, 1990).

El desarrollo de vacunas seguras y efectivas para animales y humanos representa un paso importante en el control de la brucelosis. Durante las últimas dos décadas se hicieron grandes avances en el campo de las vacunas contra esta enfermedad gracias a la secuenciación del genoma de *Brucella*, y el uso de roedores de laboratorio para probar los efectos de las vacunas (Carvalho *et al.*, 2016).

La vacuna S19 es una cepa atenuada de *B. abortus*, que fue descubierta en 1923. Se utilizó durante casi medio siglo para proteger al ganado, hasta la aparición de la vacuna RB51 a mediados de la década de los noventa. La S19 aún se usa en Argentina e India donde se demostró que la S19 protege hasta un 75% del ganado inmunizado. Sin embargo un problema de esta vacuna es que puede ocasionar abortos, si se aplica a hembras gestantes, además de ser completamente virulenta para los humanos (Carvalho *et al.*, 2016).

La vacuna RB51, no induce respuestas de anticuerpos para anti lipopolisacaridos, lo cual permite el diagnóstico de la enfermedad en el ganado por medio de los exámenes serológicos convencionales como la prueba de tarjeta o la fijación del complemento. Esta ventaja influyó para que RB51 sustituyera a S19 en muchos países. Esta vacuna puede conferir protección total del ganado vacunado. Sin embargo resulta ineficaz en las infecciones por *B. suis* (Tan *et al.*, 2018).

Vacunología Inversa

En la actualidad las nuevas tecnologías han revolucionado muchos campos de investigación, incluyendo aquellas para generar nuevas vacunas (Rinaudo *et al.*, 2009).

La aplicación de la secuenciación rápida ha posibilitado generar las secuencias genómicas de varios patógenos y una vez completada la secuencia del primer organismo vivo, se utilizan los datos genómicos para la preparación de las vacunas contra dicho organismo. La secuencia genómica completa de algún organismo es el reservorio de genes que codifican proteínas que pueden actuar como antígenos potenciales que pueden ser usados como candidatas a vacunas. Por lo tanto, esta técnica consiste en la identificación de proteínas expuestas en la superficie del microorganismo mediante el uso de software que analizan el genoma en lugar de los microorganismos vivos y atenuados, este nuevo enfoque se conoce como "vacunología inversa" (Rappuoli, 2000).

Las secuencias del genoma proporcionan a la vez todos los antígenos proteicos que el patógeno puede expresar en cualquier momento. Mediante este enfoque se entienden 4 pasos básicos (Rappuoli, 2000):

1. Secuencias del genoma.
2. Análisis informático
3. Predicción de epítotope / antígeno
4. Vacuna candidata

Este enfoque presenta muchas interrogantes, tales como si ¿serán las proteínas suficientes en cantidad de la superficie de la bacteria para estimular la reacción inmune? O si realmente ¿podrán estimular el sistema

inmune? ¿Podría desarrollar una inmunidad potente después de una infección?

Con este enfoque, se puede descubrir un nuevo antígeno que puede funcionar en un patrón diferente. Se requiere por lo tanto de una selección de alto rendimiento para la producción de una vacuna candidata viable. Para lograr esto, se estudian todos los genes de patógenos que pueden actuar eficazmente como vacuna candidata, seleccionando aquellas proteínas presentes en cantidad suficiente y que además sean esenciales para el microorganismo en cuestión (Kanampalliar *et al.*, 2013).

Técnicas usadas en la Vacunología inversa

Análisis pan genómico en la Vacunología inversa

En este enfoque, básicamente se emplean varios aislados del mismo patógeno en diferentes localizaciones y son secuenciadas para posteriormente hacer las comparaciones de todos los genomas obtenidos.

Los patógenos microbianos muestran una sorprendente capacidad de adaptación a nuevos huéspedes, antibióticos o los diferentes sistemas inmunitarios. En este aspecto se consideran importantes tres mecanismos principales en este potencial de adaptación: darwiniana o selección positiva, que favorece la fijación de mutaciones ventajosas; adquisición de nuevo material genético por intercambio de ADN y la regulación de genes. Varios estudios han sugerido que la recombinación podría ser el factor clave en la adaptación de patógenos y que las tasas de recombinación de bacterias podrían ser más altas que sus tasas de mutación (Lefébure & Stanhope, 2007).

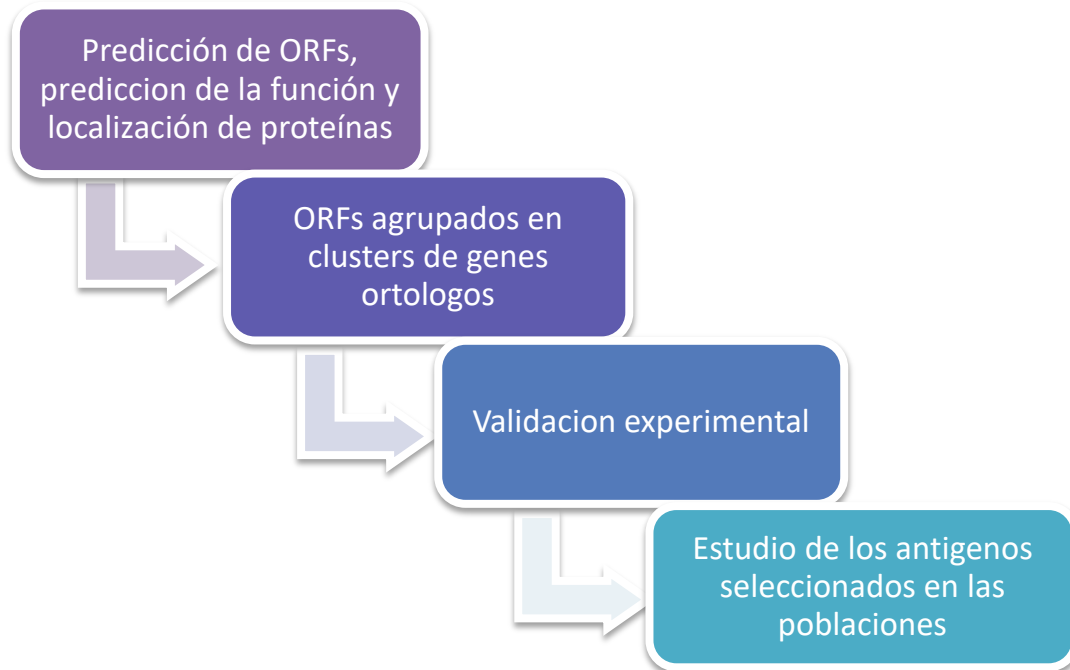


Ilustración 5 Esquema de flujo de la vacunología inversa con un enfoque pan-genómico, este enfoque se inicia con la predicción de los ORF's (open reading fragments) o fragmentos de lectura abiertos, su función y localización, posteriormente son agrupados en clusters o grupos con genes ortólogos, se validan experimentalmente y finalmente se estudian los antígenos seleccionados en poblaciones objetivo.

Vacunología inversa estructural

Este enfoque de la Vacunología inversa se basa en la búsqueda de las potenciales candidatas a vacunas mediante **su localización**, de hecho, las proteínas restringidas al compartimento citosólico no son buenas dianas inmunológicas, mientras que las estructuras asociadas a la superficie son más fáciles de acceder a los anticuerpos y, por lo tanto, se consideran mejores candidatos (Rappuoli & Pizza, 2001) (Serruto *et al.*, 2012).

Las dianas de la Vacunología inversa son generalmente proteínas relacionadas con la superficie que son reconocidas por el sistema inmunitario del huésped, eliminando así las bacterias y previniendo enfermedades.

Idealmente, estos objetivos deberían desempeñar un papel importante durante la patogénesis, aumentando así la eficacia de la vacuna.

Softwares usados en la vacunología inversa

Existen diversos programas que pueden ser usados para la búsqueda bioinformática de proteínas candidatas a vacunas, todos estos buscan solventar de diferentes formas las situaciones especiales que pudieran presentarse entre los microorganismos para los que se desea generar la vacuna. A continuación, se presenta una lista con algunos de los programas existentes con la finalidad de hacer vacunología inversa.

NERVE

Predice a partir del proteoma de un patógeno procariota. es un sistema totalmente automatizado, desarrollado para predecir secuencias para vacunología inversa a partir de proteomas bacterianos. El software implementa e integra seis tipos diferentes de análisis. El proceso se puede dividir en dos partes: producción y almacenamiento de datos y selección de datos. Seis scripts diferentes seleccionan todo el proteoma para extraerlo e inferir información que fluye hacia una tabla. Un séptimo script usa cuatro filtros (localización; topología, probabilidad de ser adhesina, similitud con proteínas humanas) y analiza los valores creados por los pasos 1 a 5 para seleccionar y clasificar los VC que luego se presentan en una tabla html con enlaces a datos relevantes (Vivona et al., 2006). Presenta algunos inconvenientes solo se enfoca en proteínas adhesivas por lo que se pasan por alto muchas proteínas secretadas significativas que pueden ser buenos objetivos de vacuna. Adicionalmente tienen problemas funcionales que pueden deberse a la falta de mantenimiento adecuado.

PanRV

Este programa emplea los enfoques de pangenoma y de vacunación inversa. PanRV consta de cuatro módulos funcionales que incluyen i) Módulo de estimación de pangenoma ii) Módulo de vacunación inversa iii) Módulo de anotación funcional y iv) Módulo de asociación de resistencia a antibióticos. Presenta los inconvenientes de que según su política de servicio guarda los resultados y los puede compartir y comercializar a terceros sin avisar a los usuarios. Únicamente usa 1 software para el análisis de predicción de localización y no hace diferenciación entre bacterias Gram positivas y negativas (Naz et al., 2019).

ANTECEDENTES DIRECTOS Y CASOS DE ÉXITO

La Vacunología inversa ha sido aplicada a una amplia variedad de microorganismos patógenos muy diferentes entre sí y cada uno con sus propios retos por resolver y con diferentes resultados y enfoques (Vishnu *et al.*, 2015) (Zvi *et al.*, 2011). Aquí se describen algunos ejemplos.

Vacunología inversa en *Streptococcus pneumoniae*

Un ejemplo son las investigaciones sobre *Streptococcus pneumoniae*, donde se generó una biblioteca con todo el genoma de aislados de este microorganismo, para posteriormente, buscar los fragmentos de lectura abierta (del inglés **Open Reading Fragments**) y con ellos localizar y seleccionar, mediante algoritmos computacionales, aquellos que estuvieran ubicados en la superficie, basándose en la predicción de unión a proteínas, si poseían dominios transportadores, dominios de unión a lipopolisacáridos o dominios de anclaje a la pared celular.

Posteriormente se procedió a la clonación y expresión de los genes, para después realizar el desafío con las proteínas en modelos murinos, para la posterior medición de títulos de anticuerpos y finalmente medir actividad bactericida de dichos anticuerpos, obteniendo resultados positivos con proteínas que estimularon fuertemente el sistema inmune (Wizemann *et al.*, 2001).

Vacunología inversa en *Erlichia ruminantium*

Otro ejemplo es el que se realizó por Liebenberg y colaboradores en 2012, en el que se utilizaron los genes de referencia para cada producto genético de *E. ruminantium* como punto de partida para el procedimiento de selección. Donde todos los productos clasificados en las siguientes categorías se consideraron como posibles vacunas: proteínas asociadas a la superficie o secretadas, transportadores, proteínas supuestamente involucradas en la adaptación de bacterias al choque térmico y otras presiones ambientales, y proteínas de función desconocida. También fueron incluidos proteínas que contienen repeticiones en tándem, tetratricopéptido o anquirina, así como los productos descritos como adhesinas, proteasas, proteínas de unión a hierro, metiltransferasas o GTPasas.

También se incluyeron homólogos de proteínas identificadas como candidatas a vacunas en otros patógenos mediante genómica funcional. Finalmente se eliminaron del conjunto hélices transmembrana, genes probados previamente en formulaciones de vacunas y ORF patentados. Los resultados fueron satisfactorios pues lograron seleccionar proteínas recombinantes que indujeron una respuesta inmune celular en células inmunes mononucleares de sangre periférica bovina que fue similar a la respuesta inducida por *E. ruminantium* intacta. Queda por determinar si estos antígenos son capaces de inducir respuestas inmunitarias protectoras contra la hidropericarditis *in vivo*. Es probable que una futura formulación de vacuna recombinante contenga proteínas que induzcan las diferentes vías inmunitarias inducidas por organismos intactos (Liebenberg, *et al.*, 2012).

Vacunología inversa aplicada a *Chlamydia trachomatis*

En un estudio publicado en 2011, Finco y colaboradores (Finco *et al.*, 2011) realizaron una estrategia para abordar la Vacunología inversa en *Chlamydia trachomatis* en la que en primer lugar, analizaron el genoma de *C. trachomatis* serovar D para identificar los genes que codifican proteínas periféricas ya que esto es una característica que predice que se asociarán con la membrana externa e interna, en segundo lugar proteínas secretadas y en tercer lugar homólogos con proteínas que se han sido reportadas que están involucradas en la virulencia o patogenicidad en otras bacterias, independientemente de su localización.

Una vez realizado esto, se procedió a someter a 120 proteínas seleccionadas de *C. trachomatis* a una expresión y posteriormente se purificaron. Se utilizaron proteínas recombinantes para generar matrices de proteínas para el análisis posterior de sueros de pacientes humanos infectados con *Chlamydia* y para probar su capacidad para estimular la producción de IFN- γ en células TCD4⁺ derivadas de bazo de ratones infectados con *C. trachomatis*.

Como último paso se realizó la evaluación de la actividad protectora de combinaciones de antígenos seleccionados utilizando el modelo de infección pulmonar de *Chlamydia muridarum* en ratón, un modelo que se eligió debido a su robustez y reproducibilidad. La selección de *C. muridarum* como cepa de prueba requirió la expresión de las proteínas de *C. muridarum* que son ortólogos de los antígenos inmunogénicos de *C. trachomatis* identificados.

Finalmente, sus resultados muestran claramente que si bien obtuvieron diversas proteínas que estimulaban el sistema inmune, solo 12 de ellas eran capaces de estimular la formación de anticuerpos y la diferenciación de células TCD4.

Vacunología inversa aplicada a *Fraciella tularensis*

En este estudio, el equipo de Zvi y colaboradores (Zvi *et al.*, 2011) describen una revisión inmunoinformática integral realizada en la secuencia del genoma de la cepa LVS de *F. tularensis*, con el fin de identificar probables epítomos mediados por células T citotóxicas (CTL) y evaluar su capacidad para provocar una respuesta de células T. Esto debido a que a pesar de la contribución bien reconocida y documentada de los CTL en la protección, los autores aseguran que la información sobre los epítomos CTL existentes de *F. tularensis* que se han verificado experimentalmente es muy limitada. Por tal motivo el equipo buscó describir una estrategia para la selección de candidatos a través del mapeo de los grupos ("hotspots") de supuestos aglutinantes de MHC. En este enfoque de análisis del genoma completo evaluaron experimentalmente en un total de 1740 probables epítomos, de los cuales fueron seleccionados 1240 péptidos basados en grupos (subgrupo I) y se seleccionaron al azar 500 probables predichos del MHC (subgrupo II). Los péptidos se sintetizaron y se probaron para determinar su capacidad para inducir una respuesta de CTL.

Los resultados se suman a las candidatas a vacunas ya existentes, pero con la diferencia de la técnica con las que se obtuvieron a la espera de ser aprobadas y comercializadas.

La aplicación de la Vacunología inversa en *Neisseria meningitidis*

Este ejemplo sin duda es el más importante de todos en los que la Vacunología inversa ha sido aplicada con éxito. En este caso se inició con los ORFs de proteínas localizadas en la membrana externa de la célula y las expresaron en otras células bacterianas, las proteínas recombinantes fueron purificadas y probadas en modelos murinos. (Pizza *et al.*, 2000)

Posteriormente se diseñaron varios protocolos con pruebas de ELISA y mediante la clasificación celular por fluorescencia (FAC). Además, se midió la actividad bactericida del suero de los animales a los que se les aplicaron las proteínas purificadas y de estas se seleccionaron 7 que fueron positivas a todas las pruebas. Posteriormente demostraron que no solo estaban presentes en la superficie de las células patógenas sino además que varias especies de *Neisseria* poseen esas mismas proteínas, sumado al hecho de que eran altamente conservadas en estas especies (Pizza *et al.*, 2000).

Finalmente, en la actualidad y después de diversos estudios para medir peligrosidad de la vacuna ya se comercializa una de estas vacunas contra *Neisseria meningitidis* en todo el mundo, principalmente en la Unión Europea y los Estados Unidos (Serruto *et al.* , 2012).

Vacunología aplicada a *Leptospira interrogans*.

Una de las aplicaciones más recientes de la tecnología de la *vacunología inversa* es la de Grassmann y colaboradores en el año 2017 (Grassmann *et al.*, 2017), quienes con base en los avances realizados por otros investigadores en el área de la *vacunología inversa* plantearon una nueva metodología y la aplicaron al género de la *Leptospira spp.*

Partiendo de las secuencias de proteína derivadas del proteoma *Leptospira interrogans* como información de entrada, fueron usados un total de 16 programas, capaces de predecir diferentes características, divididos en 5 categorías diferentes que incluyen: A) Lipoproteínas, B) Proteínas de membrana externa, C) Proteínas que poseyeran péptido señal, D) Proteínas transmembranales con menos de 2 dominios hélices alfa y finalmente E) Proteínas con estructura similar a barriles beta.

El grupo de Grassmann diseñó una matriz donde estimaron la confianza de la predicción eliminando las que obtuvieran un menor valor, obteniendo al final de este paso únicamente 9 lipoproteínas de membrana externa y 18 proteínas barriles beta con péptido señal y con menos de 2 dominios hélices alfa.

Posteriormente las proteínas resultantes pasaron a un análisis de alineamientos donde se buscaron proteínas ortólogas en las otras especies patógenas de *Leptospira spp.*

Ulteriormente, se procedió a realizar un alineamiento, pero en esta ocasión en busca de secuencias ortólogas en el Proteoma del potencial hospedador, en este caso del humano lo que dio como resultado el descarte de una proteína con un alto porcentaje de similitud en los alineamientos.

Después de esto se procedió a realizar un modelado estructural tridimensional de las 26 proteínas candidatas, y se procedió a corroborar la exactitud de estos modelados mediante otros programas y la caracterización bioinformática de las proteínas.

Finalmente se procedió a realizar la predicción de los epitopes que podría estimular al sistema inmune para cada una de las proteínas y tras este último paso se optó por seleccionar las 26 proteínas como candidatas para en un futuro ser estudiadas en el laboratorio.

En conclusión, propusieron 26 nuevas proteínas, muchas de las cuales intervienen en el metabolismo de vitaminas o de iones esenciales para este microorganismo, como candidatas a evaluar en el laboratorio con una metodología basada en la bioinformática y dentro de estas, quizá la más extensivas aplicadas al género de *Leptospira spp.*

Vacunología inversa aplicada a *Brucella melitensis*

La Vacunología inversa ha sido aplicada a *Brucella spp.* desde el año 2015, Vishnu y colaboradores (Vishnu *et al.*, 2015) analizaron el proteoma de *Brucella melitensis* 16M obteniendo en un inicio 129 proteínas predichas con presencia subcelular en la membrana externa o exoproteoma, posteriormente usando una base de datos de genes esenciales (DEG por sus siglas en ingles **D**atabase of **E**ssential **G**enes) seleccionaron aquellos genes esenciales para este microorganismo. Posteriormente buscaron determinar las proteínas con potencial virulento mediante un software basado en algoritmos de aprendizaje supervisado conocido como máquinas de soporte vectorial, donde reportaron 14 proteínas para posteriormente buscar genes homólogos con el genoma humano, seleccionaron de esta forma únicamente 11 proteínas.

Consecutivamente, decidieron seleccionar únicamente aquellas proteínas con un peso molecular menos a los 110 kDa. Posteriormente determinaron la presencia o ausencia de hélices alfa y seleccionaron aquellas donde se presentaran menos de 1 hélice, con todo esto solo quedaron 8 proteínas para su análisis.

Concluyen que estas 8 proteínas son las mejores candidatas a vacunas y aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 2 Secuencias seleccionadas por Vishnu y colaboradores

Anotación de la proteína	uniprot ID	Identificador
LPS-assembly protein LptD	Q8YG96	BMEI1264
7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	Q8YIN8	BMEI0405
cell surface protein	Q8YEK6	BMEI1872
Heme transporter BhuA	Q8YDS0	BMEI10105
Flagellin FlhC	Q8YDM5	BMEI10150
Polysaccharide export protein	Q8YGI4	BMEI1175
Immunoglobulin-binding protein Eibe	Q8YJ81	BMEI0205
Hemagglutinin	Q8YC16	BMEI10717

Por otro lado, en 2017 Saadi y colaboradores (Saadi *et al.*, 2017) aplicaron una metodología por bioinformática que demostró que es posible estimular el sistema inmune mediante vacunas multiepitopes con fines profilácticos y terapéuticos contra *Brucella*.

Su flujo de trabajo consistió en la selección de proteínas expresadas en el genoma de *Brucella* y determinaron la presencia de estas proteínas en las diferentes cepas del genero de *Brucella*, posteriormente realizaron el diseño de la vacuna seleccionando los adyuvantes, el orden de los epitopes y las uniones que pudieron usar, Una vez que seleccionaron la mejor combinación se realizó el análisis *in sillico*, finalmente usaron un software para predecir posibles reacciones alérgicas a los compuestos de la vacuna.

Al comparar ambas tablas se observa que no se encuentra ninguna secuencia compartida por estos autores.

Tabla 3 Secuencias seleccionadas por Saadi y colaboradores

nombre de la proteína	uniprot ID	Identificador
Omp 31	Q93E90	BMEI10844
BP26	Q6GV67	BMEI0536
BLS	X5DV28	BMEI10589
DnaK	Q8YE76	BMEI2002
L7-L12	C0RJL2	BMEI0748

Marco Teórico

Basado en los procedimientos descritos por Grassman y colaboradores, creemos que la aplicación de la *vacunología inversa* no ha sido aplicada en la totalidad de su potencial sobre el género de *Brucella* ya que si bien Vishnu y colaboradores aplicaron algunas metodologías que permiten predecir proteínas localizadas en la membrana externa, dejaron de lado aquellas caracterizadas como lipoproteínas. Además, al usar sólo 2 predictores basados en la misma fórmula estadística, los resultados que obtuvieron podrían dejar de lado otras proteínas con potencial para estimular la respuesta inmune (Grassmann *et al.*, 2017).

Basados en los resultados obtenidos por Rapuolli y colaboradores y por otros experimentos realizados por otros grupos de investigación en cuanto a la *vacunología inversa* se pueden destacar algunos puntos importantes cuando se desea aplicar esta técnica, la primera es que todas aquellas proteínas con el mayor potencial para estimular satisfactoriamente el sistema inmune deben estar localizadas en la parte más externa de las células patógenas o del patógeno en sí. Por otro lado, se deben seleccionar aquellas proteínas que, además de su localización, su estructura sea más probable que estimule el sistema inmune.

Basado en los antecedentes, debemos comprender las aportaciones hechas por otros autores a lo largo de años de investigación, esto nos permite comprender el porqué de cada una de las características seleccionadas. Sabemos que la principal característica de una proteína candidata a vacuna detectada por "*vacunología inversa*" es que deben ser proteínas de membrana externa expuestas de tal forma que el sistema inmune pueda reconocerlas.

Algunas de las aportaciones más importantes para el desarrollo de la “*vacunología inversa*” en las bacterias con doble membrana, como las Gram negativas, fueron las hechas por Liu y colaboradores (Liu & Rost, 2001) al señalar que alrededor del 20 % de las proteínas del genoma de las bacterias codifica proteínas que están localizadas en la membrana externa. Schulz en el año 2002 (Schulz, 2002) señaló que las estructuras predominantes en la superficie bacteriana son las hélices alfa y los barriles beta. En el año 2006 Dong y colaboradores (Dong *et al.*, 2006) demostraron que las proteínas con hélices alfa tienden a estar localizadas en la membrana interna como es el caso del translocón Wza para los polisacáridos capsulares en *E. coli*.

Por otro lado en 2016 Wilson y colaboradores (Wilson & Bernstein, 2016), proponen que en la caso de las bacterias de doble membrana como las Gram-negativas, las lipoproteínas están localizadas en las membranas externas en la mayoría de los casos.

Es ampliamente aceptado que las lipoproteínas estimulan fuertemente el sistema inmune (Brandt *et al.*, 1990), (Steinbrecher *et al.*, 1984), (Hauk *et al.*, 2008), diversas pruebas inmunológicas están basadas en este tipo de componentes celulares. Por otro lado, también han sido reportados casos en los que los barriles beta son reconocidos por el sistema inmune y generan una inmunidad protectora (Shrestha *et al.*, 2017; Sangroodi, *et al.*, 2015).

Debido a esto, en el caso de la “*vacunología inversa*” aplicada a las bacterias Gram-negativas tenemos dos categorías principales de proteínas candidatas a investigar: A) Lipoproteínas de membrana externa y B) Barriles beta de membrana externa.

En este trabajo Se optó por generar 5 categorías que definieran las proteínas que ideales para desafiar al sistema inmune y ser evaluadas como candidatas a vacunas. Dado que los softwares están diseñados para medir únicamente una característica específica y que el uso de software más complejos podría descartar potenciales vacunas se decidió generar 5 categorías dentro de las cuales agrupar las proteínas del genoma de *Brucella*.

La primera categoría es la de las **lipoproteínas**, Estas son complejos macromoleculares compuestos por proteínas y lípidos que en las bacterias tienen diferentes funciones, algunas relacionadas a su patogenicidad.

La segunda categoría es la de las proteínas clasificadas como de **membrana externa**, en esta no se hace distinción escrupulosa de su estructura, si bien algunos programas se basan en probables estructuras para determinarlas proteínas como tal.

La tercera categoría es la de los **Barriles Beta**, que en las bacterias son comúnmente asociados a poros de transporte de iones y nutrientes, varios necesarios para el microorganismo, aunque también se conocen otros asociados a resistencia a antibióticos.

En la cuarta categoría están los **péptidos señal** que están constituidos por entre 5 y 30 aminoácidos que están colocados en un orden particular y que son los primeros que aparecen cuando se está sintetizando la cadena polipeptídica. El péptido señal decide sobre el destino, la ruta de transporte y la eficiencia de secreción de una proteína.

La última categoría generada son aquellas proteínas predichas con menos de 2 **hélices alfa transmembranales**, esto sabiendo que, en el caso particular de las bacterias de doble membrana, como *Brucella*, aquellas proteínas que posean más de 2 hélices muy probablemente están en la membrana interna o en la cara interna de la membrana externa. A continuación, se describen los programas utilizados para determinar estas categorías.

LipoP (Juncker *et al.*, 2003) fue empleado para la predicción de Lipoproteínas, éste en su funcionamiento emplea 2 metodologías para evaluar el potencial de las proteínas como Lipoproteínas, el primero es un modelo estadístico de predicción conocido dentro de las redes bayesianas como Modelo oculto de Markov o *Hidden Markov Model* (HMM) y el segundo método está basado en las tecnologías computacionales de predicción de grandes bases de datos conocido como Redes Neurales.

PsortB (Yu *et al.*, 2010) es un software que predice la localización subcelular de las proteínas que son usados como información de entrada, PSORT es un algoritmo que asigna un sitio de localización probable a una proteína dada una secuencia de aminoácidos. Desarrollado originalmente para la predicción de la localización de proteínas en bacterias Gram-negativas, PSORT se expandió a un conjunto de programas (PSORT, PSORT II, iPSORT) capaces de manejar proteínas de todas las clases de organismos.

Cello (Chin-Sheng *et al.*, 2006) otro software que predice la localización subcelular, se caracteriza por el uso de máquinas de soporte vectorial multicapa que es un conjunto de algoritmos de aprendizaje supervisado.

BUSCA (Savojardo *et al.*, 2018) software que predice la localización subcelular, está basado en el funcionamiento de las redes neurales de autoaprendizaje y auto comparativos usando inteligencia artificial.

BOMP (Berven *et al.*, 2004) Es el software para la predicción de barriles beta, está basado en 3 métodos, el primero se basa en un patrón extraído de los últimos 10 aminoácidos en el extremo C-terminal de 12 proteínas de membrana externa (**O**uter **M**embrane **P**rotein) integrales con estructura cristalografica resuelta y menos del 70% de residuos conservados. El segundo método se basa en la evaluación y comparación de datos y algoritmos en los que identificaron las superficies que interactúan con la membrana de 15 OMP integrales no redundantes de barril con estructura cristalográfica resuelta. Y finalmente con el fin de limitar el número de OMP integrales predichas erróneamente (falsos positivos), pasan a un procedimiento de filtrado final. Las proteínas que tienen el patrón C-terminal o un puntaje integral significativo de β -barril se comparan con un conjunto de referencia de proteínas considerando las abundancias relativas de los aminoácidos.

MCMBB (Bagos & Liakopoulos, 2004) otro software para la predicción de barriles beta, está basado en la matrices de cálculo del modelo de cadena de Markov que captura las alteraciones de residuos hidrofílicos-hidrófobos en las proteínas con cadenas β transmembrana de la membrana externa de las propias proteínas, mientras que, al mismo tiempo, no predice una gran cantidad de falsos positivos.

TmBetaDisc-RBF (Ou *et al.*, 2008) otro software para la predicción de barriles beta, está basado en una metodología en la que primero contempla el uso de una red de funciones de bases radiales para después ser complementada con una selección de proteínas de membrana externa diferenciadas por su composición.

SignalIP es un software para la predicción de péptidos señal, este programa está basado en la determinación de la composición de los péptidos, el orden, ambos parámetros son medidos mediante puntuaciones y se combina para dar una puntuación mediante la cual la red neural determina si es o no un péptido señal, combinándolo con la metodología clásica de las matrices del modelo oculto de Markov (Petersen *et al.*2011).

TatP (Bendtsen *et al.*, 2005) Es un software para la predicción de péptidos señal cuyas siglas son del termino en ingles “Twin arginine translocation pathway” que se traduce como Vía de translocación de arginina gemela, este software está basado en los patrones de comparaciones con secuencias previamente conocidas y la inteligencia artificial mediante el uso de los matrices de cálculo de modelos ocultos de Markov.

TMHMM (Tusnády & Simon, 2001) es un software que predice la presencia de hélices alfa que está basado en los modelos de aprendizaje mediante los cálculos de matrices del modelo oculto de Markov,

PHOBIUS (Kall *et al.*, 2007) es un software que predice la presencia de hélices alfa, basado en los cálculos realizados en las matrices comunes del modelo oculto de Markov, usando este método y creando un modelo para péptidos señal y para dominios transmembranales.

Una vez que cada programa analizo el total del proteoma derivado del genoma de *B. melitensis* 16M, los resultados de cada programa, fueron filtrados mediante un script diseñado por los autores para encontrar coincidencias dentro de los programas que predicen las mismas características y de esta forma evitar posibles repeticiones o errores por filtraciones manuales.

Un paso importante para la selección de vacunas es la selección únicamente de aquellas que posean una similitud estructural baja con las proteínas propias del hospedador para evitar o reducir las posibilidades de reacciones secundarias no deseadas.

Esto se logra mediante alineamientos de secuencias, un alineamiento de secuencias en bioinformática es una forma de comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o estructuras primarias proteicas para resaltar sus zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados.

Para determinar que si las proteínas presentaban secuencias ortologas en otras especies del genero *Brucella* se utilizó el software **BLAST-XYplot viewer** (Pedraza-Pérez *et al.*, 2018) Una herramienta programada en Perl que realiza una búsqueda masiva y sistemática de un grupo deseado de proteínas o genes contra genomas bacterianos seleccionados.

Aquellas proteínas seleccionadas fueron sometidas a un análisis mediante el programa **NETMHCII** (Jensen *et al.*, 2018), predice la unión de péptidos a alelos HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP y MHC de clase II de ratón utilizando redes de neuronas artificiales. Mediante este programa se pueden obtener predicciones para 25 alelos HLA-DR, 20 HLA-DQ, 9 HLA-DP y 7 alelos H2 de clase II de ratón. Los valores de predicción se proporcionan en valores nM IC50 y cómo porcentaje de clasificación a un conjunto de 1,000,000 de péptidos naturales aleatorios. Los péptidos de uniones fuertes y débiles se indican en el archivo de resultados individualmente.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar bioinformáticamente el genoma de *Brucella melitensis str. 16M* para generar una base de datos de proteínas que pudieran ser usadas como vacunas.

Objetivos Particulares

Analizar el genoma de *Brucella melitensis* mediante el uso de los diferentes programas para obtener aquellas proteínas predichas con las siguientes características A) Lipoproteínas, B) Barril beta, C) De Membrana Externa, D) que posean Péptido Señal, E) con menos de dos dominios Hélices Alfa transmembranales.

Reducir el número de candidatas a vacunas comparando la recurrencia de las predicciones, en la presencia secuencias ortólogas en especies patógenas de *Brucella* y en la ausencia de similitudes con proteínas de los hospedadores.

Evaluar bioinformáticamente el potencial de estimulación del MHC II Mediante el programa NETMHCII en su versión 3.1 (Jensen *et al*, 2018) para seleccionar aquellas que sean predichas como “*fuertemente estimuladoras*” del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo dos.

Alcances y Limitaciones

Alcances

El presente trabajo analizó bioinformáticamente el genoma de *Brucella melitensis* 16M de una manera exhaustiva mediante una metodología que incluye el uso de 11 programas.

Limitaciones

El presente trabajo únicamente analizó el genoma de *Brucella melitensis* 16M y no incluye ninguna caracterización experimental de ninguna secuencia .

Justificación

La brucelosis es una zoonosis con alto impacto. Específicamente en México, la cepa más distribuida y la que origina la mayoría de las infecciones es producida por *B. melitensis* cepa M16 y estas, están estrechamente relacionadas con el contacto directo con animales infectados o con sus subproductos al no ser correctamente tratados (Bouza *et al.*, 2005).

Con los avances en bioinformática, es posible predecir las partículas que presentan mayor probabilidad de ser reconocidas por el sistema inmune, desencadenando una respuesta inmune efectiva en el organismo receptor de una vacuna. La metodología propuesta es una forma relevante de predecir partículas candidatas a desafiar en laboratorio.

El desarrollo de una vacuna para prevenir la infección por el género *Brucella* podría tener un alto impacto reduciendo los costos de tratamiento y la incidencia de la enfermedad, salvando el poder adquisitivo de las familias de los mexicanos.

Estrategia Metodológica

Los archivos derivados del genoma de *Brucella melitensis* bv. 1 str. 16M para los cromosomas I y II fueron descargados del *Genbank* con los números de acceso NC_003317.1 y NC_003318.1 respectivamente.

La secuencia de aminoácidos correspondiente a los 3099 CDS de ambos cromosomas fueron utilizadas como información de entrada en 11 diferentes programas que predecían diferentes características y, aunque en algunos casos predecían la misma característica, la sensibilidad y especificidad varía entre ellos. Por ello se decidió combinar los resultados de todos los programas.

Se introdujeron las secuencias de los CDS en los programas que predecían la localización subcelular para seleccionar aquellas proteínas que fueran predichas como proteínas de membrana externa, posibles lipoproteínas, barriles beta, con péptido señal y aquellas que tuvieran menos de 2 estructuras de hélices alfa transmembranales.

Las observaciones de diferentes autores apuntan que en el caso de las bacterias Gram-negativas, las principales proteínas que se presentan como probables vacunas son aquellas que se encuentran en la superficie de las células. Por ello, se seleccionaron las dos categorías siguientes, A) ser una Lipoproteína de membrana externa y B) ser una proteína Barril Beta de membrana externa con menos de 2 dominios hélices alfa transmembranales y poseer un péptido señal.

Posteriormente los resultados de los candidatos fueron ordenados y filtrados para eliminar repetidos. Estas secuencias fueron analizadas mediante alineamientos para buscar secuencias ortologas dentro otras especies del genero *Brucella* con la finalidad de determinar su presencia o ausencia en otras especies patógenas dentro del género *Brucella* pues se sospecha que de estar presentes podrían otorgar cierta protección contra estas otras especies también.

Se realizaron nuevamente alineamientos para buscar secuencias ortólogas con proteínas Humanas, así como en bovinos, ovinos, suinos, caprinos y caninos, con la finalidad de reducir los riesgos de reacción cruzada de su uso como vacunas.

Se procedió a la caracterización bioinformática de aquellas candidatas que cumplieron los criterios anteriores mediante alineamiento de secuencias para obtener una predicción de la función y una estimación de su papel en la patogenia de las bacterias del genero *Brucella*.

Posteriormente, las proteínas fueron analizadas bioinformáticamente en busca de epitopes capaces de estimular el sistema inmune en el sistema del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo dos, seleccionando únicamente aquellas que presentara un resultado como “*fuertemente estimuladoras*”.

Finalmente, las secuencias seleccionadas como las mejores candidatas fueron analizadas mediante el software STRING (Szklarczyk *et al.*, 2019) para determinar las posibles relaciones con otras proteínas y si éstas a su vez han sido descritas por otros autores como candidatas a vacunas estimuladoras del sistema inmune o usadas como reactivos de pruebas inmunológicas en otros géneros.

RESULTADOS

Los primeros resultados obtenidos fueron las predicciones individuales de cada uno de los 11 programas para todas las características usando como información de entrada los 3099 CDS de los cromosomas I y II de *Brucella melitensis* bv. 1 str. 16M. Dando un total de 34089 resultados. De los cuales:

Se obtuvieron un total de 27 Lipoproteínas, 1012 proteínas con la predicción de posible localización en la membrana externa, 222 proteínas predichas como barriles beta, 801 proteínas predichas con un dominio que es reconocido como péptido señal, y finalmente como en los casos anteriores eliminando los repetidos en la última característica predicha encontramos 2711 proteínas con menos de 2 dominios Hélices alfa transmembranales. Estos resultados son resumidos en la ilustración 6 y en la tabla 2.

Tabla 4 Numero de predicciones por programa

Número de base de datos y Programa	característica	Número de predicciones	Total de resultados por característica
04=LipoP	Lipoproteína	27	27
02=BUSCA	Membrana	371	
03=CELLO	Membrana	715	1012
07=PsortB	Membrana	828	
05=MCMBB	Barril	27	
01=BOMP	Barril	36	222
10= TMBETADISC-RBF	Barril	189	
08= Signallp	Péptido	370	
09=TatP	Péptido	530	801
06= phobius	Hélices	2709	
11=TMHMM	Hélices	1805	2711

Debido a que todos los programas presentaron una amplia variedad en el orden de los datos de salida, se optó por utilizar el número GI (**GenInfo Identifier**) como identificador para ordenar y filtrar los resultados. De esta forma se generaron 11 bases de datos, una para cada uno de los programas. Los resultados ordenados y filtrados se resumen en la tabla 2.

Se procedió a realizar un análisis comparativo sistemático de cada una de las bases de datos contra las otras 10, con un total de 22 millones 352 mil 670 comparaciones. Todo esto se realizó mediante un *script* (un programa con una secuencia de comandos que la computadora entiende y ejecuta) que tomó un GI de una base de datos y lo comparaba contra el resto de las bases de datos.

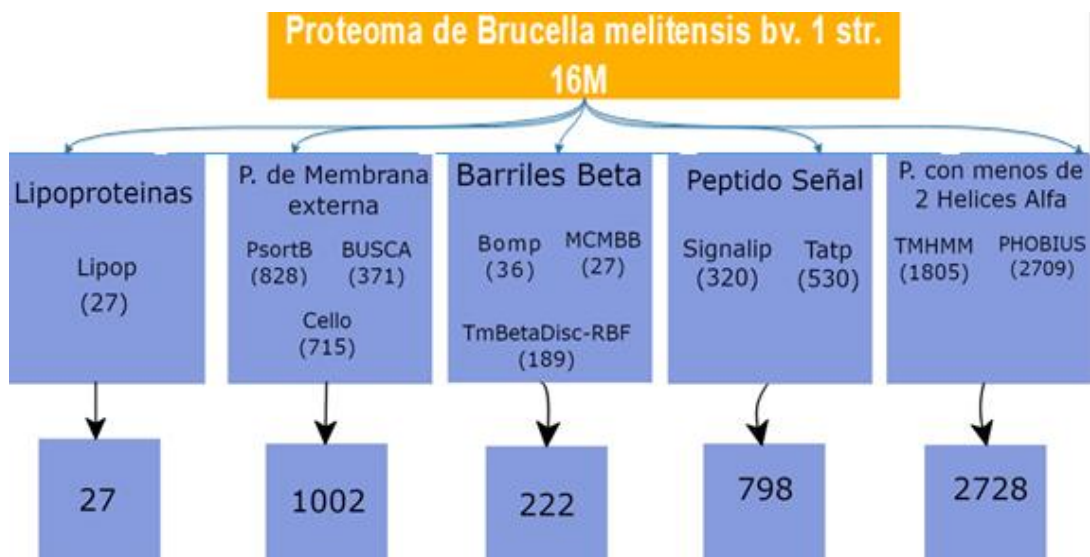


Ilustración 6 Esquema que resume los resultados por categoría y en la parte inferior los resultados de cada categoría eliminando las secuencias repetidas

Tabla 5 GIs con al menos 2 características deseadas y base de datos en las que fueron encontradas. B= Barril, M= Membrana, P= péptido señal, H= <2 Hélices, L=Lipoproteína

Características predichas	GI	Programas predichas
B,M,H	17986342	01,06,07,10,11
B,M,P,H	17986628	01,03,08,10,11
B,M,H	17986685	01,02,03,06,07,10,11
B,M,H	17986687	01,03,06,07,10,11
B,M,P,H	17986737	01,02,03,05,06,07,08,11
B,M,H	17986940	01,03,07,10,11
B,M,H	17987000	01,05,06,07,10,11
B,M,P,H	17987113	01,03,06,07,08,10,11
B,H	17987283	01,11
B,M,P,H	17987290	01,02,03,06,07,08,10,11
B,M,H	17987308	01,03,06,07,10,11
B,M,P,H	17987312	01,02,03,06,07,08,10
B,M,P,H	17987458	01,03,04,06,08
B,M,P,H	17987532	01,03,06,07,08,10
B,M,P,H	17987547	01,02,03,06,07,08,10
B,M,P,H	17987588	01,03,06,07,08,10
B,M,P,H	17987589	01,03,06,07,08,10
B,M,P,H	17988112	01,03,06,07,08,10
B,M,P,H	17988113	01,03,06,07,08,10
B,M	17988332	01,03
B,M,H	17988447	01,02,06,11
B,M,H	17988449	01,03,06,07,10,11
B,M,H	17988642	01,03,05,06,07,10,11
B,M,P,H	17988721	01,02,03,06,07,08,10,11
B,M,H	17989189	01,02,06,07,10,11
L,M,P	17986322	04,08,11
L,M,P	17986412	04,08,11
L,B,M,P,H	17986419	04,05,06,07,08,11
L,M,H	17986512	02,04,11
L,H	17986570	04,11
L,M,P,H	17986623	03,04,06,07,08,10,11
L,M,H	17986684	03,04,10,11
L,P,H	17986846	04,08,11
L,M,P,H	17987068	04,06,07,08,10,11
L,M	17987069	03,04,10
L,M	17987497	02,04
L,B,M,P,H	17988361	04,05,06,07,08,11

L,P,H	17988375	04,06,08,11
L,M,H	17988419	02,04,06,10,11
L,M,P,H	17988726	03,04,06,08,10,11
L,M	17988850	03,04
L,M,P,H	17989148	04,06,07,08,10,11
L,M,P,H	17989314	04,06,07,08,11
L,M,P,H	17989427	03,04,06,07,08,10,11
B,M,H	17986353	02,05,06,07,11
B,M,H	17986507	05,06,07,11
B,M	17986668	02,03,05
B,M	17986844	05,06,07
B,M	17986953	05,07
B,M,P	17987112	05,07,9
B,M,H	17987175	05,06,07,10
B,M,H	17987245	03,05,06,07,10,11
B,M	17988143	05,07
B,M,H	17988194	05,06,07
B,M,H	17988335	05,06,07
B,M,P,H	17988368	02,05,06,07,08,09,11
B,M,H	17988380	05,06,07,11
B,M,H	17988427	05,06,07,11
B,M,H	17988428	05,06,07,10,11
B,M,H	17988692	05,06,07,11
B,M,H	17988817	05,06,07,10,11
B,M,H	17988971	05,06,07,11
B,M	17989151	05,07
B,M,P	17989315	02,03,05,09
B,M,P	161511136	02,03,05,07,09
B,M	161511178	02,03,05,07
L,M,H,B	17987362	04,06,07,10
L,M,H,P	17988265	04,06,07,09

Mediante esta comparación, fueron seleccionadas un total de 32 proteínas, 14 de las cuales pertenecen a la categoría de Barriles Beta de membrana externa y 18 son lipoproteínas de membrana externa. En la tabla 6 se muestran los GI's de cada secuencia y un resumen de su caracterización bioinformática.

Estas 32 proteínas fueron analizadas mediante alineamientos de secuencias para determinar la presencia o ausencia de proteínas ortólogas en otras especies patógenas dentro del género *Brucella*. Debido a esto se descartó 1 proteína ya que no fueron encontradas proteínas ortólogas en ninguna otra especie patógena de *Brucella*. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6 Proteínas barril beta de membrana externa y lipoproteínas de membrana externa. Se presentan las 32 proteínas con la caracterización bioinformática resumida de cada una.

característica predicha	GIs	Caracterización Bioinformática
B,M,P,H	17986628	Proteína de membrana externa, enzima PagP, Barril-β
B,M,P,H	17986737	OmpW Proteína de membrana externa, enzima PagP, Barril-β
B,M,P,H	17987113	Antígeno de superficie bacteriana D15, Proteína de membrana externa factor de ensamble BamA
B,M,P,H	17987290	Proteína de membrana externa, enzima PagP, Barril-β, Barril autotransportador de membrana externa
B,M,P,H	17987312	Proteína de membrana externa de secreción tipo 1, TolC proteína de salida de membrana externa BepC
B,M,P,H	17987458	Proteína de exportación del polisacárido, dominio de unión a ligando soluble
B,M,P,H	17987532	Proteína de membrana externa, enzima PagP, Barril-β, Proteína de membrana externa relacionada a la virulencia
B,M,P,H	17987547	proteína de ensamble del LPS LptD, proteína de tolerancia a solventes orgánicos,
B,M,P,H	17987588	alpha-Porina tipo proteobacteria
B,M,P,H	17987589	Porina Omp2a, alpha-Porina tipo proteobacteria
B,M,P,H	17988112	Barril autotransportador de membrana externa
B,M,P,H	17988113	Proteína de membrana externa Barril-β, Barril autotransportador de membrana externa
B,M,P,H	17988721	Proteína de membrana externa, Barril-β
B,M,P,H	17988368	Transglucosilasa SLT dominio 2, Mureína lítica transglucosilasa, Unión a peptidoglicano
L,M,P	17986322	Alérgeno de polen Poa pIX/Phl pVI, proteína con dominio catalítico L,D-transpeptidasa
L,M,P	17986412	Proteína Zinc cinta que contiene el dominio, Aminopeptidasa N
L,B,M,P,H	17986419	Lipoproteína de membrana externa Omp19
L,M,H	17986512	Proteína Familia LemA
L,M,P,H	17986623	lipoproteína asociado al Peptidoglicano C-terminal, oarecido a OmpA, sitio conservado
L,M,H	17986684	dominio similar al patatínfosfolipasa proteína asociada al peptidoglicano
L,M,P,H	17987068	Transglycosylase SLT dominio 1
L,M	17987069	Cremallera similar a YMGG, Proteína de membrana externa bacteriana
L,M	17987497	Cremallera similar a YMGG, Mlr3708 proteína, antígeno de superficie de 17 kDa
L,B,M,P,H	17988361	Lipoproteína de membrana externa omp10
L,M,H	17988419	Oxidoreductasa, dominio de unión a molibdopterina, vía de translocación gemelar-arginina,
L,M,P,H	17988726	Bomba de flujo de salida RND, proteína de fusión membranal, dominio barril-sandwich, subunidad del adaptador periplásmico del transportador Efflux RND
L,M	17988850	Dominio transmembranal similar a MetI, Sistema transportador Oligopeptido permeasa
L,M,P,H	17989148	Dominio similar a Biotin-lipoyl Proteína de resistencia a múltiples fármacos Proteína accesoria reductasa de óxido nítrico NosL
L,M,P,H	17989314	Proteína accesoria de óxido nítrico reductasa NosL Lipoproteína de membrana externa nosL
L,M,P,H	17989427	Proteína L del anillo,
L,M,H,B	17987362	Doiminio LysM, motive híbrido duplicado, proteína m23
L,M,H,P	17988265	Transportador de fosfonato ABC, componente periplásmico de unión a fosfato

Se realizaron alineamientos de secuencias para determinar si estas 32 secuencias estaban presentes en las principales especies patógenas de *Brucella*, estas incluyen *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*, de esta forma la secuencia identificada con el GI 17987497 paso a un segundo plano, pues únicamente fue encontrado en el *B. melitensis*.

Las 31 secuencias presentadas en la tabla 6 fueron analizadas mediante el software NETMHC para determinar su similitud con aquellos que son capaces de estimular fuertemente el sistema inmune. De esta forma se obtuvieron 25 proteínas que obtuvieron el resultado de “*Fuertemente estimuladora*”. Estos resultados se muestran la tabla 4.

Tabla 7 Secuencias Estimuladoras Fuertes del Sistema Inmune. En la tabla se observan en color verde el “si” en caso de obtener como resultado “fuertemente estimuladora” y un “si” en color negro en caso de obtener como resultado “moderadamente estimuladora” y “no” en caso de obtener un resultado “negativo”.

GI	E. F. S. I.	GI	E. F. S. I.	GI	E. F. S. I.	GI	E. F. S. I.
17986628	si	17987588	si	17986419	no	17988726	si
17986737	si	17987589	si	17986512	si	17988850	si
17987113	si	17988112	si	17986623	si	17989148	si
17987290	si	17988113	si	17986684	no	17989314	si
17987312	si	17988721	si	17987068	no	17989427	no
17987458	si	17988368	si	17987069	si	17987362	si
17987532	no	17986322	si	17988361	si	17988265	no
17987547	si	17986412	si	17988419	si		

Posteriormente, las 31 secuencias seleccionadas en la tabla 7 fueron analizadas mediante alineamientos, con la finalidad de determinar si estas poseían proteínas ortólogas en la especie humana, así como en otros mamíferos incluidos: bovinos, ovinos, caprinos, suinos y caninos. Con la finalidad de seleccionar aquellas proteínas con menor riesgo al ser usadas en los diferentes hospedadores y reducir la posibilidad de una reacción cruzada, solo fueron seleccionadas aquellas con un porcentaje de similitud menor a 30. Estos resultados se resumen en las tablas 8 y 9.

Tabla 8 Porcentajes de identidad por especies

Especie	Numero de secuencias por porcentaje de identidad			
	% de identidad < 50	% de identidad < 30	% de identidad > 30	% de identidad = 0
Humanos	0	11	20	8
Bovinos	1	18	12	3
Ovinos	1	13	17	6
Caprinos	1	18	12	3
Suinos	1	12	18	8
Caninos	2	14	15	6

Tabla 9 secuencias con sus resultados individuales

GIs	Especies Objetivo	% de identidad Humanos	% de identidad Bovinos	% de identidad ovinos	% de identidad suinos	% de identidad caninos	% de identidad caprinos
17986628	5	0	40	33	25	0	33
17986737	5	31	0	26	36	36	0
17987113	5	23	28	27	27	33	27
17987290	4	0	28	30	0	0	48
17987312	5	35	31	31	48	27	31
17987458	5	0	47	28	30	0	30
17987532	5	36	25	45	42	45	45
17987547	5	26	40	40	26	27	40
17987588	4	48	45	26	0	0	25
17987589	5	0	26	0	0	28	24
17988112	5	27	32	48	26	32	48
17988113	5	21	33	23	27	20	34
17988721	5	0	0	0	0	0	28
17988368	5	34	33	0	0	0	0
17986322	5	25	33	27	35	28	43
17986412	5	29	33	36	28	28	36
17986419	5	26	43	37	45	43	43
17986512	5	24	30	31	26	25	29
17986623	5	35.4	37	26	0	40	0
17986684	5	36	36	36	39	40	36
17987068	5	30	29	29	39	30	29
17987069	5	0	50	50	31	51	50
17987497	1	45	48	48	44	48	48
17988361	5	0	65	65	65	65	65
17988419	5	32	29	29	34	32	37
17988726	4	23	28	0	0	0	28
17988850	5	0	43	42	33	31	42
17989148	5	23	47	47	23	45	47
17989314	5	32	33	0	0	33	33
17989427	5	29	26	26	26	39	26
17987362	5	32	44	44	41	47	46
17988265	5	48	0	0	37	38	42

Al comparar los resultados que se obtuvieron de las 31 secuencias, se seleccionaron únicamente aquellas catalogadas como “fuertemente estimadoras del sistema inmune” y posean un porcentaje de similitud con las secuencias ortólogas del hospedador < a 30, se obtuvieron 18 secuencias que cumplen estas características cuando el hospedador es el humano, 8 secuencias que cumplen estas características cuando el hospedador es el bovino, 14 secuencias que cumplen estas características cuando el hospedador es el ovino, 10 secuencias que cumplen estas características cuando el hospedador es el caprino, 17 secuencias que cumplen estas características cuando el hospedador es el suino y 14 secuencias que cumplen estas características cuando el hospedador es el canino. Estos resultados se resumen en la tabla 9.

Por otro lado, partiendo de los resultados obtenidos en la tabla 10 podríamos pensar en refinar la búsqueda a aquellas proteínas que presentan un porcentaje de identidad con proteínas de los diferentes hospedadores en al menos una especie y que además sea predicha como fuertemente estimuladora del sistema inmune, quedando de esta forma únicamente 24 secuencias que procedimos a analizar bioinformáticamente de manera más detallada.

Tabla 10 Secuencias de importancia por hospedador. El GI en la columna izquierda representa la categoría en la que fue catalogada; en rojo las lipoproteínas y en azul los barriles Beta. Las celdas se encuentran remarcadas en verde como las secuencias que catalogamos como ideales para investigar en cualquier especie de hospedadores al no presentar similitud con las proteínas propias de los hospedadores superior al 30%, en amarillo aquellas que únicamente en una especie presento una similitud superior al 30%, en blanco aquellas que fueron encontrada en más de una especie y de naranja aquellas fueron encontradas en todas las especies con un % de similitud superior a 30.

Gis	Humanos	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suinos	Caninos
17986628	✓	✗	✗	✗	✓	✓
17986737	✗	✓	✓	✓	✗	✗
17987113	✓	✓	✓	✓	✓	✗
17987290	✓	✓	✓	✗	✓	✓
17987312	✗	✗	✗	✗	✗	✓
17987458	✓	✗	✓	✓	✓	✓
17987532	✗	✗	✗	✗	✗	✗
17987547	✓	✗	✗	✗	✓	✓
17987588	✗	✗	✓	✓	✓	✓
17987589	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17988112	✓	✗	✗	✗	✓	✗
17988113	✓	✗	✓	✓	✓	✓
17988721	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17988368	✗	✗	✓	✓	✓	✓
17986322	✓	✗	✓	✗	✗	✓
17986412	✓	✗	✗	✗	✓	✓
17986419	✗	✗	✗	✗	✗	✗
17986512	✓	✓	✗	✓	✓	✓
17986623	✗	✗	✓	✓	✓	✗
17986684	✗	✗	✗	✗	✗	✗
17987068	✗	✗	✗	✗	✗	✗
17987069	✓	✗	✗	✗	✗	✗
17988361	✓	✗	✗	✗	✗	✗
17988419	✗	✓	✓	✗	✗	✗
17988726	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17988850	✓	✗	✗	✗	✗	✗
17989148	✓	✗	✗	✗	✓	✗
17989314	✗	✗	✓	✗	✓	✗
17989427	✗	✗	✗	✗	✗	✗
17987362	✗	✗	✗	✗	✗	✗
17988265	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Caracterización bioinformática de las secuencias candidatas

En esta sección se procedió a la caracterización bioinformática de las secuencias seleccionadas mediante diferentes programas de análisis de secuencias como *STRING*, *BlastP* y *BLAST-XYPlot Viewer*. Primeramente, se muestran las 3 secuencias seleccionadas como las más importantes al haber cumplido todos los criterios establecidos y adicionalmente haber mostrado en todas las especies de hospedadores un porcentaje de identidad de 0.

Encontrándose que en el caso de la secuencia identificada con el GI 17987589 fue encontrada e identificada como BME11306 presentando un dominio perteneciente a las porinas tipo 2. Esta familia está compuesta por porinas de la subdivisión alfa de Proteobacterias, los miembros de esta familia están relacionados con porinas en bacterias Gram negativas (de Maagd *et al.*, 1992), esta proteína ha sido investigada como parte de una prueba de detección de infección de *Brucella canis* en perros y *B. suis* en cerdos demostrando alta sensibilidad y especificidad en ambos casos, adicionalmente ha sido propuesto como un potencial antígeno para la detección de infección por brucelosis en humanos. (Boeri *et al.*, 2018) (Ferreira *et al.*, 2017) (Pathak *et al.*, 2017).

La secuencia identificada como BMEI0376 con el GI 17988721, corresponde con dominios barril beta, además de un dominio concordante con la familia AG_2, Esta familia incluye varios antígenos de superficie bacterianos expresados en la superficie de los patógenos. Las proteínas de la superficie marginal de Anaplasma son objetivos o respuestas inmunes protectoras, pero son polimórficas antigénicamente (Palmer *et al.*, 1994), adicionalmente de una similitud también con una familia identificada como Pfam opacity identificada en la interacción de diversos patógenos con sus hospedadores (Dehio *et al.*, 1998).

En el caso de la secuencia anotada con el GI 17988726 (BMEI0381), fue encontrada un dominio denominado HlyD_D23, estos son los dominios combinados 2 y 3 de las proteínas de fusión de membrana CusB y HlyD, que forman un barril tipo sandwich. Las proteínas CusB y HlyD son proteínas de fusión de membrana del sistema de flujo de cobre CusCFBA en *E. coli* y bacterias relacionadas. Adicionalmente tiene un residuo de lisina conservado que se une a la biotina o al ácido lipoico. La biotina desempeña un papel catalítico en algunas reacciones de transferencia de carboxilo y se une covalentemente, a través de un enlace amida, a un residuo de lisina en enzimas que requieren esta coenzima. (Shenoy *et al.*, 1992). Es interesante destacar que se encontró en esta proteína una fusión en otros microorganismos con dominios relacionados a la resistencia a fármacos a través de inhibidores hidrofóbicos (Ma *et al.*, 1993). Cabe señalar además una tendencia a encontrar esta proteína río arriba o abajo con otros genes relacionados con la resistencia a fármacos, así como la síntesis y exportación de sideroforos (Wells *et al.*, 2013).

A continuación, se muestran las secuencias que cumplen los criterios de búsqueda, pero fueron colocadas en segundo plano al presentar una similitud superior al 30% con proteínas de al menos uno de los diferentes hospedadores.

En el caso de la secuencia anotada con el GI 17986628 (BMEI0345), se encontró, en uno de los dominios de la secuencia, una secuencia ortóloga con una proteína identificada como antígeno de superficie 2, en esta familia se incluyen varios antígenos de superficie bacterianos expresados en la superficie de los patógenos incluido *Anaplasma marginale* (Palmer, Eid, Barbet, McGuire, & McElwain, 1994). Además, otro dominio exhibió una similitud con una proteína de una familia identificada como “Pfam opacity” anotada en la interacción de diversos patógenos con sus hospedadores como es el caso de *Neisseria* spp. (Dehio *et al.*, 1998).

La secuencia con el GI 17986737 (BMEI0454). Esta secuencia presentó un dominio similar a aquellas proteínas de una familia que incluye proteínas de la membrana externa de la proteína W (OmpW) de una variedad de especies bacterianas. Esta familia puede formar el receptor para las colicinas S4 (PilsI *et al.*, 1999). Adicionalmente, se encontró un estudio en el que una secuencia ortóloga similar a esta es un poro y es esencial para el envío de la fosfatasa alcalina (PhoA) a la superficie celular en bacterias ácido acéticas (Blank & Schweiger, 2018).

Fue encontrada la proteína conocida como bamA, o también destacado como antígeno D15, con el GI 17987113 (BMEI0830). Esta proteína es parte del factor de ensamblaje de proteínas de la membrana externa BamA; forma parte del complejo de ensamblaje de proteínas de la membrana externa, que está involucrado en el ensamblaje y la inserción de proteínas *beta-barrel* en la membrana externa. D15 es un antígeno altamente conservado que protege en modelos animales y puede ser un componente útil de una vacuna de subunidad universal contra la infección causada por *Haemophilus* (Loosmore *et al.*, 1997).

La secuencia identificada BMEI1007 con el GI 17987290 forma parte de la membrana externa actuando como autotransportador, es conocido como OmpA y resulta ser altamente conservado evolutivamente (Pautsch & Schulz, 1998). Por otro lado esta proteína ha sido identificada en *B. melitensis* al estar involucrada en el proceso de regulación llamado detección de “quorum” al fungir como un regulador transcripcional perteneciente a la familia LuxR (Uzureau , y otros, 2010). Adicionalmente se encontró una secuencia ortóloga que está relacionada a la resistencia a los carbapenemas en *Klebsiella pneumoniae* (Adams-Sapper *et al.*, 2018).

En el caso de la secuencia anotada con el GI 17987312 (BMEI1029) esta proteína forma parte de la familia conocida como OEP (*outer membrane efflux protein*) Los ejemplos incluyen la proteína de membrana externa TolC de *Escherichia coli*, que se requiere para la expresión adecuada o genes de proteína de membrana externa; la proteína de nodulación de *Rhizobium*; y la proteína de *Pseudomonas* FusaA, que participa en la resistencia al ácido fusárico. Además, buscando en las bases de datos de KEGG encontramos que esta proteína tiene roles importantes en la vía de resistencia a los betalactámicos, así como en la vía de resistencia del péptido catiónico antimicrobiano (CAMP *Cationic antimicrobial peptide*).

La secuencia con el GI 17987458 (BMEI1175) esta proteína pertenece al grupo del ácido colánico (CA colanic acid), un polisacárido extracelular que es producido por especies de la familia Enterobacteriaceae, este se encuentra en la parte membrana externa e interviene en la exportación del polisacárido desde la célula (Stevenson *et al.*, 1996). Además, se encuentra reportada en la base de datos KEGG por participar en el metabolismo de la manosa y la fructosa, además de en el metabolismo de azúcares amino y nucleótidos.

Fue encontrada la proteína perteneciente a la familia OstA con el GI 17987547 (BMEI1264), esta familia está involucrada en la tolerancia a solventes orgánicos en bacterias. La región contiene varios residuos altamente conservados, potencialmente catalíticos. OstA es uno de una serie de genes que confieren tolerancia a solventes orgánicos en *Escherichia coli* (Aono *et al.*, 1994). También fue encontrado en la base de datos KEGG como parte de los transportadores ABC.

La secuencia identificada como BMEI1305 con el GI 17987588 pertenece a las porinas tipo 2. Esta familia está compuesta por porinas de la subdivisión alfa de Proteobacterias, los miembros de esta familia están relacionados con porinas en bacterias Gram negativas (de Maagd *et al.*, 1992). Esta proteína presenta dominios similares a la secuencia identificada como BMEI1306, ha sido investigada como parte de una prueba de detección de infección de *Brucella canis* en perros y *B. suis* en cerdos demostrando alta sensibilidad y especificidad en ambos casos. Adicionalmente ha sido propuesto como un potencial antígeno para la detección de infección por brucelosis en humanos. (Boeri *et al.*, 2018) (Ferreira *et al.*, 2017) (Pathak *et al.*, 2017).

En el caso de la secuencia identificada con el GI 17988112 fue encontrada e identificada como BMEI1829 esta proteína forma parte de la membrana externa actuando como autotransportador, es conocido como OmpA y resulta ser altamente conservado evolutivamente (Pautsch & Schulz, 1998). Sin embargo, no fue encontrada ninguna referencia que señale a esta proteína como estimuladora del sistema inmune en *Brucella* o en otras bacterias.

En el caso de la secuencia anotada con el GI 17988113 (BMEI1830) esta proteína posee un dominio con una estructura muy similar a la secuencia identificada con el GI 17988112. Este además presenta un dominio autotransportador que significa que es el componente de proteína que regula la secreción a través de la membrana externa está contenido dentro de la proteína secretada, por lo tanto, las proteínas secretadas de esta manera se llaman autosecretadas.

La secuencia con el GI 17988368 (BMEI0024) esta proteína presenta varios dominios transmembranales y representa el dominio de unión a peptidoglicano (PGBD), así como los dominios relacionados que comparten la misma estructura. Adicionalmente presenta similitud con otras proteínas que se encuentran en el extremo N o C de una variedad de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular bacteriana (Krogh *et al.*, 1998) (Dideberg *et al.*, 1982).

La secuencia identificada como BMEI0038 con el GI 17986322 anotada únicamente como una proteína hipotética y predicha como lipoproteína de membrana externa. Sin embargo, se encontró similitud con dominios que presentan una probable coexpresión con la proteína conocida como accA una subunidad del acetil carboxilasa coenzima A.

En el caso de la secuencia con el GI 17986412 (BMEI0128) fue predicha como una lipoproteína de membrana externa y se encuentra anotada como una proteína hipotética, usando la predicción de relación del software STRING únicamente se encontró una coexpresión predicha con las proteínas conocidas como gloB, BMEI0130 y ftsY.

En el caso de la secuencia identificada con el GI 17986512 fue encontrada e identificada como BMEI0128 Los miembros de esta familia están relacionados con la proteína LemA. La función molecular exacta de esta proteína es incierta. Se predice que es una proteína transmembrana con un extremo N extracelular (Lenz *et al.*, 1996).

En el caso de la secuencia anotada con el GI 17986623 (BMEI0340) esta proteína representa el dominio con una estructura beta / alfa / beta / alfa-beta que se encuentra en la región C-terminal de muchas proteínas de la membrana externa bacteriana Gram-negativas (De Mot *et al.*, 1992). Sin duda, lo más relevante de esta proteína demuestra similitud con secuencias ortólogas que han sido identificadas y propuestas por varios autores por estimular de manera fuerte el sistema inmune en diversos experimentos (Lalsiamthara & Lee, 2017) (Mailybayeva *et al.*, 2017).

La secuencia con el GI 17987069 (BMEI0786) presenta una alta similitud con la secuencia identificada con el GI 17986623. Por otro lado, también se encontró que esta secuencia presenta un ortólogo con una proteína identificada en *Neisseria meningitidis* que ha sido asociada al péptidoglicano (Tommasen & Arenas, 2017).

La secuencia identificada como BMEI0017, con el GI 17988361, se destaca que ha sido usada en experimentos para evaluar si estimulan el sistema inmune en una comparación contra otras proteínas de la membrana externa, resultando esta con una estimulación moderada del sistema inmune (Im *et al.*, 2018), adicionalmente también se destaca que en mutantes de *B. ovis*. esta proteína no parece tener una importancia crucial para el desarrollo de la infección y supervivencia de la bacteria (Sidhu-Muñoz *et al.*, 2016).

En el caso de la secuencia identificada con el GI 17988419 fue encontrada e identificada como BMEI0075, esta proteína parece ser una sulfitoreductasa, con unión al cofactor molibdopterina. Además, fue encontrada mediante el programa STRING que tiene una vecindad recurrente en diferentes bacterias con el gen del citocromo "C" e incluso una fusión reportada en otros organismos con el BMEI0074 que es el citocromo b561, una proteína de membrana integral y de transporte de electrones.

En el caso de la secuencia identificada con el GI 17988850 fue encontrada e identificada como BMEI0505, esta proteína es un transportador conocido como transportador ABC. Los transportadores ABC están constituidos mínimamente por dos regiones conservadas: un casete de unión a ATP altamente conservado (ATP Binding Cassette) y un dominio transmembrana menos conservado. Estas regiones se pueden encontrar en la misma proteína (principalmente en eucariotas y proteínas exportadores en bacterias) o en dos diferentes (Saurin *et al.*, 1999).

En el caso de la secuencia identificada con el GI 17989148 fue encontrada e identificada como BMEI0803, esta secuencia fue asociada con ortologas en otros microorganismos por ser una proteína con dominios de unión a biotina o ácido lipoico. Además de un dominio de proteínas HlyD translocadoras de hemolisina presentes en gran parte de las bacterias. En otras bacterias se han encontrado fusiones con genes vecinos a este como el BMEI0802 una ATPasa, también está el caso de la BMEI0801 una proteína transportadora de membrana ABC-2 (Cheng *et al.*, 1997).

En el caso de la secuencia anotada con el GI 17989314 (BMEI0969) esta proteína presenta una similitud con otras conocidas como NosL, es una de las proteínas accesorias del grupo de genes **NOS** (óxido nitroso reductasa). Esta proteína también contiene represores transcripcionales de tipo HTH, incluido YcnK. Este puede actuar como un regulador transcripcional negativo de YcnJ en presencia de cobre y puede usar el cobre como un corepresor. El gen, ycnK, se induce significativamente en condiciones limitantes de cobre (Chillappagari *et al.*, 2009). Mediante STRING fue encontrada de manera recurrente que en varios microorganismos presenta vecindad con BMEI0970 una proteína transportadora de membrana ABC-2 (Cheng *et al.*, 1997).

Discusión

La brucelosis es una de las zoonosis de mayor importancia en el mundo pues tiene impacto negativo en la salud pública y en la economía alrededor del mundo, esto debido al más de medio millón de casos nuevos anuales registrados en el mundo y las restricciones al comercio de las zonas en combate contra la enfermedad.

La forma más efectiva del combate contra esta enfermedad es la prevención, la vacunación de animales y la pasteurización de subproductos de estos como la leche y los quesos ha disminuido considerablemente el número de casos. Sin embargo, en México las infecciones continúan ocurriendo debido a el consumo de productos “artesanales” o “frescos” sin pasteurizar.

La vacunación es la forma más fácil de controlar la incidencia de casos nuevos en la población, sin embargo se carece de una vacuna de uso en humanos debido a que las vacunas actualmente disponibles son a base de microorganismos vivos atenuados capaces de inducir la infección en los humanos. Por otro lado las vacunas disponibles tampoco sirven para inmunizar las especies animales de producción pues estas no inmunizan a pequeños rumiantes como ovejas y cabras, además también están casos de infección en humanos por *Brusellas* que afectan otros animales domésticos como los perros.

La “Vacunología inversa” es una tecnología relativamente reciente que ha demostrado ser efectiva en el desarrollo de vacunas para la prevención de enfermedades como es el caso de *Neisseria meningitidis*. Que actualmente ya tiene una vacuna aprobada para su uso en la unión europea basada en esta tecnología.

En este estudio se propuso analizar el genoma de *Brucella melitensis* para determinar si poseía secuencias en su genoma que pudieran ser consideradas como potenciales vacunas, mediante de la predicción de su localización y estructura inicialmente y posteriormente seleccionando aquellas que presentaran la menor similitud a secuencias de los hospedadores posibles y que además estimularan el sistema inmune mediante el MHC de tipo dos.

En primer lugar, se debe tomar en cuenta que desde el inicio de la investigación sabemos que la metodología aún está desarrollándose y que debe mejorarse a lo largo del tiempo y con más modelos. Por ello se procedió a caracterizar bioinformáticamente todas las proteínas que obtuvieran 2 o más de características buscadas, aún si estas no fueran específicamente las de interés.

De este primer punto se rescatan varias proteínas que deben ser conservadas para futuros análisis como la identificada con el GI 17986342 que es una proteína involucrada con la pertactina, que ha sido estudiada por estar involucrada en la fisiopatología de *Bordetella* (Li *et al.*, 1992).

Otro ejemplo de esto es la secuencia identificada con el GI 17988449 que con el análisis hecho sólo fue predicho como una proteína con dominio Barril Beta y estar localizada en la membrana externa. Lo que la desvaloriza es el carecer de un péptido señal según los programas utilizados, cabe mencionar que esta proteína ha sido señalada por otros autores como una proteína a estudiar en el futuro como candidata a vacuna contra *brucella* (Vishnu *et al.*, 2015).

Un ejemplo más de esto, es la secuencia identificada con el GI 17988375 al analizarla mediante el programa STRING fue encontrado un dominio cuya secuencias ortologas han sido identificados como una proteína conocida como T4SS que está involucradas en la entrega de moléculas efectoras a las células eucariotas objetivo; cada uno de estos sistemas exporta ADN o sustratos de proteínas distintos para efectuar una miríada de cambios en la fisiología de la célula huésped durante la infección (Christie, 2001).

Un aspecto a resaltar respecto a aquellas proteínas que pasaron a segundo plano al hacer la diferenciación respecto a si se predijo que estimularan fuertemente el sistema inmune o no, es que solo aquellas que el programa no señalara como “fuertemente estimuladoras” en algunos casos obtuvieron resultados como “estimuladora del sistema inmune”. Sin embargo, al no cumplir con el valor establecido fueron puestas en segundo plano, tal es el caso de la secuencia identificada con el GI 17987068.

En el caso específico de la secuencia con el GI 17987497 y el identificador BME11214 fue analizada mediante diversos alineamientos, sin embargo, no fue posible una caracterización total. Posee una estructura de Cremallera Gly tipo YMGG, un dominio lipoproteico similar al señalado en *Rickettsia rickettsii* como un antígeno en potencia contra este microorganismo, se sabe que está altamente conservado y que interviene de alguna manera en la patogénesis, además de haber sido encontrada en diversos microorganismos patógenos (Anderson *et al.*, 1990). Por otro lado su porcentaje de identidad superior en todas las especies hospedadoras es superior a 30 % por lo que podría ser riesgoso. Fue puesta en segundo plano al no estar presente en las principales especies patógenas del genero *Brucella*. Todo esto debe ser tomado en cuenta en un futuro para posteriores estudios.

Partiendo de los resultados obtenidos se destacan las similitudes con otros autores que han realizado la “Vacunología inversa” al género *Brucella* como Vishnu en sus publicaciones del 2015 y 2017 encontrando a la proteína LptD implicada en ensamble del lipopolisacárido que identificamos con el GI 17987547 y como observamos en los resultados presenta una identidad superior a 30 % en secuencias ortólogas en ovinos y caprinos.

Además, convergemos en el punto de señalar a la secuencia con el GI 17987458, una proteína de exportación polisacáridos como una potencial candidata a vacuna en humanos, aunque por la similitud superior a 30% podría ser riesgosa en bovinos.

Se destacan también los resultados obtenidos al proponer una porina (OMP2), un probable barril beta de membrana externa y una proteína de eflujo con dominio barril-sandwich. Al estar presentes en las principales especies patógenas del género *Brucella*, no compartir secuencias ortologas con las posibles especies receptoras de vacunas con similitudes superiores al 30% de identidad y ser predichas como fuertemente estimuladoras del complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos.

Por otro lado, del resto de los resultados señalados por otros autores, además de las ya mencionadas, no fueron encontradas al comparar resultados. En retrospectiva encontramos que la secuencia identificada con el GI 17988449 (BhuA) fue identificada como una proteína Barril beta, con menos de 2 hélices alfa y señalada como de membrana externa, sin embargo, al carecer de péptido señal no fue seleccionada.

Por otro lado, en un caso muy similar esta la secuencia identificada con el GI 17989189 que, al igual que la anterior, no fue seleccionada por no encontrarse un péptido señal por los programas utilizados, sin embargo y como en el caso anterior podría ser únicamente que no presenta el péptido señal detectable por los programas utilizados.

Conclusión

Se generó una base de datos de donde se concentró la información de todas aquellas secuencias que cumplieron con las características de las categorías A) Lipoproteínas, B) Barril beta, C) De Membrana Externa, D) posean Péptido Señal, E) menos de dos dominios Hélices Alfa transmembranales que incluye un total de 24 secuencias propuestas a analizar en laboratorio.

Se redujo el número de secuencias a analizar basándose en la presencia de secuencias ortologas en otras especies patógenas del genero *Brucella*, así como la ausencia de las mismas en las especies hospedadoras.

Se evaluó bioinformáticamente las secuencias en busca de predecir aquellas con la característica de “fuertemente estimuladoras” del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II.

Debido a las convergencias al señalar algunas proteínas como candidatas a vacunas con otros autores previos, se fortalece la teoría de que la proteína Omp2 podría tener altas probabilidades de ser una vacuna.

Con la ayuda de las técnicas realizadas en materia de bioinformática, conseguimos seleccionar proteínas dentro del genoma de *Brucella melitensis*, señaladas por diferentes programas computacionales, presentando un enfoque extensivo para el abordaje de la Vacunología inversa, para la generación de un banco de datos de proteínas con potencial como candidatas para investigar como posibles vacunas para la prevención de la Brucelosis.

Por otro lado, al comparar los resultados con los obtenidos por otros autores también salta a la luz que esta metodología aún está en evolución y para no saltar u omitir ninguna secuencia con buenas probabilidades de ser usada como vacuna vale la pena mejorar y usar nuevos programas más precisos.

Además, esta metodología es completamente aplicable a otros microorganismos y no limitándose a los Gram negativos, con algunas ligeras modificaciones básicas puede abarcar también Gram positivos, además con modificaciones adecuadas podría generar también bases de datos con proteínas para ser evaluadas como vacunas que pudieran ser usadas contra virus y hongos.

Perspectivas

Este análisis ha sido realizado únicamente en un genoma de referencia de una especie, por lo que se plantea la posibilidad de realizar esta metodología en el pangenoma completo del genero *Brucella*.

En el marco de lo posible, es conveniente poder comprobar de manera experimental, si algunas de las proteínas propuestas son de alguna manera estimulante del sistema inmune y es posible su uso como vacuna para la prevención de esta zoonosis.

Adicionalmente esta metodología es aplicable de manera casi idéntica a cualquier microorganismo cuyo genoma haya sido secuenciado, por ello se plantea la posibilidad de su realización en aquellos microorganismos que carezcan de una vacuna disponible o efectiva.

Este enfoque, aunque aún está en desarrollo y cambiará en función del microorganismo al que se desee aplicar, tiene el potencial de redefinir la investigación para la generación de vacunas seguras y eficaces para la prevención de enfermedades.

Apéndices

Tabla 11 restantes 36 proteínas. En esta tabla se muestra la caracterización bioinformática realizada a las 36 proteínas restantes que no presentaron las características buscadas mediante los programas usados.

característica a predicha	GI	Bases de datos en las que aparece	caracterización bioinformática
B,M,H	17986342	01,06,07,11	Región central de la Pertactina
B,M,H	17986685	01,02,03,06,07,11	Porina proteina de membrana externa
B,M,H	17986687	01,03,06,07,11	Dominio exportador de alginato
B,M,H	17986940	01,03,07,11	Dominio similar a receptor Ton-B Barril- Beta
B,M,H	17987000	01,05,06,07,11	Proteína de membrana externa Barril- Beta
B,H	17987283	01,11	Proteína dominio contenedor Fibronectina tipo III
B,M,H	17987308	01,03,06,07,11	Proteína de membrana involucrada en la degradación de hidrocarburos aromáticos
B,M	17988332	01,03	Familia de proteínas de función desconocida DUF1402
B,M,H	17988447	01,02,06,11	Proteína homólogo 5 de unión a Leu/Ile/Val
B,M,H	17988449	01,03,06,07,11	Dominio similar a receptor Ton-B Barril- Beta transportador Hemo BhuA
B,M,H	17988642	01,03,05,06,07,11	receptor TonB dependiente de cobre, Dominio similar a receptor Ton-B Barril- Beta
B,M,H	17989189	01,02,06,07,11	proteína de membrana externa Barril- Beta
L,H	17986570	04,11	Dominio cierre de glicina 2TM
L,P,H	17986846	04,08,11	Proteína de resistencia a la congelación tipo I
L,P,H	17988375	04,06,08,11	Lipoproteína de Membrana, sitio de unión a lípido Sistema de secreción Tipo IV putativa lipoproteína virB7
B,M,H	17986353	02,05,06,07,11	Lipoproteína de membrana externa, proteína cargadora similar a LolA
B,M,H	17986507	05,06,07,11	Mureína lítica transglucosilasa dominio 2 de la transglucosilasa SLT
B,M	17986668	02,03,05	Fosfatasa alcalina asociada a la membrana
B,M	17986844	05,06,07	Dominio similar a unión a péptidoglicano
B,M	17986953	05,07	familia proteica DedA
B,M	17987112	05,07	Peptidasa M50, supuesta metalopeptidasa de zinc asociada a la membrana
B,M,H	17987175	05,06,07	Familia transportadora de salida RND subunidad MFP
B,M,H	17987245	03,05,06,07,11	Componente auxiliar de lipoproteínas de transporte tipo ABC
B,M	17988143	05,07	Componente Membranal del transportador ABC
B,M,H	17988194	05,06,07	Mureína lítica transglucosilasa
B,M,H	17988335	05,06,07	Mureína lítica unida a membrana, transglucosilasa A
B,M,H	17988380	05,06,07,11	Sistema de secreción de tipo IV supuesta lipoproteína de membrana externa
B,M,H	17988427	05,06,07,11	Transportador ABC proteína de unión al sustrato tipo PnrA
B,M,H	17988428	05,06,07,11	Transportador ABC proteína de unión al sustrato tipo PnrA
B,M,H	17988692	05,06,07,11	Peptidasa M23
B,M,H	17988817	05,06,07,11	Bomba de flujo de salida RND, proteína de fusión de membrana, dominio barril-sandwich

B,M,H	17988971	05,06,07,11	Peptidasa M19, Dipeptidasa 1
B,M	17989151	05,07	Proteína Transmembranal similar a TqsA
B,M	17989315	02,03,05	Familia proteica de transportadores ABC-2
B,M	161511136	02,03,05,07	Bomba de protones energizada con pirofosfato
B,M	161511178	02,03,05,07	Insertasa de membrana YidC

Referencias

- Anderson, B., McDonald, G., Jones, D., & Regnery, R. (Septiembre de 1990). A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Infect Immun.*, 58(9).
- Aono, R., Negishi, T., & Nakajima, H. (Diciembre de 1994). Cloning of organic solvent tolerance gene *ostA* that determines n-hexane tolerance level in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 60(12).
- Bagos, P., & Liakopoulos, T. (2004). Finding beta-barrel outer membrane proteins with a Markov Chain Model. *Transactions on Biology and Biomedicine*, 2(1).
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I., & Moreno, E. (Julio de 2007). *Brucella abortus* Uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection. *PLoS One*, 2(7).
- Bertram, T., Canning, P., & Roth, J. (Abril de 1989). Preferential inhibition of primary granule release from bovine neutrophils by a *Brucella abortus* extract. *Infect Immun.*, 52(1).
- Berven, F., Flikka, K., Jensen, H., & Eidhammer, I. (2004). BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Research*, 32.
- Bendtsen, J., Henrik, N., Widdick, D., Palmer, T., & Brunak, S. (Julio de 2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*, 6(167).
- Birmingham, J., Tabatabai, L., Deyoe, B., Jeska, E., & Nuessen, M. (Mayo de 1982). Generation of chemotactic factor for granulocytes and monocytes from serum by fractions of *Brucella abortus*. *Immunology*, 46(1).
- Blank, M., & Schweiger, P. (Abril de 2018). Surface display for metabolic engineering of industrially important acetic acid bacteria. *PeerJ.*, 6.
- Boeri, E., Wanke, M., Madariaga, M., Teijeiro, M., Elena, S., & Trangoni, M. (Febrero de 2018). Comparison of four polymerase chain reaction assays for the detection of *Brucella* spp. in clinical samples from dogs. *Vet World*.
- Bouza, E., Sánchez-Carrillo, C., & González, M. (Febrero de 2005). Laboratory-acquired brucellosis: a Spanish national survey. *Journal of Hospital Infection*(61).
- Brandt, M., Riley, B., Radolf, J., & Norgard, M. (Abril de 1990). Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infection and immunity*, 58(4).

- Carvalho Neta, A., Steynen A., P., Paixão, T., Miranda, K., Silva, F., Roux, C., . . . Santos, R. (Mayo de 2008). Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 76(5).
- Carvalho, T., Haddad, J., Paixão, T., & Santos, R. (Noviembre de 2016). Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology. *PLoS ONE*, 11(11).
- Castro, H., González, S., & Prat, M. (Jun de 2005). Brucellosis; una revision practica. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39(2).
- Cheng, J., Guffanti, A., & Krulwich, T. (Marzo de 1997). A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na⁺ in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore. *Mol Microbiol.*, 23(6).
- Chillappagari, S., Miethke, M., Trip, H., Kuipers, O., & Marahiel, M. (Abril de 2009). Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 191(7).
- Chin-Sheng, Y., Yu-Ching, C., Chih-Hao, L., & Jenn-Kang, H. (Agosto de 2006). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science*, 64(3), 1402-1406.
- Christie, P. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.*, 40.
- de Maagd, R., Mulders, I., CanterCremers, H., & Lugtenberg, B. (Enero de 1992). Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a symbiotically repressed outer membrane protein. *J Bacteriol.*, 174(1).
- De Mot, R., Proost, P., & Van Damme, J. (Febrero de 1992). Homology of the root adhesin of *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3 with porin F of *P. aeruginosa* and *P. syringae*. *Mol Gen Genet.*, 231(3).
- Dehio, C., Gray-Owen, S., & Meyer, T. (Diciembre de 1998). The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends Microbiol.*, 6(12).
- Dideberg, O., Charlier, P., Dive, G., Joris, B., Frère, J., & Ghuysen, J. (Septiembre de 1982). Structure of a Zn²⁺-containing D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase at 2.5 Å resolution. *Nature.*, 299(5882).
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan, A., Clarke, B., Whitfield, C., & Naismith, J. (Noviembre de 2006). The structure of Wza, the translocon for group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*, identifies a new class of outer membrane protein. *Nature*, 444(7116).
- Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. (1995). *NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en*

los Animales. Norma Oficial, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.,
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural., Ciudad de México.

- Feng, J., Li, Y., Hashad, M., Schurr, E., Gros, P., Adams, L., & Templeton, J. (Octubre de 1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res.*, 6(10).
- Fernandes, D., & Baldwin, C. (Marzo de 1995). Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun.*, 63(3).
- Ferreira, A., Corrêa de, S., Dias, R., & Tenreiro, R. (Octubre de 2017). MLVA-16 typing of *Brucella suis* biovar 2 strains circulating in Europe. *Vet Microbiol.*, 210.
- Finco, O., Frigimelica, E., Buricchi, F., Petracc, R., Galli, G., Faenzi, E., . . . Scarselli, M. (Junio de 2011). Approach to discover T- and B-cell antigens of intracellular pathogens applied to the design of *Chlamydia trachomatis* vaccines. *PNAS*, 108(24).
- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., . . . Letesson, J. (Sep. de 2004). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, 36(3).
- Grassmann, A., Kremer, F., Dos Santos, J., Souza, J., Pinto, L., & McBride, A. (Abril de 2017). Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front Immunol.*, 27(8).
- Guzmán-Hernández, R., Contreras-Rodríguez, A., Ávila-Calderón, E., & Morales-García, M. (Diciembre de 2016). Brucellosis: zoonosis de importancia en México. *Revista chilena de infectología*, 33(6).
- Hauk, P., Macedo, F., Romero, E., Vasconcellos, S., de Morais, Z., Barbosa, A., & Ho, P. (Junio de 2008). In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. *Infect Immun.*, 76(6).
- Hernández, A., García, P., Cruz, A., & Rojo, J. (junio de 1999). Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de México. *Revista medica del hospital general de México*, 62(2).
- Im, Y., Park, W., Jung, M., Kim, S., & Yoo, H. (Mayo de 2018). Comparative Analysis of Immune Responses to Outer Membrane Antigens OMP10, OMP19, and OMP28 of *Brucella abortus*. *Jpn J Infect Dis.*, 71(3).
- Jensen, K., Andreatta, M., Marcatili, P., Buus, S., Greenbaum, J., & Yan, Z. (Julio de 2018). Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*, 154(3).

- Jones, D. (Enero de 2007). Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, 23(5).
- Juncker, A., Willenbrock, H., Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, 12, 1652–1662.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. (2005). An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. *Bioinformatics*, 21, i251–i257.
- Kall, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research, Nucleic Acids Research*.
- Kanampalliwar, A., Soni, R., Girdhar, A., & Tiwari, A. (2013). Reverse Vaccinology: Basics and Applications. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 4(6).
- Krogh, S., Jørgensen, S., & Devine, K. (Abril de 1998). Lysis genes of the *Bacillus subtilis* defective prophage PBSX. *J Bacteriol.*, 180(8).
- Lalsiamthara, J., & Lee, J. (Agosto de 2017). Development and trial of vaccines against *Brucella*. *J Vet Sci*, 18(S1).
- Laval R., E. (Diciembre de 2006). Contribución al estudio histórico de la brucelosis en Chile. *Revista chilena de infectología*, 23(4), 362-366.
- Lefébure, T., & Stanhope, M. (Mayo de 2007). Evolution of the core and pan-genome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol.*, 8(5).
- Lenz, L., Dere, B., & Bevan, M. (Julio de 1996). Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity.*, 5(1).
- Li, J., Fairweather, N., Novotny, P., Dougan, G., & Charles, I. (1992). Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *J.Gen. Microbiol.*, 138(8).
- Liebenberg, J., Pretorius, A., Faber, F., Collins, N., Allsopp, B., & van Kleef, M. (Enero de 2012). Identification of *Ehrlichia ruminantium* proteins that activate cellular immune responses using a reverse vaccinology strategy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1-2).
- Liu, J., & Rost, B. (Octubre de 2001). Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Sci.*, 10(10).
- Loosmore, S., Yang, Y., Coleman, D., Shortreed, J., England, D., & Klein, M. (Septiembre de 1997). Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and

- may represent a universal protective antigen against invasive disease. *Infect Immun.*, 65(7).
- Lucero, N., Escobar, G., Ayala, S., & Jacob, N. (Mayo de 2005). Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology*, 54(5).
- Ma, D., Cook, D., Alberti, M., Pon, N., Nikaido, H., & Hearst, J. (Octubre de 1993). Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 175(19).
- Mailybayeva, A., Yespembetov, B., Ryskeldinova, S., Zinina, N., Sansyzbay, A., Renukaradhya, G., . . . Tabynov, K. (Octubre de 2017). Improved influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant sheep and goats. *PLoS One.*, 12(10).
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C., & Chaves-Olarte, E. (Noviembre de 2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.*, 192(21).
- McMurry, J., Kimball, S., Lee, J., Rivera, D., Martin, W., Weiner, D., . . . De Groot, A. (2007). Epitope-Driven TB Vaccine Development: A Streamlined Approach Using Immunoinformatics, ELISpot Assays, and HLA Transgenic Mice. *Current Molecular Medicine*, 7(4).
- Megid, J., Mathias, L., & Robles, C. (Abril de 2010). Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *The Open Veterinary Science Journal*, 9(4).
- Meirelles-Bartolli, R., Mathias, L., & Samartino, L. (Octubre de 2012). Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. *Trop Anim Health Prod.*, 44(7).
- Méndez-Lozano, M., Rodríguez-Reyes, E., & Sánchez-Zamorano, L. (Diciembre de 2015). Brucellosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *salud pública de méxico*, 57(6).
- Michaux-Charachon S, B. G.-B.-T.-S. (Mayo de 1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, 179(10).
- Naz, K., Naz, A., Ashraf, S.T. et al. (2019) PanRV: Pangenome-reverse vaccinology approach for identifications of potential vaccine candidates in microbial pangenome. *BMC Bioinformatics* 20, 123 doi:10.1186/s12859-019-2713-9
- Nicoletti, P. (1990). Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes.*, 13.
- Nielsen, H. (Abril de 2017). Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods Mol Biol.*, 1611.

- O'Callaghan, D., & Whatmore, A. (Enero de 2012). Brucella genomics as we enter the multi-genome era. *Brief. Funct. Genomics*, 10(6).
- OIE. (2018). Recuperado el 15 de junio de 2018, de Organización Mundial de Sanidad Animal: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>
- Oliveira, S., & Splitter, G. (Septiembre de 1995). CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immunol.*, 25(9).
- Oliveira, S., de Oliveira, F., Macedo, G., de Almeida, L., & Carvalho, N. (Julio de 2008). The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect.*, 10(9).
- OMS. (Febrero de 2018). Documento de posición de la OMS sobre las vacunas BCG. *Boletín epidemiológico semanal*, 93(8).
- Ou, Y.-Y., Gromiha, M., Chen, S.-A., & Suwa, M. (2008). TMBETADISC-RBF: Discrimination of -barrel membrane proteins using RBF networks and PSSM profiles. *Computational Biology and Chemistry*, 32.
- Palmer, G., Eid, G., Barbet, A., McGuire, T., & McElwain, T. (Septiembre de 1994). The immunoprotective Anaplasma marginale major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect Immun.*, 62(9).
- Palmer, G., Eid, G., Barbet, A., McGuire, T., & McElwain, T. (Septiembre de 1994). The immunoprotective Anaplasma marginale major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect Immun.*, 62(9).
- Pathak, P., Kumar, A., & Thavaselvam, D. (Julio de 2017). Evaluation of recombinant porin (rOmp2a) protein as a potential antigen candidate for serodiagnosis of Human Brucellosis. *BMC Infect Dis.*, 17(1).
- Pautsch, A., & Schulz, G. (Noviembre de 1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol.*, 5(11).
- Pedraza-Pérez, Y., Cuevas-Vede, R., Canto-Gómez, Á., López-Pliego, L., Gutiérrez-Ríos, R., Hernández-Lucas, I., . . . Fuentes-Ramírez, L. (2018). BLAST-XYPlot Viewer: A Tool for Performing BLAST in Whole-Genome Sequenced Bacteria/Archaea and Visualize Whole Results Simultaneously. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(7).
- Petersen, T., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (Octubre de 2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *nature methods*, 8(10).

- Pils, H., Smajs, D., & Braun, V. (junio de 1999). Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the Escherichia coli outer membrane. *J Bacteriol.*, 181(11).
- Pizarro-Cerdá, J., Meresse, S., Parton, R., Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goñi, I., . . . Gorvel, J.-P. (Diciembre de 1998). Brucella abortus Transits through the Autophagic Pathway and Replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes. *INFECTION AND IMMUNITY*, 66(12).
- Pizza, M., Scarlato, V., Maignani, V., Giuliani, M., Aricò, B., Comanducci, M., . . . Rappuoli, R. (Marzo de 2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science.*, 287(5459).
- Poester, F., Samartino, L., & Santos, R. (Abril de 2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 31(1).
- Qureshi, T., Templeton, J., & Adams, L. (Marzo de 1996). Intracellular survival of Brucella abortus, Mycobacterium bovis BCG, Salmonella dublin, and Salmonella typhimurium in macrophages from cattle genetically resistant to Brucella abortus. *Vet Immunol Immunopathol.* , 50(1-2).
- Rappuoli, R. (Octubre de 2000). Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.*, 3(5).
- Rappuoli, V., & Pizza, M. (Marzo de 2001). Reverse vaccinology: a genomebased approach for vaccine development. *Vaccine*, 21(19).
- Rinaudo, C., Telford, J., Rappuoli, R., & Seib, K. (Septiembre de 2009). Vaccinology in the genome era. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9).
- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., & Oñate, A. (2006). Brucella abortus: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. med. vet.*, 38(1).
- Robichaud, S., Libman, M., Behr, M., & Rubin, E. (Enero de 2004). Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis.*, 38(12).
- Rodríguez, Y., Ramirez, W., Antunez, G., Perez, F., Ramirez, Y., & Igarza, A. (Septiembre de 2005). Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 6(9).
- Román-Cárdenas, F., & Luna-Herrera, J. (Diciembre de 2017). Revisión actualizada de la epidemiología de Brucelosis (Brucella abortus, Brucella mellitensis, Brucella suis, Brucella canis) en el Ecuador y el mundo. *Centro de Biotecnología*(6).
- Rossetti, C., Drake, K., & Adams, L. (Agosto de 2012). Transcriptome analysis of HeLa cells response to Brucella melitensis infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the Brucella pathogenesis. *Microbes Infect.*, 14(9).

- Rossetti, C., Drake, K., Siddavatam, P., Lawhon, S., Nunes, J., Gull, T., . . . Adams, L. (Diciembre de 2013). Systems biology analysis of Brucella infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. *PLoS One.*, 8(12).
- Roza, A., Pasini, P., Mirasoli, M., & Michelini, E. (2004). Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends in Biotechnology*(22), 295-303.
- Saadi, M., Karkhah, A., & Nouri, H. (Julio de 2017). Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. *Infect Genet Evol*, 51.
- Saldarriaga, O., Ossa Londoño, J., & Rugeles Lopez, M. (2002). Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con Brucella spp. *Rev Col Cienc Pec*, 15(2).
- Sangroodi, Y., Rasooli, I., Nazarian, S., Ebrahimzadeh, W., & Sefid, F. (2015). Immunogenicity of conserved cork and β -barrel domains of baumannii acinetobactin utilization protein in an animal model. *Turk J Med Sci.*, 45(6).
- Saurin, W., Hofnung, M., & Dassa, E. (Enero de 1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol.*, 48(1).
- Savojardo, C., Martelli, P., Fariselli, P., Profiti, G., & Casadio, R. (Julio de 2018). BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 46(W1).
- Scholz, H., Revilla-Fernández, S., Al Dahouk, S., Hammerl, J., Zygmunt, M., Cloeckert, A., . . . Hofer, E. (Mayo de 2016). Brucella vulpis sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(66).
- Schulz, G. (Octubre de 2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.*, 1565(2).
- Secretaria de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. (1995). *Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con brucelosis*. Norma oficial, Secretaria de salud, Subsecretaria de prevencion y promocion de la salud, Ciudad de México.
- Serruto, D., Bottomley, J., Sanjay, R., Marzia, M., & Rappuoli, R. (Mayo de 2012). The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, 30(02).
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Recuperado el 25 de Enero de 2019, de www.gob.mx: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico>

- Shenoy, B., Xie, Y., Park, V., Kumar, G., Beegen, H., Wood, H., & Samols, D. (Septiembre de 1992). The importance of methionine residues for the catalysis of the biotin enzyme, transcarboxylase. Analysis by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.*, 267(26).
- Shrestha, B., Kenedy, M., & Akins, D. (Febrero de 2017). Outer Membrane Proteins BB0405 and BB0406 Are Immunogenic, but Only BB0405 Is Required for *Borrelia burgdorferi* Infection. *Infect Immun*, 85(2).
- Sidhu-Muñoz, R., Sancho, P., & Vizcaíno, N. (Abril de 2016). *Brucella ovis* PA mutants for outer membrane proteins Omp10, Omp19, SP41, and BepC are not altered in their virulence and outer membrane properties. *Vet Microbiol.*, 15.
- Steinbrecher, U., Fisher, M., Witztum a, J., & Curtiss, L. (Octubre de 1984). Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine. *The Journal of Lipid Research*, 25.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., & Reeves, P. (Agosto de 1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol.*, 178(16).
- Sundaramurthi, J., Brindha, S., Shobitha, S., Swathi, A., Ramanadan, P., & Hanna, L. (Abril de 2012). In silico identification of potential antigenic proteins and promiscuous CTL epitopes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6).
- Szklarczyk, D., Gable, A., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., . . . Mering, C. (eNERO de 2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.*, 47(D1).
- Tan, H., Togonon, L., Xuan, T., Huy, N., & Wehdnesday, A. (Abril de 2018). Immunization of BALB / c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. *Vaccine*. Obtenido de *Vaccine*.
- Traxler, R., Lehman, M., Bosserman, E., Guerra, M., & Theresa, S. (Sep de 2013). A Literature Review of Laboratory-Acquired Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 51(9).
- Tusnády, G., & Simon, I. (Septiembre de 2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.*, 17(9).
- U.S. Department of Health & Human Services. (2018). Recuperado el 15 de Agosto de 2018, de vaccines.gov: <https://espanol.vaccines.gov/básicos/tipos/eskw/índice.html>

- Uzureau , S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., . . . Letesson, J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res.*, *9*(6). doi:doi: 10.1021/pr100068p
- Vega López, C., Andraca, R., & Rodríguez Weber, F. (2008). Brucellosis. Una infección vigente. *Acta Médica Grupo Ángeles*, *6*(4).
- Vidal, S., Tremblay, M., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., . . . Gros, P. (Septiembre de 1995). The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med*, *182*(3).
- Vishnu, U., Sankarasubramanian, J., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (Noviembre de 2015). Novel Vaccine Candidates against *Brucella melitensis* Identified through Reverse Vaccinology Approach. *OMICS*, *19*(11).
- Vivvona, S., Bernante, F., Filippini, F. (Julio de 2006). NERVE: New Enhanced Reverse Vaccinology Environment. *BMC Biotechnol.*, *6*(35).
- Wai-Leung, N., & Bassler, B. (2009). Quorum-sensing network architectures. *Annual Review Genetics*, *43*, 197-222.
- Wells, R., Jones, C., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos , K., . . . Niederweis, M. (Enero de 2013). Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.*, *9*(1).
- Whatmore, A., Davison, N., Cloeckert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M., Brew, S., . . . Schlabritz-Loutsevitch, N. (Diciembre de 2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol.*, *64*.
- Wilson, M., & Bernstein, H. (Marzo de 2016). Surface-Exposed Lipoproteins: An Emerging Secretion Phenomenon in Gram-Negative Bacteria. *Trends Microbiol*, *24*(3).
- Wizemann, T., Heinrichs, J., Adamou, J., Erwin, A., Kunsch, C., Choi, G., . . . Koenig, S. (Marzo de 2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.*, *69*(3).
- World Health Organization/American Public Health Association. (2004). Control of communicable diseases manual: an official report of the American Public Health. *18*. (D. Heymann, Ed.) Whashington DC.
- Xolalpa, V., Pérez , M., & Córdova, A. (Julio de 2010). Evaluation of the Economic Losses of Events Associated With Reproductive Failure in Female Bovine Brucellosis and Dairy Farms of the Basin of Tizayuca, Hidalgo, Mexico. *Rev. cient.*, *20*(2).
- Young, E. (Agosto de 1995). An overview of human brucellosis. *Clin. infect. Dis.*, *21*(2).

Yu, N., Wagner, J., Laird, M., Melli, G., Rey, S., Lo, R., . . . Brinkman, F. (Mayo de 2010). PSORTb 3.0 improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13).

Zhan, Y., & Cheers, C. (Abril de 1995). Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.*, 63(4).

Zvi, A., Rotem, S., Bar-Haim, E., Cohen, O., & Shafferman, A. (2011). Whole-Genome Immunoinformatic Analysis of *F. tularensis*: Predicted CTL Epitopes Clustered in Hotspots Are Prone to Elicit a T-Cell Response. *PLoS ONE*, 6(5).